



Pannon Egyetem
Vegyésmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola

**ENTOMOPATOGEN BAKTÉRIUMOK ANTIMIKROBIÁLIS
HATÁSÚ ANYAGCSERETERMÉKEINEK
FELHASZNÁLHATÓSÁGA A NÖVÉNYVÉDELEMBEN**

DOI:10.18136/PE.2017.650

DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS

Készítette:

Vozik Dávid
Okleveles környezetmérnök

Témavezetők:

Bélafiné Dr. Bakó Katalin
egyetemi tanár

Dr. Fodor András
kutató-professzor (PE), ny. habilitált egyetemi docens (ELTE)



Pannon Egyetem
Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet

2017

**ENTOMOPATOGEN BAKTÉRIUMOK ANTIMIKROBIÁLIS HATÁSÚ
ANYAGCSERETERMÉKEINEK FELHASZNÁLHATÓSÁGA A
NÖVÉNYVÉDELEMBEN**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

*a Pannon Egyetem.....

Doktori Iskolájához tartozóan*.

Írta:

Vozik Dávid

**Készült a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskolája/
programja/alprogramja keretében

Témavezetők: Bélafiné Dr. Bakó Katalin

Elfogadásra javasolom (igen / nem)

.....

(aláírás)

Dr. Fodor András

Elfogadásra javasolom (igen / nem)

.....

(aláírás)**

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javasolom:

Bíráló neve: igen /nem

.....

(aláírás)

Bíráló neve: igen /nem

.....

(aláírás)

***Bíráló neve: igen /nem

.....

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Veszprém/Keszthely,

.....

a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....

Az EDHT elnöke

Megjegyzés: a * közötti részt az egyéni felkészülők, a ** közötti részt a képzésben résztvevők használják, *** esetleges

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	- 6 -
KIVONAT	- 7 -
ABSTRACT	- 8 -
AUSZUG	- 9 -
BEVEZETÉS	- 10 -
1. SZAKIRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	- 12 -
1.1. Biológiai és integrált növényvédelem	- 12 -
1.2. Növénypatogén kórokozók és a védekezés lehetőségei	- 15 -
1.2.1. <i>Erwinia amylovora</i>	- 16 -
1.2.2. <i>Ralstonia solanacearum</i>	- 22 -
1.3. Entomopatogén nematoda / baktérium szimbiotikus rendszerek	- 25 -
1.3.1. Entomopatogén fonálférgek (EPN)	- 28 -
1.3.2. Entomopatogén baktériumok (EPB)	- 30 -
1.4. EPB-k által termelt biológiailag aktív anyagok	- 32 -
1.4.1. Antimikrobiális peptidek	- 35 -
1.5. Célkitűzések	- 40 -
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	- 41 -
2.1. Anyagok	- 41 -
2.1.1. Entomopatogén baktérium törzsek	- 41 -
2.1.2. Teszt baktériumok	- 41 -
2.1.3. Gazdanövények	- 43 -
2.1.3.1. Alma – 'Watson Jonathan'	- 43 -
2.1.3.2. Burgonya – 'Balatoni rózsa'	- 44 -
2.1.4. Táptalajok, oldatok	- 44 -
2.1.5. Antibiotikumok	- 45 -
2.2. Módszerek	- 46 -
2.2.1. Baktériumok fenntartása és tenyésztése	- 46 -
2.2.2. Telepszámlálás	- 47 -
2.2.3. Sejtmentes kondicionált <i>Xenorhabdus</i> fermentlé előállítása	- 47 -
2.2.4. Tisztított bioaktív frakció előállítása	- 48 -
2.2.5. <i>In vitro</i> vizsgálati módszerek	- 50 -
2.2.5.1. Teszt baktériumok érzékenysége hagyományos antibiotikumokkal szemben	- 50 -
2.2.5.2. Felülrétegzéses mérés	- 51 -
2.2.5.4. Baktericid hatás folyadék fázisban	- 54 -
2.2.5.5. MID (maximális hatékony hígítás)	- 55 -

2.2.5.6. MIC (minimális inhibíciós koncentráció)	- 55 -
2.2.5.7. MBC (minimális baktericid koncentráció)	- 56 -
2.2.6. <i>In vivo</i> vizsgálati módszerek	- 56 -
2.2.6.1. Hatékonyság mesterségesen fertőzött alma virágokon tűzelhalás ellen	- 56 -
2.2.6.2. Fertőzési kísérlet burgonya növényeken	- 59 -
2.2.6.3. Fitotoxikus hatás vizsgálata	- 62 -
2.2.7. Statisztikai analízis	- 62 -
2.2.8. Analitikai vizsgálatok	- 63 -
3. EREDMÉNYEK	- 65 -
3.1. <i>In vitro</i> vizsgálati módszerek	- 66 -
3.1.1. Teszt baktériumok érzékenysége hagyományos antibiotikumokkal szemben	- 66 -
3.1.2. Felülrétegzéses mérés	- 67 -
3.1.3. Agardiffúziós lyuk teszt	- 69 -
3.1.4. Baktericid hatás folyadék fázisban	- 72 -
3.1.5. MID (maximális hatékony hígítás)	- 75 -
3.1.6. MIC és MBC értékek	- 76 -
3.2. <i>In vivo</i> vizsgálati módszerek	- 76 -
3.2.1. Hatékonyság mesterségesen fertőzött alma virágokon tűzelhalás ellen	- 77 -
3.2.2. Fertőzési kísérlet burgonya növényeken	- 79 -
3.2.3. Előállított minták fitotoxikus hatása	- 81 -
3.3. Analitikai vizsgálatok	- 82 -
4. ÖSSZEFOGLALÁS	- 88 -
5. TÉZISEK	- 95 -
6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK	- 97 -
7. IRODALOMJEGYZÉK	- 101 -
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	- 111 -

Rövidítések jegyzéke

AM - Ampicillin
AMP - antimikrobiális peptid
ANOVA - (Analysis of variance) varianciaanalízis
BTB - (Bromothymol blue) brómtimolkék (indikátor festék)
CB - Carbenicillin
CHL - Chloramphenicol
CFCM - (Cell-free conditioned medium) sejtmentes kondicionált fermentlé
CFU - (Colony forming unit) telepformáló egység
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDC - (Endocrin disrupting chemicals) endokrin-károsító vegyületek
EMA - *Xenorhabdus budapestensis* DSM-16342^T baktérium törzs
EMC - *Xenorhabdus szentirmaii* DSM-16338^T baktérium törzs
EPB - entomopatogén baktérium
EPN - entomopatogén nematoda
FT-IR - (Fourier transform infrared) Fourier-transzformációs infravörös (spektroszkópia)
FVM - Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium
GM - Gentamicin
HPLC - High performance liquid chromatography, nagyteljesítményű folyadékkromatográf
IJ - (Infective juvenile) infektív dauerlárva
IPM - (Integrated Pest Management) integrált növényvédelem
KM - Kanamycin
LB - Luria-Bertani Broth tápközeg
LBA - Luria-Bertani Agar táptalaj
LBTA - Luria-Bertani Agar indikátor táptalaj
MBC - (Minimum bactericidal concantration) minimális baktericid koncentráció
MIC - (Minimum inhibitory concentration) minimális gátló koncentráció
MID - (Maximum inhibiting dilution) maximális hatékony hígítás
NAL - Nalidixinsav
NCAIM - National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms
NÉBIH - Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
NMR - (Nuclear magnetic resonance) mágneses magrezonancia (spektroszkópia)
OD - optikai denzitás
PAX - (Peptide-Antimicrobial-Xenorhabdus cyclolipopeptide) ciklolipopeptid
RIF - Rifampin
SA - Soft Agar táptalaj
STR - Streptomycin
TET - Tetracyclin
TTC - 2,3,5-trifeniltetrazolium-klorid (indikátor festék)
WHO - (World Health Organisation) Egészségügyi Világszervezet

Kivonat

A vegyszermentes, környezettel egyensúlyban lévő, a helyi környezet részeként működő és a helyi természeti adottságokra tekintettel lévő növénytermesztés iránti igény az utóbbi időben kiemelt jelentőséggel bír. Az újfajta, természetes eredetű és költséghatékonyan előállítható növényvédőszeres kutatása és fejlesztése elősegíti a környezetkímélő védekezési módszerek elterjedését, ösztönzi a mezőgazdaság szereplőinek szemléletmód-váltását.

Doktori munkám során entomopatogén baktériumok (EPB) felhasználásával létrehozható biopreparátumokat vizsgáltam, melyek sikeresen alkalmazhatóak lehetnek az integrált növényvédelemben bakteriális eredetű növénypatogén kórokozók ellen.

A kidolgozás kezdeti fázisában két Magyarországon izolált EPB törzs (*Xenorhabdus budapestensis* és *X. szentirmaii*) potenciálját hasonlítottam össze *in vitro* kísérletek segítségével. Az ígéretesebb antibiotikum-termelő törzs kiválasztása után különböző tisztítottsági fokú mintákat állítottam elő. Az elkészített biopreparátumok hatásának igazolása érdekében különböző antibiotikum-érzékenységi módszereket alkalmaztam.

In vivo kísérletekben két olyan növényi kórokozót (*Erwinia amylovora* és *Ralstonia solanacearum*) tanulmányoztam, melyekkel szemben a jelenleg érvényes szabályozás miatt nincs megfelelő védekezési mód a hazai gyakorlatban. Az *E. amylovora* a rózsafélék családjába tartozó növények - így az alma, körte és több dísznövény faj - tűzelhalásáért felelős baktérium. Az elmúlt években jelentős károkat okozott az országban és szerte a világon. A *R. solanacearum* a burgonya baktériumos rothadásáért felelős patogén, amely az öntözővíz segítségével, vagy fertőzött szaporítóanyag révén terjed általában.

A növénykísérletek során a hatásosság mellett az elkészített biopreparátumok fitotoxikus hatását is vizsgáltam, hiszen az alkalmazhatóság alapfeltétele, hogy a védendő gazdanövényben ne jelentkezzen károsodás a kezelés hatására. Végül az eredmények tekintetében értékeltem a különböző tisztítottsági fokú minták növényvédelmi célú felhasználhatóságát. Természetesen egy új termék fejlesztése számos további kérdést is felvet az engedélyezési folyamat során (perzisztencia, akkumuláció, ökotoxicitás, formulázás). Mindazonáltal a kutatás eredményei szilárd alapot biztosítanak a hatékonyságra vonatkozóan.

Abstract

The demand for chemical-free, environmentally balanced cultivation, that working as part of the local environment and in consideration of the local natural resources has a priority recently. Research and development of novel pesticides of natural origin and produced by cost-effective way facilitate the spread of environmentally friendly protection techniques, encourage the change in approach of agricultural participants.

During the doctoral work biopreparations made by utilization of entomopathogenic bacteria (EPB) were investigated, which can be successfully applicable in integrated plant protection against plant pathogenic organisms of bacterial origin.

In the first phase of the research the potentials of two EPB strains isolated from Hungary (*Xenorhabdus budapestensis* and *X. szentirmaii*) were compared by *in vitro* experiments. After selecting the better antibiotic producer strain, samples with different purification degrees were extracted. To verify effect of the biopreparations prepared, different antibiotic susceptibility test methods were used.

Two plant pathogens (*Erwinia amylovora* and *Ralstonia solanacearum*) – against them there is no suitable protection manner in domestic practice at the moment – were investigated by *in vivo* experiments. *E. amylovora* is responsible for fire blight of several plants belong to Rosaceae, like apple, pear and various ornamental species. In the last few years it caused considerable damages in Hungary and over the world. *R. solanacearum* causes brown rot disease of potato that can generally spread through irrigating water or by infected propagation material.

During the plant experiments phytotoxic effect of the prepared biopreparation was also investigated beside the efficiency, because precondition of applicability is that no lesions occurred on the host plant to be protected due to the treatment. Finally, effectiveness of the samples with different purification degrees in plant protection was evaluated based on the results. Development of a novel product necessarily brings up numerous further questions during the process of licensing (persistence, accumulation, ecotoxicity, formulation). Nevertheless the results of this research can ensure strong background concerning effectiveness.

Auszug

Die Forderung nach einer chemikalienfreien, umweltverträglichen Kultivierung, die im Rahmen der lokalen Umwelt und unter Berücksichtigung der lokalen natürlichen Ressourcen arbeitet, hat eine hervorragende Priorität in der letzten Zeit. Die Forschung und Entwicklung von neuartigen Pestiziden mit natürlichem Ursprung, die durch kostengünstige Weise hergestellt werden, hilft die Verbreitung der umweltfreundlichen Schutztechniken und fördern die Änderung der Einstellung der Teilnehmer der Landwirtschaft.

In meiner Doktorarbeit wurden die mit Verwendung von entomopathogenen Bakterien (EPB) produzierbaren Biopräparate untersucht, die erfolgreich im integrierten Pflanzenschutz gegen pflanzenpathogene Organismen bakterieller Herkunft eingesetzt werden können.

In der ersten Phase des Ausarbeitungspotentials von zwei in Ungarn isolierten EPB-Stämmen (*Xenorhabdus budapestensis* und *X. szentirmaii*) wurden *in vitro*-Experimenten verglichen. Nach der Auswahl des besseren Antibiotikumproduzierenden Stammes wurden Proben mit unterschiedlichem Reinigungsgrad extrahiert. Zum Beweis der Wirkung der hergestellten Biopräparate wurden verschiedene Antibiotikaresistenz-Testverfahren verwendet.

Zwei Pflanzenpathogene (*Erwinia amylovora* und *Ralstonia solanacearum*) wurden durch *in vivo* Experimente untersucht, gegen denen keine geeignete Schutzart in Inlandspraxis aufgrund der derzeitigen Gesetze besteht. *E. amylovora* ist die verursachenden Bakterien der Feuerbrand von mehreren Pflanzen, die zum Stamm der Rosaceae gehören - also der Äpfel, Birne und verschiedene Zierarten -. In den letzten Jahren hat es in Ungarn und in aller Welt erhebliche Schäden verursacht. *R. solanacearum* ist der verursachende Erreger der bakteriellen Braunfäule der Kartoffel, die sich meist durch Gießwasser oder durch infiziertes Vermehrungsmaterial verbreitet

In den Pflanzenexperimenten wurde auch die phytotoxische Wirkung der gefertigten Biopräparate neben der Effizienz untersucht, da die Grundvoraussetzung der Anwendbarkeit ist, dass keine Schädigung auf die zu schützenden Wirtspflanze wegen der Behandlung auftreten darf. Schließlich wurde die Verwendungsfähigkeit der Proben mit unterschiedlichem Reinigungsgrad im Pflanzenschutz anhand der Ergebnisse bewertet. Die Entwicklung eines neuartigen Produkts greift zahlreiche weitere Fragen bei der Lizenzierung (Persistenz, Akkumulation, Ökotoxizität, Formulierung) auf. Dennoch können die Ergebnisse dieser Forschung einen starken Hintergrund hinsichtlich der Effektivität sicherstellen.

Bevezetés

*„Az integrált védelem
a biológiailag képzett ember józan észjárása.”*

R. L. Rudd

A népességi adatok növekvő tendenciája és az ezzel párhuzamosan fokozódó élelmiszerigény jelentkezése, valamint a hasznosítható termőföld-területek csökkenése miatt napjaink egyik jelentős kihívása a haszonnövények megfelelő mennyiségben történő termelése, elegendő termény előállítása. A probléma megoldása szempontjából kiemelten fontos a fenntartható mezőgazdaság megvalósítása, melynek egyik leghatékonyabb eszköze az integrált növényvédelem alkalmazása. Ez a korszerű szemléletmód előtérbe helyezi a természetvédelmet, valamint próbálja minimalizálni a tisztán gazdasági célú radikális kémiai beavatkozásokat.

A rovarkártevők, valamint talajlakó kártevők (pl. cserebogár pajorok) elleni hatékony biológiai védekezés lehetőségei közé tartozik a rovarpatogén fonálférgekből (EPN) és velük szimbiózisban élő rovarpatogén baktériumokból (EPB) álló komplexek felhasználása. A fonálférgek törzsének két nemzetségével, a *Heterorhabditis* és a *Steinernema* fajokkal szimbiotikus kapcsolatban álló entomopatogén baktérium fajok többféle biológiailag aktív anyagot is termelnek.

A rovarpatogén nematoda / baktérium komplexek vizsgálatának Magyarországon több évtizedes múltja van. A hazai kutatóbázis magját az 1990-es és 2000-es években főként az ELTE Genetikai Tanszéke alkotta. A Dr. Fodor András vezette Nematoda laboratóriumban egy nemzetközi mércével mérve is jelentős törzsgyűjteményt sikerült létrehozni. Az évek során számos PhD értekezés, biológus diplomadolgozat, valamint elismert nemzetközi folyóiratokban megjelent közlemény született, melyek fémjelzik az egykori kutatócsoport munkájának eredményességét e területen. Fontosnak tartom megemlíteni Dr. Sisak Csaba nevét is, akinek a veszprémi Műszaki Kémiai Kutató Intézetben létrehozott szakmai közösség révén elvülhetetlen érdemei vannak a tudományterület fejlődésében. A 2000-es évek elején kiépítésre került egy kísérleti termelő üzem Újfehértón, ahol egy 100-150 l térfogatú speciális fermentort helyeztek üzembe, majd megtörtént a kiválasztott nematoda és szimbionta

baktérium törzsek szimultán tenyésztési körülményeinek optimalizálása és a mezőgazdasági hasznosítás irányában is folytak vizsgálatok.

A kutatásban közvetlen elődömnek Dr. Böszörményi Erzsébetet tartom, mivel tevékenységének fő irányvonalát már nem a biológiai növényvédelemben történő alkalmazás, hanem a szimbionta baktériumok által termelt antimikrobiális hatású anyagok feltérképezése jelentette, ami jelentős biomérnöki háttérrel is igényelt.

A tudományterületről általánosan megállapítható, hogy a bioaktív komponensek azonosítása napjainkban intenzíven vizsgált szegmens. A külföldi kutató műhelyek közül kiemelkedik a frankfurti Goethe Universitát, és a Dr. Helge Bode vezetésével tevékenykedő közösség, amely a hatóanyag komponensek molekulaszervezetének meghatározásában élen jár. Természetesen az anyagcseretermékek nagy száma és a termelt vegyületek változatossága miatt ez a feladat olyan infrastruktúrát igényel, amely komplex nagyműszeres analitikai vizsgálatokra alkalmas. Mindemellett manapság a genetika is fontos szerepet játszik, hiszen a genom szekvencia alapján prognosztizálható bizonyos antimikrobiális termékek előfordulása.

A doktori munka során célkitűzésem az volt, hogy egy hatékony entomopatogén baktérium felhasználásával olyan újfajta, természetes eredetű növényvédőszert hozzak létre, melyet sikeresen lehet alkalmazni az integrált növényvédelemben bakteriális eredetű növénypatogén kórokozók ellen.

1. Szakirodalmi összefoglaló

1.1. *Biológiai és integrált növényvédelem*

A hagyományos értelemben vett biológiai növényvédelem több évszázados múlttal rendelkezik [DeBach, P., 1964]. A XXI. század elején a fejlett országok társadalmában végbemenő szemléletmód-váltás nyomán jelentős mértékű kereslet és piac teremődött az úgynevezett „bio-termékek” iránt. A biológiai növényvédelem elsősorban ennek a változásnak köszönhetően napjainkban egyre kiemeltebb szerepet kap a mezőgazdaságban alkalmazott védekezési módszerek között. Bár a peszticideknek az 1960-as évekig nagy társadalmi elfogadottsága volt, a Rachel Carson által 1962-ben publikált 'Silent Spring' felhívta a figyelmet a szintetikus növényvédőszer generálta környezetvédelmi problémákra, valamint az ember egészségére káros és veszélyes hatásaira [Carson, R., 1962].

Mivel a növényvédelemben a célszervezetek mellett más élőlények expozíciója is megvalósul - ezt *non-target* hatásnak nevezik [Darvas, B., 1998] -, valamint a peszticidek feladata valamilyen biológiai hatás kifejtése (baktericid, herbicid, fungicid), ezért nem meglepő, hogy nagy arányban fordulnak elő közöttük olyan anyagok, amelyek a szervezet hormonháztartását zavarják, úgynevezett EDC (Endocrin Disrupting Chemicals) hatással rendelkeznek [Bergman, A., 2013].

A szintetikus peszticidek perzisztenciája és vízzoldhatósága ugyan eltérő lehet, de jelentős részükről megállapítható, hogy lassan és nehezen bomlanak le, valamint bioakkumulációval felhalmozódhatnak a tápláléklánc különböző élőlényeiben, a talajban és a természetes vizekben is, komoly károkat okozva ezzel az ökoszisztémában. Túlzott és gondatlan felhasználásuk miatt az 1970-es években az üvegházi termények kártevői között már több rezisztens törzset is izoláltak [Mello, E. J. R., 1970], sőt egyes esetekben többféle vegyszer ellen is védettséget szereztek a kártevők kereszt-rezisztencia által [Lloyd, C. J., 1969]. Az így kialakult helyzet és a megjelenő humán toxikológiai vizsgálatok újabb és egyre költségesebb hatóanyagú peszticidek kifejlesztését igényli, mintegy versenyt futva a természettel. A folyamatot jól mutatja az az adat, hogy míg az 1980-as években egyetlen piacképes készítmény kifejlesztése átlagosan 40 millió USD-ba került, addig ez a költség a '90-es évek végén már a 100 millió USD-t is meghaladta [Lisansky, S. G., 1997].

A költségek növekedése és a közvélemény szemléletváltása mellett számos ok vezetett a biológiai védekezési kutatások kiterjedéséhez. Ilyen például az 1970-ben létrejött IPM

(Integrated Pest Management) koncepció, amely már nem a károsítók kiirtását, hanem azok szabályozását tekinti célnak, tehát a kártevők küszöbszint alatt tartását irányozza elő. Az IPM stratégiája a környezet védelme mellett gazdaságossági szempontok alapján is szabályozza a növényvédőszer felhasználását, ezért költséghatékony megoldásnak tekinthető. A hazánkban jelenleg hatályos törvényi megfogalmazás szerint az „integrált növényvédelem: biológiai, biotechnológiai, kémiai, termesztési vagy növénynevelési intézkedések ésszerű alkalmazása, amelyek során a kémiai növényvédő szerek használata arra a szorosan vett legalacsonyabb értékre korlátozódik, amely a károsító populációnak egy gazdaságilag elfogadhatatlan kárt vagy veszteséget okozó szint alatt való tartásához szükséges” [2000. évi XXXV. törvény a növényvédelemről].

Mindezt figyelembe véve, az IPM elvei összhangban állnak a fenntarthatóság vagy fenntartható fejlődés gondolatával, miszerint környezetünk mennyiségi és minőségi romlását minimalizálni kell. Az integrált növényvédelem magában foglalja a kémiai, fizikai, biológiai és egyéb védekezési módokat úgy, hogy azok akár egymást kiegészítve, a legkisebb terhelést jelentsék a környezet számára. Ez természetesen igen nagy ismeretanyagot igényel mind a termesztett növényről, károsítóiról, ezek természetes ellenségeiről, valamint az ellenük felhasznált peszticid viselkedéséről. De Ponti szerint az integrált növényvédelem koncepciója van olyan idős, mint maga a mezőgazdaság, mindössze átmenetileg, a peszticidek széleskörű elterjedése alatt feledkeztünk meg róla. Szinte minden élőlénynek létezik természetes ellensége, a korszerű biológiai növényvédelem pedig figyelembe veszi azon antagonista szervezetek tevékenységét, melyek számunkra hasznosak a növényvédelemben, szerepet játszanak a kártevők egyedsűrűségének befolyásolásában [de Ponti, O. M. B., 1980].

A biológiai eredetű növényvédőszer előállításának költségei sokáig nem voltak versenyképesek a szintetikus növényvédőszerrel szemben. A hasznos szervezetek szaporítása, az általuk termelt hatóanyag kinyerése és kijuttatása több költséggel és humán munkaerő felhasználásával jár, ami nagymértékben drágítja alkalmazásukat.

Annak ellenére, hogy Magyarországon az IPM rendszerén belül kiemelt szerepet kap a biológiai védekezés, 2005-ben még csupán 122 ha területen alkalmazták a gazdálkodók, s ezen belül a legnagyobb hányadot a paprika és a paradicsom biológiai védelem alá vont területe tette ki [Budai, Cs., 2006]. Az újfajta, hatékony és biztonságosan alkalmazható, olcsón előállítható biopreparátumok, illetve hatóanyagok fejlesztése, kutatása tehát szükséges és indokolt a folyamat elősegítése érdekében.

A biológiai növényvédelem tömören megfogalmazva a természetes ellenségek bevetését jelenti kártevő és patogén szervezetek ellen. Már időszámításunk előtt is alkalmaztak állatokat

a termés megóvására, a kártevők visszaszorítására. Ilyen például az ókori Egyiptomban tenyésztett macskák esete a rágcsálók ellen, viszont természetes ellenség hiányában ezzel a módszerrel igencsak óvatossá kell lenni, hiszen nagy károkat okozhat az egyébként hasznos élőlények túlszaporodása is. Napjainkban az általánosan elfogadott nézet szerint biológiai védekezés céljából csak olyan szervezet telepíthető be egy új környezetbe, amely szűk gazdakörrel rendelkezik és biztonsággal megállapítható róla, hogy a későbbiekben sem fogja változtatni gazdakörét [Aeschlimann, J. P., 1995].

A kártevők között jelentős területet képvisel a molytetvek elleni biológiai védekezés, mely célra leginkább a molytetű fürkészt (*Encarsia formosa*) alkalmazzák [Balogh, S., 1991]. Emellett még a tripszek (Thysanoptera) és levéltetvek (Homoptera) elleni védekezés is elterjedt. A talajból fertőző kórokozókkal szemben mikrobiológiai készítmények használhatók fel. Ezek a készítmények az úgynevezett biopreparátumok, melyek fő forgalmazói holland és belga cégek [Polgár, A. L., 2008]. A világpiacon a legnagyobb üzleti sikert a *Bacillus thuringiensis* baktériumból készített biopreparátumok érték el, melyeket rovarölő szerként (például szúnyoglárva ellen) hoztak forgalomba. Hatóanyaguk tulajdonképpen a baktérium által létrehozott parasporális test, amely a rovarokra toxikus fehérjekristályokból (δ -endotoxinok) épül fel [McGaughey, W. H., 1992].

A növényi kórokozókkal szembeni védekezéshez mikroorganizmusok használhatók fel, melyek fokozott antagonizmust mutatnak növénypatogénekkel szemben és képesek olyan anyagcseretermékeket előállítani, amik védik a növényt a fertőző organizmusoktól, tehát vagy elpusztítják azokat, vagy gátolják szaporodásukat, élettevékenységeiket. Élő mikroorganizmusok kijuttatása esetén szükséges, hogy az adott mikroflórában versenyképes legyen az antagonista szervezet, hiszen ennek hiányában nem tudja hatékonyan kifejteni hatását. Az antagonista szervezetek kiválasztásánál természetesen érvényesek azon biztonsági előírások, hogy a felhasznált baktérium ne legyen patogén emberre és állatokra, valamint anyagcsereterméke ne halmozódjon fel a növényben, hiszen így a növényt elfogyasztó élőlények egészsége károsodhat [Polgár, A. L., 2008].

Az antagonista mikroorganizmus helyett célszerű lehet annak tisztított, antibiotikus hatású metabolitjait hasznosítani, hiszen a fermentációt és a sejtek elválasztását követően könnyen előállítható, az így kapott készítmény tárolása és engedélyeztetése is könnyebben megoldható, valamint a hatékonyság is pontosabban szabályozható. Az antibiotikumok növényvédelmi célú alkalmazásának ellentmondó legfőbb érv, hogy a kórokozók egy idő után a szelekciós nyomás hatására rezisztenssé válhatnak. A tudományág szakembereinek egy része szerint az antibiotikum használatának szüneteltetésével a rezisztens kórokozók az adott antibiotikumtól

mentes közegben nem lesznek versenyképesek az „eredeti” vad törzsekkel szemben, ezért kisselektálódhatnak és visszaáll az eredeti egyensúly [Yamaguchi, I., 1996]. Elegendő lehet tehát a különféle hatóanyagok ésszerű alkalmazása. Újfajta hatóanyag esetében természetesen a nem célzott szervezetekre gyakorolt toxikus hatást mindenképpen részletesen meg kell vizsgálni.

1.2. Növénypatogén kórokozók és a védekezés lehetőségei

Az emberi társadalmak a földművelés megjelenése óta küzdelmet folytatnak az élelmiszertermelést veszélyeztető mezőgazdasági károsítók ellen. A kártevők még napjainkban is a potenciális termés 25-50%-ának pusztulását idézik elő globálisan minden évben [Pimentel, D., 1989]. A növekvő emberi populáció élelmiszer-ellátásának biztosításához tehát a kártételek minimalizálása, a károsítók hatékony szabályozása szükséges.

A növényeket fertőző kórokozók lehetnek vírusok, baktériumok vagy gombák. A vírusok genetikai információjuk átadásával kényszerítik a gazdasejtet önmaguk megtöbbszörözésére, és ez által okoznak káros elváltozásokat a megtámadott növényben. Terjedhetnek rovarok közvetítésével, mechanikai úton, vegetatív módon, vagy vetőmaggal. A vírusok elleni védekezés elsősorban a megelőzésen alapul. Ki kell zárni a vetőmag fertőzöttségét, el kell kerülni a vírusvektorokkal történő érintkezést, valamint a metszőolló és egyéb munkaeszközök fertőtlenítése is szükséges hőkezeléssel, illetve NaOH-oldatba mártással.

A gombák telepeket alkotó többsejtű szervezetek, melyek egyes képviselői szintén károsíthatják a haszonnövényeket. További problémát okoznak a rendkívül mérgező mikotoxinokat termelő fajok, például az *Aspergillus spp.* képviselői, melyeknél aflatoxin és ochratoxin termelése is előfordul. Ezek a gombatoxinok bekerülve az élelmiszerekbe erős rákkeltő hatással rendelkeznek, ezért feltétlenül meg kell akadályozni a terjedésüket. A preventív védekezési módok mellett fontos az agrotechnikai rendszabályok szigorú betartása, valamint indokolt esetben a zárlati intézkedések elrendelése. Széles körben elterjedtek a réz- és kéntartalmú fungicidek, a szerves hatóanyag-tartalmú vegyszeres gombaölő szerek, de emellett találunk példákat természetes eredetű készítmények, kivonatok alkalmazására is. Biológiai védekezési módszerként említhető a *Streptomyces griseoviridis* baktériumot tartalmazó por alakú gombaölő szer, amely kereskedelmi forgalomban kapható, illetve a

különbféle *Streptomyces* fajok tisztított hatóanyagaiból gyártott készítmények is léteznek [Polgár, A. L., 2008].

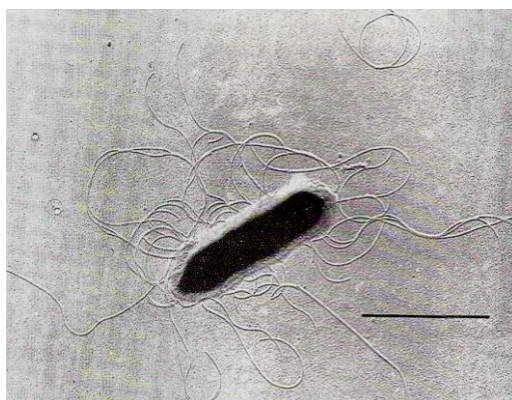
A fitopatogén baktériumok mind heterotróf fajok. Általában Gram-negatív egysejtűek, aerob, vagy ritkábban fakultatív anaerob életmódot folytatnak. Fertőzés során a patogén szervezet megfelelő környezeti feltételek mellett általában a sebekén és a természetes nyílásokon keresztül jut a gazdanövénybe, majd később helyi nekrozisokat, foltosságot, fekélyes sebeket, hervadást, varasodást, illetve a növény pusztulását idézhetik elő. Közvetítő szerepet tölthetnek be a rovarok, méhek, a víz, a szél és maga az ember is. Növénykórtani szempontból a legfontosabb károsítók közé tartoznak az egyes *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* és *Agrobacterium* fajok. A védekezésben segíthet a párás mikroklíma kerülése, a művelőeszközök gondos fertőtlenítése és a vetőmagvak szigorú ellenőrzése. Sok helyen alkalmaznak megelőző permetezést réztartalmú szerekkel. Az antibiotikumok széleskörű felhasználása leginkább a Japán növényvédelemre jellemző. Az Egyesült Államokban szintén „puhább” a szabályozás, több esetben megengedett a növényvédelmi célú hasznosítás [Stockwell, V. O., 2012]. Európában és Magyarországon az antibiotikumok ilyen jellegű alkalmazásának a megítélése sokkal szigorúbb. Ennek okai elsősorban a humán-egészségügyi szempontok, valamint az antibiotikum rezisztencia kialakulásának veszélye.

1.2.1. *Erwinia amylovora*

A bakteriális eredetű fertőzések jelentős mértékben csökkentik a gyümölcstermő növények produktivitását szerte a világon. A Rosaceae családba tartozó fajok – mint a körte és az almafélék – legrégebbi és egyben legveszélyesebb betegsége a tűzelhalás, amit az *Erwinia amylovora* okoz. A kórokozó feltűnését először New York államban dokumentálták, ahol egy körteültetvényben jelent meg 1780-ban. Ezután főként szaporítóanyag segítségével terjedt át Észak-Amerikából a többi kontinensre. Magyarországon a baktérium megjelenése 1995-re tehető [Hevesi, M., 1996]. Napjainkban már szinte az összes európai ország érintett a betegség által. Az *Erwinia* nemzetség, illetve az *E. amylovora* faj megjelölés Winslow (1920) nevéhez köthető [van der Zwet, T., 1995].

Az *Erwinia amylovora* az Enterobacteriaceae családba tartozó Gram-negatív baktérium. Peritrich flagellákkal rendelkezik, sejtmérete pedig 1,0-2,5 µm x 0,8-1,2 µm (1.1. ábra). Fakultatív anaerob, a glükózt aerob és anaerob körülmények között is képes lebontani.

Emellett rendelkezik egy pEA29 nevű plazmiddal, melynek a patogenitásban van szerepe [Goodman, R. N., 1991].



1.1. ábra: Az *E. amylovora* baktérium 1:25000 nagyításban [Goodman, R. N., 1991]

1.2.1.1. A kórokozó fejlődésmenete és a betegség tünetei

A betegség kialakulását vizsgálva elsődleges és másodlagos fertőzési ciklusok állapíthatók meg [van der Zwet, T., 1979].

Elsődleges fertőzés esetén, a fa felületén epifiton formában, vagy a rügypikkelyek alatt élő baktériumok nagy része a tél folyamán elpusztul. Viszont a fekélyes sebekben a baktériumok át tudnak telelni, tavasszal pedig ismét szaporodásnak indulnak. A nedvkeringés beindulásával az életben maradt baktériumtömeg baktériumnyálka formájában a felszínre tör. A kórokozó a virágok szöveteibe azok természetes nyílásain (bibe, nektáriumkiválasztó nyílások, csészelevelek légrései, portok természetes nyílása) keresztül juthat be. A baktériumsejtek természetes úton a rovarok, madarak, eső és a szél útján, emberek közvetítésével főként metszés által terjednek a gazdanövény környezetében és az ültetvényben, majd kerülnek a virágra. Az első tünetek általában a fertőzés bekövetkezése után 2-4 hét elteltével jelennek meg. A kórokozó először a sejtközzöti járatokban szaporodik, majd a virágzatból a virágkocsányon át a vesszőkbe és az ágakba hatol. Itt a szövetek fogékonysága és az időjárás függvényében halad előre, majd végül kialakulnak a betegségre jellemző fekélyes sebek.

Másodlagos fertőzésről akkor beszélünk, ha az elsődleges fertőzés során létrejövő inokulum mennyiség az időjárási körülmények, valamint a fenológiai fázis függvényében további fertőzéseket indukál. A másodlagos fertőzések tehát a vegetációs időben bármikor előfordulhatnak. Fertőzési forrás lehet a baktériumnyálka, mely a leveleken, hajtásokon, gyümölcsökön és a nagyobb ágakon képződhet. A megszilárdult nyálkaanyag által

összeragasztott baktériumsejtekből úgynevezett fonalas struktúra is kialakulhat, amely a szél segítségével akár nagyobb távolságokra is eljuthat.

A növekedésben lévő hajtások és a másodvirágzatok különösen érzékenyek másodlagos fertőzésre, amely a természetes nyílásokon és a sebzéseken keresztül is bekövetkezhet. A kórokozó szaporodása az idősebb növényi szövetek felé haladva fokozatosan lelassul. A rákos sebek a fertőzött szövetek elhalása révén alakulnak ki. A baktériumtömeg jelentős hányada az éves folyamat végén elpusztul, viszont az életben maradt sejtek tavasszal újabb fertőzési forrásként szolgálhatnak.

Az időjárási tényezők közül az eső tölti be az egyik legfontosabb szerepet a kórokozó terjedésében. A harmat, vagy akár az erős köd és az esőcseppek is lemoshatják a növény felületéről a baktériumnyálkában vagy epifita formában lévő kórokozót a fa egyéb részeire, valamint a szél is továbbbíthatja az inokulumot vízcseppek formájában más gazdanövényekre. Az indirekt hatás abban nyilvánul meg, hogy a permetező eső hatására felhígul a virágzatban a baktérium szaporodását gátló koncentrált nektár, így kedvező közeg alakul ki a kórokozó fejlődéséhez. Az optimális környezeti körülmények a virágzás kezdeti szakaszában, valamint az intenzív hajtásnövekedés időszakában alakulhatnak ki, amikor a napi középhőmérséklet magasabb, mint 18 °C, a relatív páratartalom 70% felett van, a napi csapadék pedig több mint 2,5 mm [Németh, J., 1997].



1.2. ábra: Tűzelhalás tünetei almafán (Fotó: Dr. Böszörményi Erzsébet)

A betegség tünetei a növény szinte minden részét érinthetik. A vegetáció során először a virágfertőzés tünetei jelennek meg, a virágszövet eleinte vízzel átitatott lesz, később elhervad, elszárad és barnás-feketévé válik. A hajtáselhalás tünetei hasonlóak, de a terjedés sebessége sokkal gyorsabb, akár 15-30 cm/nap is lehet. A hajtásokra jellemző a pásztorbotszerű meghajlás. A levél erezete a fertőzéstől bevörösödik, majd megfeketedik, de nem hullik le a hajtásról. A fejlődő gyümölcsök belülről szisztémikusan fertőződnek, a gyümölcsön kívülről megjelennek az exudátum cseppjei, végül a gyümölcs is megfeketedik és mumifikálódik (1.2. ábra). Az ágak alapi részénél alakulnak ki azok a rákos sebek, amelyben a kórokozók képesek áttelelni. A kéreg eltávolítása után a fás részen sokszor tapasztaltak vöröses-barna csíkozottságot. A gyökérnyak és a gyökér érintettsége talán a fertőzés legveszélyesebb helye, hiszen ez gyakran az egész fa pusztulásához vezet [van der Zwet, T., 1979].

1.2.1.2. A védekezés lehetőségei

A tűzelhalás már több mint kétszáz éve ismert betegség, de a megfelelő hatékonyságú védekezés a mai napig problémát okoz. A tapasztalatok alapján kielégítő eredményt csak a különböző védekezési módszerek integrált alkalmazása hozhat, tehát a növény-egészségügyi rendszabályok szigorú betartása, a védőszerrel történő kezelés, valamint a biológiai kezelés és rezisztens fajták előtérbe helyezésének együttes alkalmazása jelenti a hatékony megoldást.

A betegség megelőzése érdekében alapvető feltétel, hogy a szaporítóanyag mentes legyen a fertőzéstől és csak ily módon kerülhessen forgalomba. A fertőzésmentesség biztosításának egyik módszere a 40 °C-on történő hőkezelés 23 órán keresztül [Keck, M., 1990]. A karantén rendszabályok szintén a baktérium terjedését hivatottak megakadályozni. Amennyiben a betegség valahol feltűnik, azt az illetékes hivatalnak kötelező jelenteni és az elrendelt intézkedéseket végrehajtani.

A legrégebbi és alapvető védekezési módszer a növény érintett részeinek eltávolítása, elégetése, nyugalmi időszakban pedig a fekélyes ágak eltávolítása, fertőtlenítése és a sebkezelés. A vágást a látható betegség alatt 40-60 cm-el kell megtenni, hiszen a tünetek nem azonnal jelentkeznek. Sokszor javasolt eltávolítani a másodvirágzásból fejlődő virágokat is, mert ezek megjelenésekor a környezeti feltételek kedvezőbbek a fertőzés számára. Ahhoz, hogy ezek az intézkedések időben megvalósuljanak, az ültetvényeket rendszeresen végig kell járni, főként a virágzás ideje alatt.

Vegyszeres kezeléshez többféle réz készítményt is alkalmaznak a vegetációs időszak végén lemosó folyadékként, de ezek hatásossága nem megfelelő, valamint egyre több nem kívánatos

hatására derül fény napjainkban. A tűzelhalás elleni védekezésben az antibiotikumok használata a legsikeresebb módszer. Az Amerikai Egyesült Államokban streptomycin-t permeteznek a növényekre a virágzás alatt 3-4 alkalommal. Ez a módszer hatékonynak bizonyult és rezisztencia is csak az évi 6 alkalomnál nagyobb számú permetezés esetén alakul ki [Sobiczewski, P., 1997]. Ennek ellenére már 1972-ben azonosítottak streptomycin rezisztens *E. amylovora* törzseket. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) nem ajánlja felhasználását a növényvédelemben, hiszen egy humán gyógyászatban is használt antibiotikumról van szó. Magyarországon és az Európai Unió több országában is korlátozásra került a növényorvosi célú hasznosítása.

Szintén betiltották 2008-ban a Kasumin 2L elnevezésű, 2%-os kasugamycin hatóanyag tartalmú baktérium- és gombaölőszert, viszont szükséghelyzet esetén engedélyhez kötötten felhasználható a virágzási és intenzív hajtásnövekedési időszakban, preventív alkalmazással [NÉBIH, 2014].

Figyelembe véve a jelenleg hatályos jogszabályi háttérrel, valamint a rendelkezésre álló védekezési módszerek hatásosságát, mindenképpen szükség van alternatív megoldások keresésére. Évek óta folynak kutatások antagonista és epifita baktériumokkal. A vizsgált antagonista baktériumnak olyan anyagokat kell előállítania, amely a kórokozóra nézve gátló hatást fejt ki. Az epifita szervezetek még a fertőzés megjelenése előtt kijuttatva felélik a tápanyagforrásokat a kórokozó elől. Az antagonista szervezetekkel történő védekezés határfoka függ az évjárártól és a földrajzi helytől is, mivel az antagonisták fejlődése elsősorban a telelés függvénye. Az antagonista baktériumoknak a kórokozó megjelenése előtt már a sebfelületen és a virágok nektáriumainál kell lennie.

Pseudomonas fluorescens egyes törzsei hatásosnak bizonyultak az *E. amylovora* elleni védekezésben. Az A506-os törzs szabadföldi kísérletben tesztelve csökkentette a tűzelhalás tüneteit az USA-ban [Lindow, S. E., 1996], és Új-Zélandon is [Vanneste, J. L., 2006]. A *P. fluorescens* A506 törzséből kereskedelmi forgalomba hozott terméket is előállítottak Blightban A506® néven. A készítményt az éppen kinyílt virágokra érdemes kipermetezni [Elkins, R.B., 2005].

A *Bacillus subtilis* több törzse szintén hatásosnak bizonyult az *E. amylovora* baktériummal szemben. A BD170 'Biopro' (Európa), a QST 713 'Serenade' (USA) és a BSF4 törzs 'Agribiotec' (Olaszország) néven került forgalomba [Edgecomb, D.W., 2006; Werner, N. A., 2006].

A *Pantoea agglomerans* egy specifikusan ható antibiotikumot termel [Vanneste, J. L., 1996; Johnson, K. B., 1998; Özaktan, H., 2006]. Több törzsét is hatékonynak találták *E.*

amylovora ellen, melyek közül a P10c kereskedelmi forgalomba is került, Olaszországban PomaVita™, Új-Zélandon BossomBless™ néven [Vanneste, J. L., 2006].

A Magyarországon izolált *P. agglomerans* HIP 32-es törzs *in vitro* kísérletben erős gátló hatást fejtett ki *E. amylovora* ellen [Hevesi, M., 2006]. Több *Photorhabdus* és *Xenorhabdus* faj erős antibakteriális hatásáról szintén beszámoltak korábban a szakirodalomban [Böszörményi, E., 2009].

Bizonyos élesztőgomba fajok (*Aureobasidium pullulans*, *Candida sake*, *Metschnikowia pulcherrima*) törzsei is hatásosnak bizonyultak a baktérium elleni védekezésben *in vitro* és szabadföldi kísérletekben [Seibold, A., 2004]. Magyarországon ideiglenes felhasználási engedélyt kapott egy osztrák cég (Bio ferm) által gyártott új biológiai növényvédőszer (Blossom Protect), amely az *Aureobasidium pullulans* élesztőfaj két törzsét tartalmazza. A virágokon felszaporodva képesek meggátolni a fertőzés bejutását a nektáriumba. [Hevesi, M., 2009; László, Gy., 2009].

A bakteriofágok felhasználási lehetőségét használta ki Magyarországon az Enviroinvest Zrt., Erwiphage nevű készítményük 2013. március 15. óta kapható *E. amylovora* ellen. Fágterápiás kezelés mellett a réz-tartalmú készítmények mellőzése szükséges, mivel a bakteriofágok inaktiválódásához vezethet. Mindemellett az UV sugárzás is csökkenti a szer hatékonyságát, így a permetezése napnyugta után javasolt [Enviroinvest].

A védekezési módszerek közé sorolhatók a különféle időjárás-előrejelzésen alapuló rendszerek is. Tekintve, hogy a vegetációs időszakban alkalmazott növényvédőszeres kezelések hatékonysága nagymértékben függ a permetezések időzítésétől, megfelelő hatása csak az időben, megelőző jelleggel alkalmazott kezeléseknak van. Ezért fontos, hogy előre jelezhető legyen a kórokozó optimális környezeti feltételeinek bekövetkezése. A jelenleg alkalmazott modellek közül Európában a Billing-féle (Firescreens) rendszerek, míg az USA-ban a Maryblyt rendszer terjedt el leginkább. Az előrejelzések segítségével csökkenthető a felesleges permetezések száma [Sobiczewski, P., 1997].

Mindemellett a tűzelhalás rezisztenciát célzó nemesítési programok is nagy múltra tekintenek vissza. A világ számos kutatóintézetében folynak a toleráns fajták keresését, valamint kevésbé fogékony, új nemesítésű fajták létrehozását célzó kísérletek (U.S. Department of Agriculture (Kearneysville, USA), Institut National de la Recherche (Angers, Franciaország), Università di Bologna (Bolognai Egyetem), East Malling Research Centre (Anglia), Julius Kühn-Institut (Drezda-Pillnitz, Németország), Crop Research Institute (Prága-Ruzyne, Csehország), Fruit Research Station (Voinesti, Románia)). Magyarországon a 2000-es évek eleje óta folynak *E. amylovora*-val szemben ellenálló növények nemesítésére irányuló

kutatások. A Szent István Egyetem Kertészettudományi Karán a Kárpát-medencében őshonos fajták vizsgálatában, a toleránsnak bizonyuló fajták génkészletének tanulmányozásában érték el jelentős eredményeket [Tóth, M., 2013]. Ennek ellenére a gyakorlatban termesztett ellenálló fajták száma még napjainkban is elenyésző.

1.2.2. *Ralstonia solanacearum*

A *Ralstonia solanacearum* okozta baktériumos hervadást és barna rothadást a legfontosabb bakteriális betegségek között tartják számon világszerte. Több mezőgazdasági haszonnövény - burgonya, paradicsom, paprika és dohány - is szerepel célszervezetei között. Összességében mintegy 200 gazdanövény faja ismeretes [Hayward, A.C., 1991]. A *Ralstonia solanacearum* Európa-szerte a karantén-kórokozók listáján szerepel.

A kórokozó elsősorban a trópusi és szubtrópusi területeken elterjedt. Európában a Földközi-tenger medencéjének keleti felében, valamint a Fekete-tenger térségében fordul elő tömegesen, de jelen van Magyarországon, és néhány Nyugat-Európai államban is. Forró, csapadéokban szegény nyarakon sokszor csak tünetmentes formában jelentkezik.

A kórokozó gazdanövényekre specializálódott változatait rasszokba lehet sorolni, amelyekből jelenleg hatot különböztetünk meg. Hayward a *R. solanacearum* izolátumokat biokémiai tulajdonságaik alapján 5 különböző biovariánsként kategorizálta [Hayward, A.C., 1994]. A főként a burgonyát megbetegítő 3-as rassz (Hayward rendszerében a 2. biovariáns) a viszonylag hűvösebb éghajlatú Észak- és Nyugat-Európában is meg tudott telepedni az utóbbi évtizedek tapasztalatai alapján.

Magyarországon először 2000-ben mutatták ki a növénypatogén baktériumot kisárutermelői étkezési burgonya állományokban. A következő két évben a hazai előállítású vetőgumó tételekben látens gumófertőzöttséget észleltek. A kórokozó miatt bekövetkezett termésvesztéset Rakamazon 50 %-ra, Jászberényben 5-25 %-ra becsülték a 2000. évben [Németh, J., 2002].

1.2.2.1. A kórokozó fejlődésmenete és a betegség tünetei

A baktérium a fertőzött gumóból, vagy a talajból a sérült gyökereken, szárasebzéseken jut be, de a gázcsere-nyílásokon keresztül is behatolhat, majd a növény edénynyaláb-rendszerébe jut. A patogén sejtsűrűsége ezután növekszik, virulencia gének expresszálódnak, sejtburjánzás

jön létre, ezt követi exopoliszacharidok és pektinbontó enzimek kiválasztása, s végül a gazdanövény pusztulása [Clough, S., 1997; Saile, E., 1997].

A baktérium képes áttelelni az elhalt növényi törmeléken, a megfertőzött élő növényeken, vad gazdanövényeken, gyomokon vagy gumós növényeken is [Elphinstone, J.G., 2005]. Túlél hosszú időn keresztül akár tiszta vízben (több mint 40 évig, 20-25 °C hőmérsékleten) és a populáció mérete csak extrém környezeti körülmények között csökken (hőmérséklet, pH, sók, stb.). Meleg időjárásban sem pusztulnak el, az optimálisnál magasabb hőmérsékleten olyan állapotba kerülhetnek, amelyben életképesek, de nem tenyészthetők [Coutinho, T. A., 2005]. Természetes körülmények között a meleg időjárás (24-35 °C), a magas talajnedvesség, a nedves vagy esős periódusok kedveznek a kórokozó terjedésének és a betegség fejlődésének.



1.3. ábra: Burgonya barna rothadás betegségének tünetei [Champoiseau, P. G., 2009]

A *R. solanacearum* fertőzése során eleinte egy általános, ritkán csak részleges hervadás észlelhető a gazdanövényeken, majd a kórfolyamat előrehaladásával a hervadás kiterjed az egész bokorra (1.3. ábra). A tartósan részleges hervadás sokkal jellemzőbb az úgynevezett északi baktériumos hervadás betegségre, amelyet egy másik, hidegkedvelő baktérium okoz (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*). A barna rothadás esetében a gumókat és a szárazakat elvágva az edénynyalábokban gyűrű alakú, sötétbarna vagy ritkábban halványbarna színű elváltozás észlelhető, amelyből már enyhe nyomásra is krémszínű, barna nyálkacseppek törnek a felszínre. Ez a tünet-együttes a baktériumos barna rothadás ismertetőjele.

A hasonló tüneteket okozó baktériumos hervadás esetében az exudátum nem barna, hanem opálos fehér árnyalatú. A beteg növény gyökereit általában még száraz talajban is vastagon beborítják a talaj szemcsék, melyek a kivált nyálkába ragadnak bele. A növények hervadása egyéb okokra is visszavezethető (aszály, egyes talajgombák, fonálférgek), azonban csak baktériumos megbetegedés esetén észlelhető nyálkakiválás, valamint csak a baktériumos barna rothadás kórokozójának exudátuma barna színű.

Terjedésében a legfontosabb szerepet a fertőzött gumó tölti be, de gyakori a növények öntözővíz útján történő fertőződése, valamint fonálférgek is terjeszthetik a kórokozót. A baktérium köztes gazdanövényei, ez által a betegség gócpontjai lehetnek egyes gyomnövény fajok, amelyek gyökérzónájában a *R. solanacearum* tünetek előidézése nélkül fennmarad. Az árvakelés szintén infekciós forrásként szolgálhat. A kórokozó az állományon belül általában lassan és korlátozottan terjed, de optimális esetben egy beteg töről akár 5-5 szomszédos növény is megfertőződhet a gyökérzetten keresztül [Németh, J., 2002].

1.2.2.2. A védekezés lehetőségei

A védekezésben a legnagyobb kihívást a patogén előfordulásának változatossága jelenti. A *R. solanacearum* képes növekedni a gazdanövény szöveteiben, mindazonáltal túlél a földben és szállítódik a vízzel, valamint a gyomokkal, egyéb növényi szervezetekkel is kapcsolatba kerül [He, K., 2014]. Hatékony vegyszeres védekezés nem ismert a betegség ellen, ezért jelenleg csupán a megelőző intézkedések szigorú betartásával lehet csökkenteni a fertőződés kockázatát.

Általánosságban elmondható, hogy az alacsony szárazanyag tartalmú burgonya fajták sokkalta fogékonyabbak a barna rothadásra. A sérüléseket (repedés), vagy lokális keményítőhiányt (üvegesedés, ikernövés) eredményező élettani elváltozásokra való hajlam szintén nagymértékben megnövelheti a *R. solanacearum* fertőzésének kockázatát is. A megfelelő tápanyagellátás biztosításával, elegendő kálium tartalom mellett és felesleges nitrogén nélkül a laza, fertőződésre fogékony növényi szövetek kialakulása elkerülhető. 4-5 éves vetésváltás megfelelő higiéniával párosítva szintén hatékony eszköz lehet a betegség megelőzésében [Németh, J., 2002].

Az államilag ellenőrzött, fémzárolt vetőgumó vásárlása bizonyos fokú védelmet jelent a termelők számára, hiszen az állam garanciát vállal a kórokozótól való mentességre. A manapság a gyakorlatban alkalmazott laboratóriumi ellenőrző módszerrel azonban nem szűrhetőek ki biztonságosan az alacsony fertőzőtségű tételek, ezért a kórokozó

behurcolásának, hazai terjedésének valószínűsége az alapos ellenőrzések ellenére is reális veszély. A kórokozóval szemben megfelelő mértékben toleráns fajták nem ismeretesek, rezisztens haszonnövények tehát nem állnak a termelők rendelkezésére.

Ha a betegség már jelen van a táblán, az öntözés abbahagyásával és a minél korábbi betakarítással lehet minimalizálni a termésvesztést, bár ebben az esetben a termés csak korlátozottan, a nemzeti növényegészségügyi hatóságok előírásainak megfelelően használható fel. Magyarországon jelenleg a kormányhivatal Növény-és Talajvédelmi Igazgatósága látja el a hatósági feladatokat, amely a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) szakmai irányítása alatt áll. Karantén intézkedések elrendelése esetén a fertőzött táblát zárlat alá helyezik, azon a területen a burgonya és más gazdanövények termesztését általában több éves időtartamra megtiltják. Az elrendelt intézkedések betartását szigorúan ellenőrzik. A növényegészségügyi zárlat megtörése esetén büntető eljárást kezdeményeznek, amelyet a területileg illetékes ügyészség folytat le [7/2001. FVM rendelet].

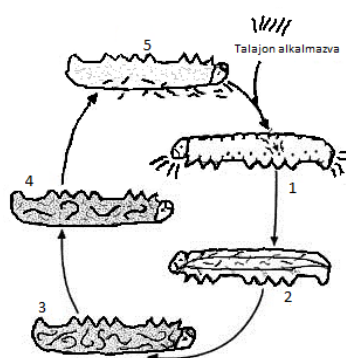
1.3. *Entomopatogén nematoda / baktérium szimbiotikus rendszerek*

A vizsgálat tárgyát képező entomopatogén baktériumok (EPB) a természetes környezetben egy három résztvevős rendszer tagjai. Az EPB baktériumok az entomopatogén nematodák (EPN) bélcsöveiben, azokkal obligát szimbiózisban élnek [Thomas, G. M., 1979]. A gazdaszervezetként funkcionáló egyes rovar fajokra nézve a baktérium patogén és a fonálféreg által termelt proteázok is gátolják a rovar immunműködését, így a rovar és az EPN-EPB komplex gazda-parazita kapcsolatként írható le.

A fonálféreg a rovar testüregébe jutva, garatján keresztül kijuttatja a szimbionta baktériumokat. A baktériumok virulencia-faktorai, valamint toxin- és enzimtermelése biztosítja a rovar immunrendszerének blokkolását, majd elpusztítását és lebontásának megkezdését. A baktériumok másik fontos szerepe, hogy az általuk termelt antimikrobiális vegyületek monoxenikus viszonyokat hoznak létre a rovar tetemen belül, tehát megakadályozzák más mikroorganizmusok bejutását az elpusztult gazdaszervezetbe. Az entomopatogén baktériumok ez által rendelkeznek egy olyan kémiai arzenállal, melyet a természet alkotott meg az evolúció folyamán annak céljából, hogy antagonista hatást érhesse el más mikroorganizmusokkal szemben, és ezzel előnyhöz juttassák a magasabb szinten szerveződött szimbionta partnerüket.

Optimális körülmények között az EPN zavartalanul, több generáción át is szaporodhat a baktériumokkal táplálkozva. Egyetlen rovartetemben rendszerint két fonálféreg nemzedék képes kifejlődni, mivel a táplálkozni kezdő dauerlárvák 24 órán belül átalakulnak felnőtt egyedekké (1.4. ábra). Végezetül a rovarlárva és a fonálféreg függvényében 10-40000 fertőzőképes dauerlárva hagyja el a tetemet, hogy új gazdaállatot keressen [Lakatos, T., 2004].

Ebben a folyamatban az EPB életciklusa két szakaszra osztható: nyugalmi szakasz az EPN bélcsöveiben élve és szaporodva, valamint a vegetatív szakasz, amely a kiszabadulás utáni ciklust jelöli.

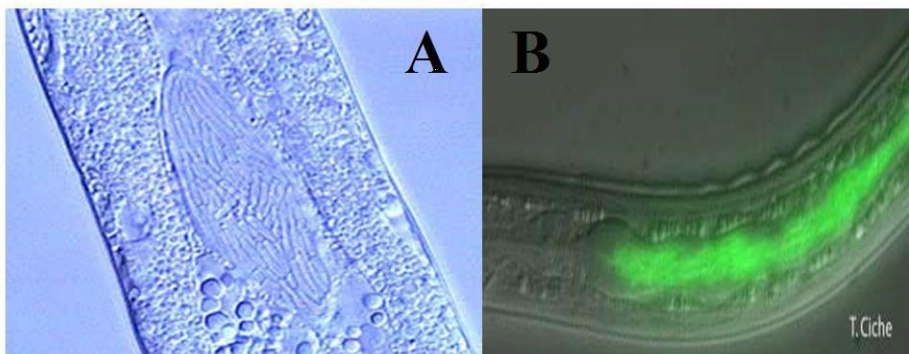


1.4. ábra: Rovarpatogén nematodák életciklusa [Barbercheck, M. E., 2004]

(1. Infektív dauerlárvák (IJ) a talajban a rovar testnyílásain keresztül behatolnak; 2. Bejutnak a rovar testüregeibe; 3. Felnőtt egyedekké fejlődnek; 4. Szaporodnak, miközben új nemzedék jön létre; 5. Infektív dauerlárvák (IJ) elhagyják a rovartetemet és új gazdaállatot keresnek.)

A nematoda és a baktériumok együttműködése tehát mindkét fél számára kölcsönösen pozitív. A baktérium okozza a rovar pusztulását, tápanyagként szolgál a fonálféreg szaporodásához és növekedéséhez, valamint antimikrobiális hatású anyagainak termelésével megakadályozza más organizmusok hozzáférését a rovartetemhez. A fonálféreg védi a külső hatásoktól a szimbiota baktériumokat és vektorként segíti a rovarba való bejutást [Lengyel, K., 2007; Böszörményi, E., 2010].

A fonálféreg/baktérium szimbiotikus asszociációk kizárólag a *Steinernema/Xenorhabdus* illetve *Heterorhabditis/Photorhabdus* kapcsolatban léteznek [Boemare, N. E., 1993]. A szimbiotikus kapcsolat mindkét oldalról genetikailag meghatározott, így ez a szimbiózis szigorúan faj-specifikus. A fonálféreg/baktérium szimbiotikus kapcsolat az alábbi ábrán szereplő felvételek segítségével szemléltethető (1.5. ábra).



**1.5. ábra: (A) *X. nematophila* sejtek *S. carpocapsae* IJ bélcső vezikulumában.
(B) *P. luminescens* sejtek *H. bacteriophora* IJ középbelének elülső szakaszán.
[Ciche, T., 2007]**

A fonálférgek biológiai növényvédelemben történő felhasználhatóságának és szerepének felfedezése az 1980-as évekig váratott magára, hiszen ekkor jöttek rá, hogy széles körű földrajzi elterjedésüknek köszönhetően a biológiai növényvédelem természetesen felhasználható eszközei lehetnek a világ minden táján [Kaya, H. K., 1993]. Ezeknek az élőlényeknek hazánkban őshonos fajai is ismertek, tehát adott környezeti tényezőkhöz igazított alkalmazásuk Magyarországon is lehetséges. Emellett fontos tulajdonság, hogy melegvérű állatokra és az emberre gyakorolt negatív hatásai nem ismeretesek, valamint rovarkártevő tulajdonságukat is szelektíven, adott fajokra hatva fejtik ki. A hagyományos növényvédelemben alkalmazott szerekkel szembeni nagy előnyük, hogy alkalmazásuk során ellenük rezisztencia kialakulásával nem kell számolni.

Az EPN-EPB komplexek gyakorlati alkalmazásának egyik legnagyobb hátránya, hogy relatív magas költségekkel érhető el megfelelő védetség egy adott területen a jellemző rovarkártevővel szemben. Főként az eljárás fajlagosan drága felhasználása okozza azt a tényt, hogy a korábbi évtizedekben csupán speciális alkalmazási területeken és csekély volumenben történt meg a különféle nematoda-baktérium készítmények biológiai növényvédelemben való hasznosítása.

Az ipari megvalósítás kezdeti fázisában párhuzamosan több egyetemen is folytak az infektív dauerlárva nagy mennyiségben történő termelését célzó kutatások Ausztrália, az Egyesült Államok és Európa intézményeiben is. Ebben az időszakban a University of Kiel munkacsoportja Dr. Ralf-Udo Ehlers vezetésével elsőként megvalósította a nematodák tenyésztését bioreaktorban [Ehlers, R. U., 2001]. A későbbi években intenzív kutatás eredményeként sikerült fejleszteni a folyadékban történő tenyésztési technológiát. Ezek a sikerek vezettek 1997-ben a német e-nema GmbH nevű cég alapításához, amely jelenleg is az egyik legnagyobb rovarpatogén nematoda készítmények gyártásával foglalkozó piaci szereplő

[e-nema]. Az alábbi táblázatban néhány e-nema termék gyakorlati felhasználása esetén várható jellemző költségek kerülnek bemutatásra (1.1. táblázat).

1.1. táblázat: e-nema készítmények esetén a felhasználás jellemzői [Fodor, A., 2011]

EPN készítmény	Alkalmazási terület	Költségek (€/ha)	IJ dauerlárva / ha
nema-green®	golf pálya	2000	5×10^9
nemycel®	gombafarm	800	20×10^9
nemapom®	házi kert	500-1000	$1,5 \times 10^9$

A rovarkártevő fonálféreg/baktérium szimbiotikus komplexek gyakorlati alkalmazásának környezeti hatásokkal szembeni ellenálló képességük, illetve érzékenyséjük is határt szab. Ezek a rendszerek viszonylag alacsony UV- és szárazságtűréssel rendelkeznek [Mukuka, J., 2010]. Emiatt alkalmazásuk szélesebb körben történő elterjesztésének az ezen a területen történő fejlesztésük adhat lehetőséget. Fodor és munkatársai [Fodor, A., 1990] munkájukban erre vonatkozóan a genetikai módosítás lehetőségét dolgozták ki egy, a *C. elegans* faj esetében korábban sikeresen alkalmazott módszer alapján. A jövőben ez az elképzelés képezheti az ezen a területen folyó kutatások egyik elsődleges alapját és irányvonalát.

1.3.1. Entomopatogén fonálféreg (EPN)

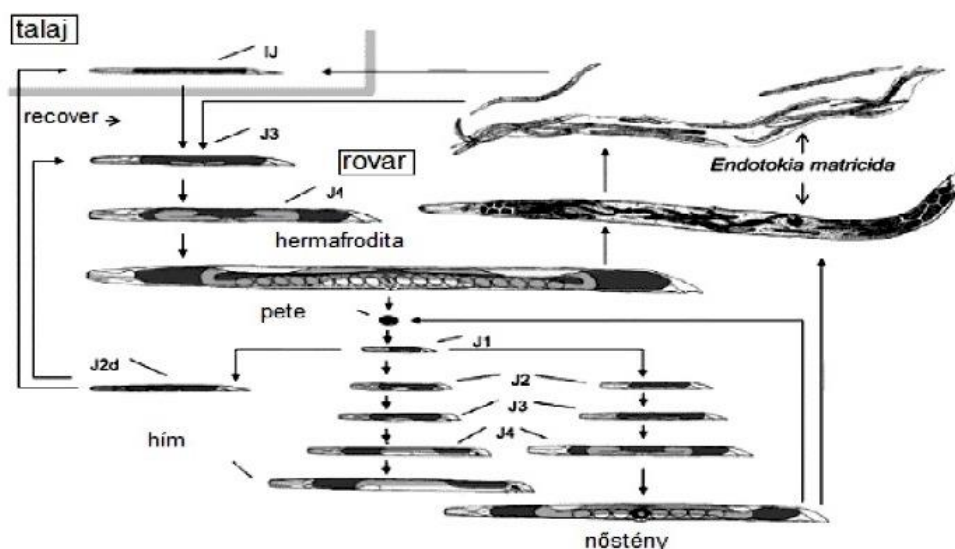
Az entomopatogén fonálféreg a különböző talajok komplexitásának ellenére az egész világon előfordulnak, mindenhol azonosították már őket, előfordulásukat leginkább a rendelkezésre álló célszervezet befolyásolja [Lucskai, A., 2004]. Az entomopatogén nematodák rendszertani besorolása az alábbi táblázatban látható (1.2. táblázat).

1.2. táblázat: Entomopatogén nematodák rendszertani besorolása [Lucskai, A., 2004]

törzs	Nematoda		
osztály	Secernentea		
rend	Rhabditida		
alrend	Rhabditina		
főcsalád	Rhabditoidea		
család	Steinernematidae	Heterorhabditidae	
nemzetség	<i>Steinernema</i>	<i>Neosteinerinema</i>	<i>Heterorhabditis</i>

A *Heterorhabditis* és a *Steinernema* nemzetségbe tartozó fajok morfológiai és fiziológiai szempontból is sok hasonlóságot mutatnak, a vizsgálatok mégis azt bizonyítják, hogy ez csak a konvergens evolúció következménye, fejlődésük független egymástól [Baxter, M. L., 1998].

Az EPN-ek posztembrionális fejlődési alakjai közül csak a dauer lárvával (IJ) találkozhatunk a talajban, ez a fertőző lárvá jut a rovargazdába, ahol petéit lerakva azok négy lárvá stádiumon keresztül fejlődnek (J1-J4). Az IJ lárvák töltik be a vektor szerepét a gazdaszervezet megtámadása során. Miközben a rovar testüregébe juttatják a rovarpatogén baktériumokat, J4 állapotba kerülnek. A dauer lárvá nem táplálkozik, bélsőveiben pedig kizárólag a szimbionta baktériumai vannak jelen. A kapcsolatban résztvevő élőlények között egy olyan jel-kapcsolat működik, amely a természetben egyedülálló módon képes befolyással lenni a baktériumok osztódására, szükséges esetben a proliferáció leállítását is elő tudja idézni.



1.6. ábra: *Heterorhabditis* fajok életciklusa [Lengyel, K., 2007]

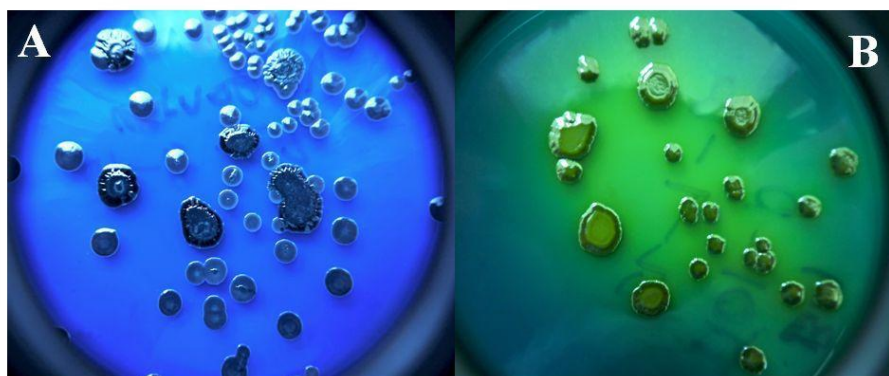
Heterorhabditis dauer lárvá a rovarba jutva önmegtermékenyítésre képes hímnőssé alakul. A hermafrodita petéinek egy része testében kel ki és IJ lárvává válik, a lerakott petékből pedig váltivarú és hímnős fonálférgek fejlődnek különböző arányban. Az ivar kialakulását és az egyedek közötti megoszlást a környezeti tényezők is befolyásolhatják [Strauch, O., 1994; Johnigk, S. A., 1999]. Bizonyos kémiai szignál koncentráció-emelkedésének hatására a morfológiailag elkülöníthető J1 lárvák egy része képes infektív dauer lárvává alakulni (1.6. ábra). A hermafroditákra és a nőstényekre egyaránt jellemző, hogy nem rakják le az összes petéjüket, hanem egy részüket visszatartják testükben. Az úgynevezett 'endotokia matricida' egyedek esetében a lárvák az anya testében kelnek ki, majd általában dauerlárvává alakulnak.

A *Steinernema* fajok dauerlárváiból nagy általánosságban csak hím és nőstény egyedek alakulnak ki, néhány esetben fordulhatnak csak elő hermafroditák is [Griffin, C. T., 2000].

1.3.2. Entomopatogén baktériumok (EPB)

Az entomopatogén nematodákból izolálható baktériumok a jelenlegi rendszertani besorolás szerint az Enterobacteriaceae család tagjai és két nemzetség képviselői tartoznak közéjük. Bár riboszóma adatbázisok alapján az Enterobacteriaceae családhoz soroljuk őket, nitrát-reduktáz negatívak, ami a család többi tagjával ellentétben áll.

Szimbiotikus együttműködésük a fonálférgekkel mindkét oldalról genetikailag meghatározott. A *Steinernema* fajokkal a *Xenorhabdus*, a *Heterorhabditis* fajokkal a *Photorhabdus* baktériumok élnek együtt.



1.7. ábra: *Xenorhabdus* (A) és *Photorhabdus* (B) telepek LBTA lemezen [Fodor, A., 2012]

Az első baktériumot, amelyet entomopatogén fonálféregből sikeresen izoláltak, *Achromobacter nematophilus* néven írták le a szakirodalomban. Az új nemzetség jelölésére néhány évvel később a *Xenorhabdus* megnevezést javasolták [Thomas, G. M., 1979]. Eleinte minden egyes EPN bélcsövéből izolált baktériumot a *Xenorhabdus* nemzetségbe soroltak. A *Steinernema* spp. fonálféreg fajok szimbiontái a *X. nematophilus* fajt alkották, míg a *Heterorhabditis* spp. szimbiontái *X. luminescens* fajként kerültek beazonosításra. Az *X. luminescens* elnevezés az egyes törzsek jellegzetes biolumineszcenciára való képességéből származik. 1993-tól *Photorhabdus* néven új nemzetségbe kerültek a korábbi *X. luminescens* faj képviselői [Boemare, N. E., 1993]. A nemzetség szintű elkülönítést többek között DNS-DNS hibridizációs és fenotípusos eredmények is alátámasztották. Szállás Emília és munkatársai publikáltak olyan módszert, amely az úgynevezett „kézjegy-szekvencia”

(signature sequence) alapján működik és a két nemzetség elkülönítésére alkalmazható [Szállás, E., 1997].

1.3.2.1. Xenorhabdus spp.

A *Xenorhabdus* baktériumok sejtjei pálca alakúak, méretük $0,3-2 \times 2-10 \mu\text{m}$. Gram-negatívak, fakultatív anaerobok, spórát nem képeznek. Általában 28°C az optimális növekedési hőmérsékletük. A glükózt gáz termelése nélkül alakítják át savvá. Lipáz és proteáz enzimeket is termelnek. Kataláz negatívak és általában kevés szénhidrátot fermentálnak. Természetes körülmények között csak a *Steinernema* spp. nemzetségbe tartozó entomopatogén nematodák bélcsöveiben találhatók meg. Az 1980-as évek végén izolálták a *X. nematophila*, a *X. poinarii* és *X. bovienii* fajok képviselőit [Akhurst, R. J., 1988]. A 2000-es évek közepén Lengyel Katalin és munkatársai négy új *Xenorhabdus* fajt azonosítottak a különböző országokból gyűjtött nematodákból, 16S rRNS gén szekvencia alapján [Lengyel, K., 2005]. A *Xenorhabdus budapestensis* és a *X. szentirmaii* fajokat a következő években jelentős érdeklődés övezte erős antagonistá hatásuk miatt. Az analitikai vizsgálatok széles spektrumú antimikrobiális hatással rendelkező anyagok változatos csoportjait tárták fel (pl. a fabclavinok), amelyek később hasznosíthatóak lehetnek a növény- és állat-, vagy akár a humán gyógyászatban is [Böszörményi, E., 2009; Fodor, A., 2010; Fuchs, S. W., 2014]. A *X. szentirmaii* saját kísérleteinkben is tanulmányozott törzsének (DSM-16338) genomját 2014-ben szekvenálták [Gualtieri, M., 2014], azóta a típus törzs teljes genomja hozzáférhető adatbázisokban [XenorhabduScope].

1.3.2.2. Photorhabdus spp.

A *Photorhabdus* baktériumok sejtjei pálca alakúak, méretük $0,5-2 \times 1-10 \mu\text{m}$. Gram-negatívak, fakultatív anaerobok, spórát nem képeznek. Mozgékonyosságuk körkörös elhelyezkedésű ostoraiknak köszönhető. Intracelluláris protein kristály keletkezése csak a primer sejtekre jellemző. Biolumineszcenciájuk szabad szemmel is megfigyelhető sötétbe adaptálódva, fénymentes helyiségben. A fénykibocsátás intenzitása törzsenként változó, de a primer sejtek minden esetben több nagyságrenddel erősebb fényt bocsátanak ki, mint a megfelelő szekunder variáns. A nemzetség legismertebb képviselői a *Photorhabdus luminescens* és a *P. temperata*.

1.3. táblázat: Entomopatogén baktérium fajok és szimbionta partnerük

EPB	EPN
<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>
<i>X. bovienii</i>	<i>S. feltiae</i>
<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>
<i>X. budapestensis</i>	<i>S. bicornutum</i>
<i>X. szentirmaii</i>	<i>S. rarum</i>
<i>P. luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>
<i>P. temperata</i>	<i>H. megidis</i>

Az EPB fajok általános jellemzője a „fázis-váltás”, azonban a szó eredeti értelmétől eltérve itt egy irreverzibilis folyamatról beszélhetünk, ahol a primer variáns genetikai változás kísérete nélkül ismeretlen okok miatt alakul véglegesen szekunder variánssá. A folyamatban több gén kifejeződése is gátlás alá kerül, melynek hatására megváltozik az enzim-profil, a sejtek festékkötő-képessége, a telepek morfológiája és motilitása, valamint leáll az antimikrobiális anyagok termelése is [Böszörményi, E., 2010; Boemare, N. E., 1997]. A szekunder variáns ez által a szimbiotikus kapcsolat kiépítésére sem képes, tápforrásként nem hasznosíthatóak a nematodák számára [Ehlers, R. U., 1990].

Az EPN-EPB szimbiózisban a primer variánsnak van központi szerepe, részben ez szolgál a nematoda táplálékául, részben pedig csak ez a variáns képes antibiotikus hatással rendelkező komponensek termelésére. A szekunder variáns ökológiai szerepét még nem ismerjük, a természetben izolált fonálférgekből még nem azonosították. A spontán fázisváltás a törzsek fenntartása során következhet be [Lucskai, A., 2004; Fodor, A., 2012].

1.4. EPB-k által termelt biológiailag aktív anyagok

Az entomopatogén nematodák szimbionta baktériumairól már az 1950-es évek végén feltételezték, hogy antimikrobiális hatású anyagok termelésére képesek [Dutky, S. R., 1959], azonban az „antibiotikumok fénykorában” még viszonylag csekély kutatói érdeklődés övezte a felfedezést. Az első antibakteriális hatású vegyületeket 1981-ben izolálták [Paul, W. J., 1981], napjainkban viszont már több mint negyven különböző biológiailag aktív szekunder metabolitot azonosítottak *Xenorhabdus* és *Photorhabdus* tenyészetekből. A metabolitok többsége széles spektrumú bioaktivitással rendelkezik, a *Xenorhabdus* fajok által termelt anyagokról megállapítható, hogy sokkal diverzebbek. Akhurst Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok ellen is sikeresen tesztelte a másodlagos anyagcseretermékek hatását. Az EPB-k

1.8. ábra: *Xenorhabdus* törzsek antimikrobiális anyagcseretermékei [Bode, H. B., 2009]



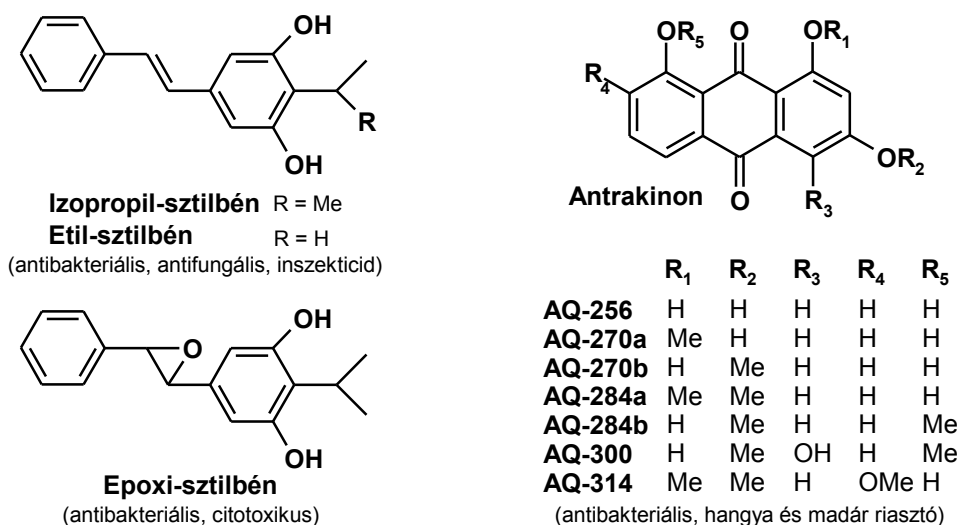
A *Xenorhabdus nematophila* és *X. bovienii* genomok szekvenálása már a 2000-es években megtörtént, és azonosítottak is néhány olyan génklasztert, amelyek szerepet játszanak a másodlagos anyagcseretermékek bioszintézisében. A szakirodalomban leírt komponensek között előfordulnak kis molekulasúlyúak, mint az iodinine [Fodor, A., 2008], a benzilidénaceton [Ji, D., 2004], a fenil-etil-amidok és indol származékok [Li, J., 1995a; McInerney, B. V., 1991a], de létezik néhány összetettebb szerkezetű metabolit is, mint a xenorhabdinok és xenorxide-ok [Li, J., 1998], valamint a xenocoumacin-ok [McInerney, B. V., 1991b]. A xenematide és a xenortide-ok voltak az első peptidek, amelyeket *X. nematophila* baktériumból azonosítottak [Lang, K., 2008]. Hatásmechanizmusokat tekintve az indol származékok (pl. a nematophin) és a xenorhabdinok az RNS- és fehérjeszintézist gátolják. A különféle *Xenorhabdus* törzsek sejtkultúráiból izolált szekunder metabolitokat az alábbi táblázat foglalja össze (1.4. táblázat).

1.4. táblázat: *Xenorhabdus* törzsekből nyert szekunder metabolitok

Évszám	Hatóanyag	EPB forrás	Szerzők
1991.	xenorhabdin és xenocoumacin	<i>X. nematophila</i>	McInerney <i>et al.</i>
1997.	nematophin	<i>X. nematophila</i>	Li <i>et al.</i>
1998.	xenorxide	<i>X. bovienii</i>	Li <i>et al.</i>
2002.	xenomin	<i>X. bovienii</i>	Webster <i>et al.</i>
2008.	xenortide és xenematide	<i>X. nematophila</i>	Lang <i>et al.</i>
2008.	iodinine	<i>X. szentirmaii</i>	Fodor <i>et al.</i>
2009.	ciklolipopeptidek (PAX molekulák)	<i>X. nematophila</i>	Gualtieri <i>et al.</i>
2009.	bicornutin-A	<i>X. budapestensis</i>	Böszörményi <i>et al.</i>
2012.	GP-19 és EP-20	<i>X. budapestensis</i>	Xiao <i>et al.</i>
2014.	fabclavinok	<i>X. budapestensis</i> és <i>X. szentirmaii</i>	Fuchs <i>et al.</i>

Photorhabdus baktériumok tenyészeiből hidroxisztilbéneket és különböző antrakinon származékokat sikerült kimutatni (1.9. ábra), amelyek rendelkeznek antimikrobiális hatással [Li, J., 1995b]. A *Photorhabdus* genomszekvencia értelmezése során több génről is feltételezték, hogy szerepet játszhatnak az antibiotikumok termelésében [Duchaud, E., 2003].

20 lókuszon összesen 33 gént említenek a szerzők, amelyek egy része már azonosított antibiotikum szintetázokkal mutat homológiát, illetve peptid szintéziséért felelős.



1.9. ábra: *Photorhabdus* törzsek antimikrobiális anyagcseretermékei [Bode, H. B., 2009]

A kísérletek más-más eredményt mutattak a bioaktív anyagok mennyiségében és összetételében is, eltérő törzseket vizsgálva [Hu, K., 2000; Webster, J. M., 2002]. Az *in vitro* antibiotikum termelés befolyásolható a táptalaj összetételének, a hőmérséklet és a levegőztetés mértékének változtatásával is. Mivel a folyamat során spontán bekövetkező fázisváltás után keletkező szekunder sejtek antibiotikum termelése leáll, vagy minimális szintre csökken, a laboratóriumban termelt antibiotikum maximális mennyisége igen változó lehet.

1.4.1. Antimikrobiális peptidek

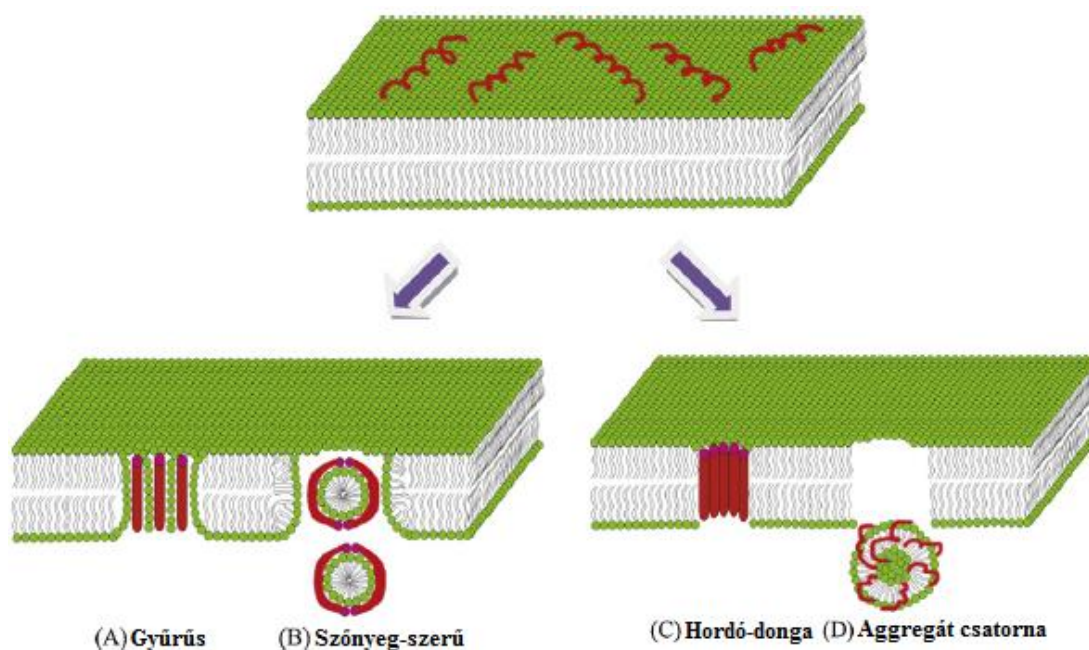
Az antimikrobiális peptidek (AMP) a legtöbb élőlény természetes védekező rendszerének részei a patogén kórokozók elleni küzdelemben. Számtalan előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, ilyen a termikus stabilitásuk és a viszonylag kis molekulásúlyuk (<10 kDa). Széles spektrumú antibiotikus aktivitásuk a mikroorganizmusok változatos körében fejti ki hatását, így alkalmasak Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, élesztők, gombák, vírusok és protozoonok elleni védekezésre is. Az elmúlt két évtizedben számos élőlényből izoláltak antimikrobiális peptideket, többek között gerincesekből, gerinctelenekből, növényekből, gombákból és baktériumokból [Reddy, K. V. R., 2004].

NMR spektroszkópia segítségével végzett strukturális vizsgálatok alapján az antimikrobiális peptideket 5 nagy csoportba osztották [Reddy, K. V. R., 2004]:

- α -hélix struktúrákat alkotó peptidek,
- cisztein-származékokban gazdag peptidek,
- β -redő struktúrákat alkotó peptidek,
- reguláris aminosavakban gazdag peptidek (arginin, prolin, hisztatin),
- ritka és módosult aminosavakból álló peptidek.

Legfontosabb tulajdonságuk, hogy nehezen alakul ki ellenük rezisztencia [Hastings, P., 2004]. Ennek köszönhetően sikeresen alkalmazhatóak lehetnek a gyógyszerészetben, az integrált növényvédelemben és más területeken is.

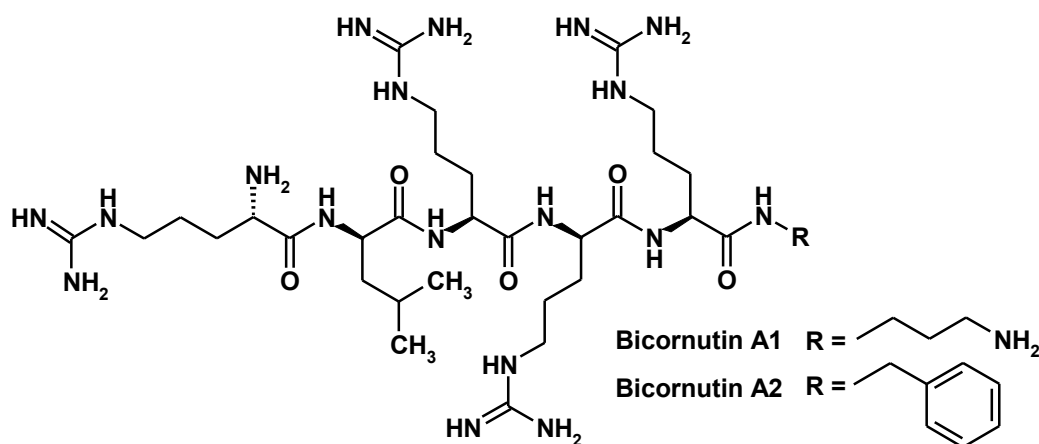
Bár az antimikrobiális peptidek hatásmechanizmusa továbbra sem ismert pontosan, a különböző vélemények megegyeznek abban, hogy szelektíven szakítják fel a sejthártyát, ami a sejt líziséhez vezet. A peptidek amfipatikus tulajdonsága fontos szerepet játszik a folyamatban. Az AMP molekulával történő kölcsönhatás átmeneti pórusok, nyílások képződését is előidézhetheti a sejtmembránon, elősegítve ezzel a peptidek intracelluláris transzportját [Maróti, G., 2011]. A lehetséges membrán-interakciókat az 1.10. ábra szemlélteti [Li, Y., 2012].



1.10. ábra: Antimikrobiális peptidek hatásmechanizmusa [Li, Y., 2012]

- A. A gyűrűs modellben a peptidek összekapcsolódnak és a keletkező pórusok mentén folyamatos elhajlásra kényszerítik a lipid monorétegeket, így mind a beékelődött peptidek, mind a lipid fej csoportok vizes zárványokat alakítanak ki.
- B. A szőnyeg modellben a peptid láncok szőnyegszerűen lefedik a membránok felületét és a detergens hatásnak köszönhetően oldhatóvá teszik azt egy bizonyos küszöb-koncentráció felett. Általában magas peptid:lipid arány szükséges a folyamat lejátszódásához.
- C. A hordó-donga modellben a peptidek a sejtmembránhoz kötődnek, majd beékelődnek a membrán hidrofób magjába, egy pórust kialakítva azon. A felületen keletkezett nyílás a citoplazma folyadék szivárgását okozza és ez által a sejt pusztulását.
- D. Az aggregát csatorna modellben a peptidek beékelődnek a membránba és szabálytalan aggregátum-csoportokba rendeződnek, amelyek képesek áthatolni a membránon. Ezek az aggregátumok víz molekulákat is szállítanak magukkal, csatornákat kialakítva az ionok és nagyobb molekulák átjutásához.

Az antimikrobiális peptidek közé sorolható a korábban említett *Xenorhabdus* másodlagos anyagcsere termékek közül a xenematide, a xenortide-ok és néhány PAX-molekula, amelyek mind gyűrűs szerkezettel rendelkeznek. A reguláris aminosavakban gazdag peptidek közé tartozó UV-aktív molekula a bicornutin-A, melyet Magyarországon izoláltak 2008-ban *Xenorhabdus budapestensis* sejt kultúrájából [Böszörményi, E., 2009]. Lineáris hexapeptid szerkezetét eleinte csak részlegesen sikerült tisztázni, argininben gazdag, a C-terminális pedig ismeretlen volt (RLRRRX). Később egy német kutatócsoport MALDI-CID-MS2 analízis segítségével határozta meg a molekula elsődleges szerkezetét (1.11. ábra). A hiányzó C-terminális tömege a mérések alapján 88,1 Da-nak adódott. A bicornutin A1 kémiai úton történő szintetizálása L és D konfigurációban is megtörtént. Emellett a C-terminális pozícióban feniletilamin gyökkel rendelkező bicornutin A2 származékot (859,59 Da) is azonosították *X. budapestensis* DSM 16342 tenyészetből. A vizsgált bicornutin módosulatoknak azonban egyike sem mutatott antibiotikus aktivitást *in vitro* kísérletekben [Fuchs, S. W., 2012].



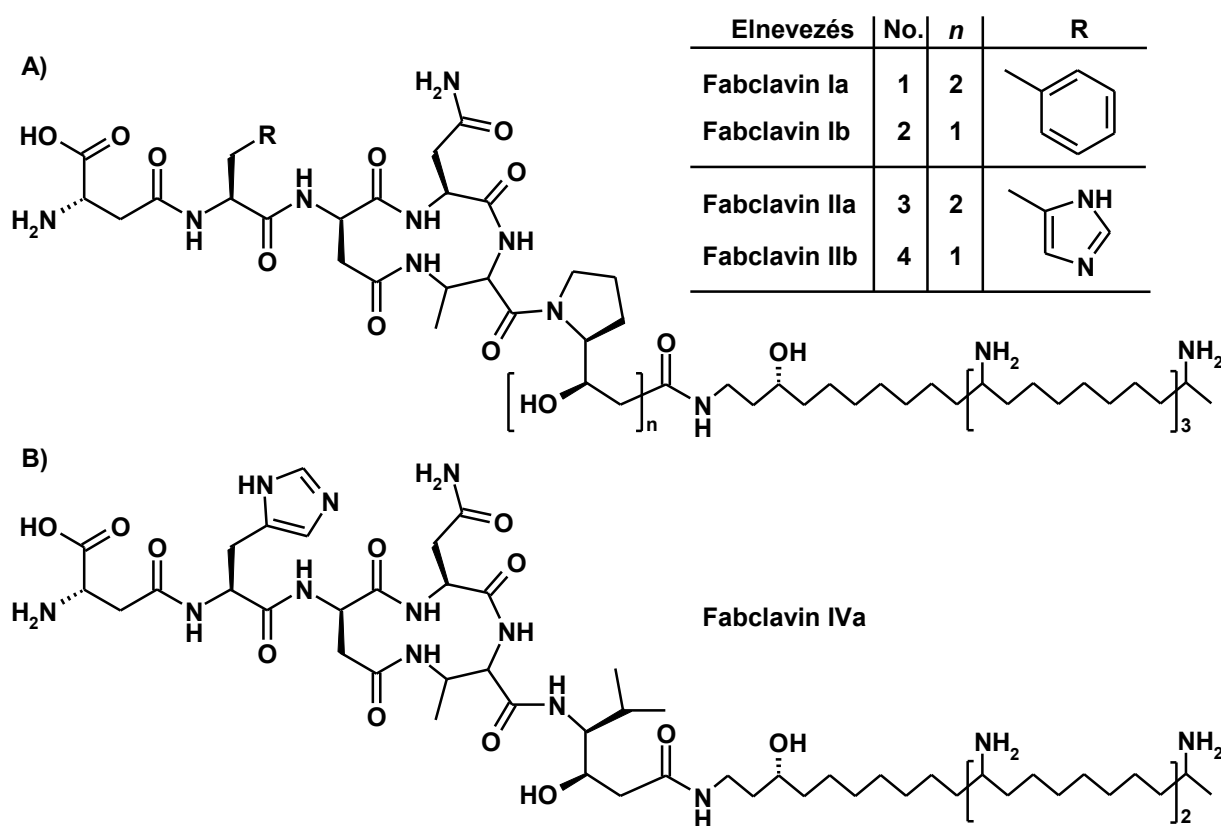
1.11. ábra: Bicornutin A1 és A2 molekulaszervezete [Fuchs, S. W., 2012]

További *Xenorhabdus budapestensis* sejt-tenyészetből izolált peptidok közé tartozik a GP-19 és az EP-20, melyek erős antimikrobiális aktivitást mutattak növénypatogén baktériumokkal (*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Pseudomonas solanacearum*, *Prototheca wickerhamii*) és gombákkal (*Phytophthora capsici*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium omysporum*, *Fusarium graminearum*) szemben. Hőstabilak és ellenállóak enzimatisz hidrolízissel szemben. A GP-19 neutrális molekula, az EP-20 nettó negatív töltéssel rendelkezik. A GP-19 aminosav szekvenciája GPVGLLSSPGSLPPVGGAP, az EP-20 aminosav-sorrendje EGPVGLADPDGPASAPLGAP [Xiao, Y., 2012]. Szerkezetük alapján szintén a reguláris aminosavakban gazdag antimikrobiális peptidok közé sorolhatóak, egyik fő alkotó elemük a prolin.

A fabclavinok nem-riboszomális úton képződő peptid-poliketid hibridek, melyek egy poliamino-csoporthoz kapcsolódnak (1.12. ábra). Molekulaszervezetüket összetett NMR és tömegspektroszkópiás módszerek segítségével sikerült meghatározni. A fabclavinok szerkezetüket tekintve hasonlóak a kationos antimikrobiális peptidokhoz [Lin, L., 2015], amelyek szinergista hatásuknak köszönhetően képesek erősíteni a kombináltan használt antibiotikumok hatékonyságát [Hancock, R. E. W., 2001]. *In vitro* kísérletekben hatásosnak bizonyultak *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma brucei* és *T. cruzi* ellen [Fuchs, S. W., 2014].

A széles-spektrumú aktivitás a fabclavinok általános jellegű toxicitását jelzi, amely a természetben fontos védelmi szerepet tölt be az EPN-EPB komplex létfenntartása szempontjából, mivel képesek távol tartani a kompetitív organizmusokat (baktériumok, gombák, protozoák) az elpusztult gazdaállatban és a talajban is. A fabclavinokat sikerült

kimutatni *X. budapestensis* és *X. szentirmaii* EPB törzsekből egyaránt. A vegyület-csoport bioszintéziséért felelős gén-klaszter azonosítása is megtörtént [Fuchs, S. W., 2014].



1.12. ábra: Fabclavinok szerkezete [Fuchs, S. W., 2014]
(A. *X. budapestensis* baktériumból, B. *X. szentirmaii* baktériumból azonosított)

Napjainkban a különböző eredetű antimikrobiális peptidek egyre fontosabb szerepet játszanak életünkben. Az AMP típusú hatóanyagok elsősorban azért kerülnek az érdeklődés középpontjába, mert sokan úgy gondolják, hogy a jövőben megfelelő alternatívát jelenthetnek az élelmiszeriparban alkalmazott tartósítószerrel, vagy a hagyományos antibiotikumokkal szemben. Így élelmiszer-adalékanyagként, valamint a gyógyszeriparban fertőzések, betegségek kezelése (pl. multidrog-rezisztens baktériumok elleni védekezés) céljából is nagy hangsúlyt fektetnek kutatásukra és fejlesztésükre [Li, Y., 2012].

1.5. Célkitűzések

Az általam végzett kísérletek célja, hogy megvizsgáljam az entomopatogén baktériumok felhasználásával létrehozható biopreparátumokat, felhasználhatóak lehetnek-e bakteriális eredetű növénypatogén kórokozók ellen az integrált növényvédelemben.

A szakirodalmi adatgyűjtés alapján, elsősorban két erős antagonista hatással rendelkező EPB törzs (*Xenorhabdus budapestensis* és *X. szentirmaii*) sejtmentes fermentleveinek előállítását, majd antimikrobiális aktivitásuk mérését tervezem végrehajtani, *in vitro* kísérletek nagyszámú mintán történő elvégzésével. Az adatok összehasonlítása lehetséges az ugyanezen törzsekkel végzett korábbi vizsgálati eredmények alapján [Böszörményi, E., 2009; Fodor, A., 2012]. Az ígéretesebb antibiotikum-termelő törzs kiválasztása után különböző tisztítottsági fokú mintákat tervezek előállítani. Az elkészített biopreparátumok hatásának igazolása érdekében különböző antibiotikum-érzékenységi módszerek adaptálása és alkalmazása szükséges.

In vivo kísérletekben két olyan növényi kórokozót (*Erwinia amylovora* és *Ralstonia solanacearum*) választottam a hatásosság igazolására, melyekkel szemben a jelenleg érvényes szabályozás miatt nincs megfelelő védekezési mód a hazai gyakorlatban. A növénykísérletek során az elkészített biopreparátumok fitotoxikus hatását is szükséges vizsgálni, hiszen az alkalmazhatóság alapfeltétele, hogy a védendő gazdanövényben ne jelentkezzen károsodás a kezelés hatására. Végül az eredmények tekintetében értékelhető a különböző tisztítottsági fokú minták növényvédelmi célú felhasználhatósága.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Anyagok

2.1.1. Entomopatogén baktérium törzsek

A kísérletek során alkalmazott antagonista baktérium törzsek a *Xenorhabdus budapestensis* DSM-16342^T (EMA) és a *Xenorhabdus szentirmaii* DSM-16338^T (EMC) voltak. Mindkét törzset Lengyel Katalin írta le először. A *X. szentirmaii* baktériumokat *S. raram*, míg a *X. budapestensis*-t a *S. bicornutum* nematoda fajból izolálták [Lengyel, K., 2005]. A DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) törzsgyűjtemény típus-törzseiként kerültek elhelyezésre a megjelölt azonosító számmal Németországban. Az entomopatogén baktériumok folyamatos fenntartását és tenyésztésüket Luria-Bertani Broth (LB), illetve módosított Luria Agar (LBA) tápközegek felhasználásával végeztem 25 °C hőmérsékleten [Ausubel, F. M., 1999]. Az antibiotikum-termelő primer sejtek és az inaktív szekunder variáns megkülönböztetésére LBTA indikátor táptalajon szélesztettem a törzseket. A festékanyagok megkötésére a szekunder sejtek nem képesek, a primer telepek viszont sötétkék színnel rendelkeznek 48 óra inkubálást követően 25 °C-on [Leclerc, M. C., 1991]. A megfelelő EPB törzs primer (sötétkék) különálló „magányos telepet” oltókaccsal LB tápoldatba oltottam, B. Braun Biotech International Certomat S és Certomat HK típusú termosztálható körkörös síkrázógépben 25 °C-on felnevesztve tömény inokulum oldatot készítettem, majd 60%-os glicerinnel 2:1 arányban elegyítve 2 cm³-es Eppendorf edényekben -20 °C-on tároltam a következő felhasználásig.

2.1.2. Teszt baktériumok

Az antimikrobiális hatás tesztelését növénypatogén baktériumokon végeztem el. A törzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (NCAIM Budapest) származnak [NCAIM]. Nagy számban választottam olyan kórokozókat, melyek esetén már rendelkezésre áll a szakirodalomban olyan vizsgálati adat, amely alapján a reprodukálhatóság ellenőrizhető, illetve a vizsgálatok számával és körével az ismeretek bővítése is megvalósulhat.

A tesztelt mikroorganizmusok az *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Dickeya*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* és *Xanthomonas* nemzetségek képviselői. Többségük Gram-negatív kórokozó, de Gram-pozitív baktérium is megtalálható közöttük (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae*).

Az *E. amylovora* négy különböző törzsét is használtam a kísérletekben. Az Ea1 jelölésű vad típusú törzset – amely rifampinra és streptomycinre egyaránt érzékeny – Dr. Hevesi Mária izolálta 1995-ben egy tűzelhalással fertőződött almafáról Nyárlőrinc településen [Hevesi, M., 1996]. A többi három *E. amylovora* törzs Dr. A. L. Jones (Michigan State University) professzortól származik [McGhee, G. C., 2000]. Az Ea110 jelű törzs rifampinra rezisztens, de érzékeny streptomycinre. Két további törzs rezisztens streptomycinre és érzékenységet mutat rifampin ellen. Ezek közül az Ea88 avirulens, míg az Ea Ca11 virulens baktérium törzs [Böszörményi, E., 2009].

A vizsgált növénypatogén baktérium törzseket a 2.1. táblázat foglalja össze.

2.1. táblázat: Kísérletekben tesztelt növénypatogén baktérium törzsek

Teszt baktérium	Törzsszám	Betegség
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NCAIM B.01681	gyökérgolyva
<i>Clavibacter michiganense</i> <i>ssp. michiganense</i>	NCAIM B.01531	paradicsom baktériumos rák, hervadás
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	NCAIM B.01612	cékla érnekrózisa
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	NCAIM B.01839	baktériumos hervadás, lággyrothadás
<i>Erwinia amylovora</i>	NCAIM B.01728 (Ea1)	tűzelhalás
<i>Erwinia amylovora</i>	Ea110 <i>rif</i> ^R	
<i>Erwinia amylovora</i>	Ea88 <i>str</i> ^R avirulens	
<i>Erwinia amylovora</i>	EaCa11 <i>str</i> ^R virulens	
<i>Erwinia carotovora</i>	NCAIM B.01109	baktériumos lággyrothadás
<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCAIM B.01637	pszeudomonaszos szárszövetbarnulás
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NCAIM B.01665	lággyrothadás
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NCAIM B.01969	

<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. glycinea</i>	NCAIM B.01574	szója baktériumos hervadása
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. lachrymans</i>	NCAIM B.01537	uborka pszeudomonaszos betegsége
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. morsprunorum</i>	NCAIM B.01684	csonthéjasok baktériumos rákosodása
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. savastanoi</i>	NCAIM B.01823	pszeudomonaszos rákosodás
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	NCAIM B.01556	bab baktériumos zsírfoltossága, csonthéjas gyümölcsök rákosodása
<i>Ralstonia solanacearum</i>	879 (PD2762)	paradicsom, paprika, burgonya baktériumos hervadása
<i>Ralstonia solanacearum</i>	R1240	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>pv. phaseoli</i>	NCAIM B.01523	bab baktériumos hervadása
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. carotae</i>	NCAIM B.01699	sárgarépa baktériumos hervadása
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. vesicatoria</i>	NCAIM B.01857	paradicsom és paprika baktériumos varasodása

2.1.3. Gazdanövények

In vivo kísérletek folytatásához olyan gazdanövényeket alkalmaztam, amelyek infekciója a kiválasztott kórokozókkal és alkalmas metodika segítségével viszonylag egyszerűen megvalósítható, valamint modellezhető a betegség által kiváltott tünet-együttes. A vizsgálatokhoz használt növényeket szabályozott, ellenőrzött körülmények között nevelték, így az egyes egyedek közötti eltérések mértéke elhanyagolható.

2.1.3.1. Alma – 'Watson Jonathan'

Az *E. amylovora* baktérium fertőzését, illetve azzal szemben kifejtett gátló hatást a 'Watson Jonathan' nevű alma fajtán vizsgáltam, amely egy kereskedelmi forgalomban előforduló, tűzelhalásra fogékony fajta. A kísérleti növényanyagot képező virágzatokat a

Budapesti Corvinus Egyetem (BCE) Kertészettudományi Kar Kísérleti Üzemének és Tangazdaságának génbanki fajtagyűjteményéből, Soroksáron szereztük be.

2.1.3.2. Burgonya – 'Balatoni rózsza'

A burgonyával végzett növénykísérletekben a keszthelyi nemesítésű 'Balatoni rózsza' fajtát vizsgáltam, amely a 87.3143 x Kuroda keresztezéséből származik és 2007-ben kapott állami minősítést. A hazai vetőburgonya szaporításban vezető fajta, termesztési területe Magyarországon megközelíti az 1000 ha-t. Nagy méretű gumók jellemzik, melyek közepes szárazanyag-tartalommal rendelkeznek (19-20 %) [Balatoni rózsza]. A kísérleti növényanyag steril mikroszaporítási eljárással, kontrollált körülmények között növesztett és Murashige-Skoog (MS) táptalajon gyökereztetett 6 hetes nevelési idejű burgonya növényekből állt, melyet a keszthelyi Burgonyakutatói Központból szereztünk be (Pannon Egyetem, Agrártudományi Centrum, Burgonyakutatói Központ).

2.1.4. Táptalajok, oldatok

A baktériumok fenntartásához, illetve a kísérletek során folyadék fázisban Luria-Bertani Broth (LB), szilárd táptalajon módosított Luria-Bertani Agar (LBA) tápközegeket használtam. Az LBTA indikátor táptalaj – amely a primer EPB sejtek megkülönböztetésére alkalmas – készítése esetén az LBA összetevőikhez autoklávozást követően, 50-60 °C körüli hőmérsékleten kell hozzáadni a két festékanyagot, amelyek a kékes színárnyalatot eredményezik (0,0025% BTB és 0,004% TTC) [Drace, K., 2008]. A festékanyagok (brómtimolkék és 2,3,5-trifeniltetrazolium-klorid) megkötésére csak az antimikrobiális anyagok termelésére is képes primer telepek képesek. Lágyszövet (SA) agardiffúziós és felülrétegzéses tesztek esetén használtam. Az alkalmazott tápközegek a Biolab Zrt. termékei voltak. Az 1 liter tápközeg készítéséhez felhasznált összetevőket a 2.2. táblázat foglalja össze. A tápközegeket összemérést követően autoklávban (121 °C hőmérséklet, 1 bar nyomás, 20 perc) sterilizáltam.

2.2. táblázat: Az alkalmazott tápközegek összetevői

	Élesztő kivonat	Trypton	NaCl	Agar	BTB	TTC
LB	5 g/l	10 g/l	10 g/l			
2xLB	10 g/l	20 g/l	20 g/l			
LBA	5 g/l	10 g/l	10 g/l	17 g/l		
LBTA	5 g/l	10 g/l	10 g/l	17 g/l	0,0025%	0,004%
SA				6 g/l		

2.1.5. Antibiotikumok

A kiválasztott növénypatogén teszt baktériumok viselkedését hagyományos antibiotikumokkal szemben is vizsgáltam. A kísérletek során minden antibiotikum esetében olyan koncentrációt alkalmaztam, amely alapján biztonsággal eldönthető az adott törzs rezisztenciája. Az antibiotikum koncentrációkat a CLSI szabványban *Enterobacteriaceae* baktériumokra meghatározott MIC standard értékek alapján állítottam be (2.3. táblázat).

2.3. táblázat: Az alkalmazott antibiotikumok jellemző MIC értékei *Enterocateriaceae* baktériumokra [CLSI, 2011]

Antimikrobiális hatóanyag	Jelölés	MIC Standard* (µg/ml)		
		S	I	R
Ampicillin	AM	≤ 8	16	≥ 32
Carbenicillin	CB	≤ 16	32	≥ 64
Chloramphenicol	CHL	≤ 8	16	≥ 32
Gentamicin	GM	≤ 4	8	≥ 16
Kanamycin	KM	≤ 16	32	≥ 64
Nalidixinsav	NAL	≤ 16	-	≥ 32
Rifampin	RIF	≤ 1	2	≥ 4
Streptomycin	STR	-	-	-
Tetracyclin	TET	≤ 4	8	≥ 16

*CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

A kísérletekhez használt antibiotikum-oldatok előállítását a szilárd, por alakú hatóanyag-komponensekből (Sigma-Aldrich) kiindulva, az előírt protokoll figyelembe vételével végeztem. Az oldatok elkészítését, valamint a kísérletekben használt végső oldat-koncentrációkat a 2.4. táblázat szemlélteti.

2.4. táblázat: Antibiotikum-oldatok készítése [CLSI, 2011]

Antimikrobiális hatóanyag	Oldószer*	Hígítás*	Törzsoldat (mg/ml)	Végső konc. (µg/ml)
Ampicillin	foszfát puffer, pH 8.0; 0,1 mol/l	foszfát puffer, pH 6.0; 0,1 mol/l	3,2	32
Carbenicillin	víz		6,4	64
Chloramphenicol	95% etanol	víz	3,2	32
Gentamicin	víz		1,6	16
Kanamycin	víz		6,4	64
Nalidixinsav	½ térfogat víz, majd 1 mol/l NaOH-ot hozzá csepegtetve		3,2	32
Rifampin	metanol		0,4	4
Streptomycin	víz		3,2	32
Tetracyclin	víz		1,6	16

*CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

2.2. Módszerek

2.2.1. Baktériumok fenntartása és tenyésztése

A baktériumtörzsek tartós tárolása -20 °C-on fagyasztással történt, az adott baktérium inokulum és glicerín oldat elegyének formájában. A kísérletek időszakában a szükséges törzsek fenntartását LBA szilárd táptalajon szélesztéssel végeztem, hetente átolttással. Mind az

entomopatogén, mind a növénypatogén törzsek hőmérsékleti optimuma a 25-28 °C közötti tartományba esik, ezért növesztésüket 25 °C-on termosztálva, folyadék fázisban szaporítás esetén LB tápoldatban 150-200 rpm fordulatszámon rázatva végeztem.

2.2.2. Telepszámlálás

A telepszámlálós módszer alkalmas egy adott baktérium törzs vizes (színtelen) oldatban lévő sejtszáma és az oldat optikai sűrűsége közötti összefüggés meghatározására. Az eredmény alkalmazásával tetszőleges sejtkoncentrációval rendelkező oldat készíthető az adott baktériumból egy megfelelően tömény vizes szuszpenziót készítve, majd az abszorbancia alapján történő számítás szerint az oldatot hígítva.

A mérés során az adott teszt baktérium törzset LBA táptalajra szélesztettem, majd 48 óra inkubációt (25 °C) követően a felszaporodott baktérium telepeket lamináris boxban steril fiziológiás sóoldattal lemostam a szilárd táptalaj felszínéről és kémcsőbe pipetázva 5 ml-re egészítettem ki. Az így kapott tömény sejt-szuszpenzióból kiindulva hígítási sort készítettem kémcsövekben steril 0,9%-os NaCl oldat felhasználásával, majd mindegyikből 10 µl mennyiséget szélesztettem LBA lemezekre, 3 ismétlésben. A különböző hígítások abszorbanciáját 620 nm hullámhosszon mértem desztillált vízzel szemben Hach-Lange DR 3900 spektrofotométerrel. Végül az adatokat ábrázolva kaptam meg az optikai denzitás (OD) és a hígítások közötti összefüggést. A szélesztett lemezeken 48 óra inkubálás (25 °C) után meghatároztam a kinőtt baktérium telepek számát (CFU - 'colony forming unit'), így a megfelelő hígításokhoz sejtszám adatok rendelkezhetők. A mérést az *E. amylovora* Ea1 és a *Ralstonia solanacearum* R1240 törzsekkel végeztem el.

2.2.3. Sejtmentes kondicionált *Xenorhabdus* fermentlé előállítása

A *Xenorhabdus budapestensis* DSM-16342^T és *Xenorhabdus szentirmaii* DSM-16338^T EPB törzseket LBTA táptalajon szélesztettem. 48 óra inkubálás (25 °C) után a sötétkék színnel rendelkező különálló telepeket - amely az AMP-termelő primer variánst jelzi [Leclerc, M. C., 1991] - 3-3 ml LB tápoldatba oltottam kémcsövekben, majd 25 °C hőmérsékleten rázattam (200 rpm) 24 órán keresztül. A lépték-növelés ezután két lépésben valósult meg: 200, majd 1000 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikokban, melyek steril dugóval voltak ellátva.

A folyadék-kultúrák a rendelkezésre álló lombik-térfogatok negyedét tették ki, így rázatással biztosíthatóak voltak a baktériumok szaporodásához szükséges aerob körülmények. A stacioner fázis elérését követően centrifugáltam a sejt-kultúrákat (15000 g, 20 perc), a különböző sarzsok felülúszóit külön címkézett üvegekbe gyűjtve. A lombikok alján maradt inokulum feleslegből felülrétegzéses teszthez előre elkészített LBA lemezekre pipettáztam 5-5 µl mennyiségeket, majd 5 nap inkubálást (25 °C) követően az előkísérletek alapján érzékenynek bizonyult *E. amylovora* Ea1 törzzsel szemben teszteltem. A gátlási zóna kialakulásával ellenőrizhető, hogy az adott tenyészet nem váltott fenotípust a laboratóriumi növesztés során. Az aktívnak bizonyuló centrifugált sarzsokat 0,22 µm pórusátmérőjű szűrővel (Merck Millipore), vákuumszivattyú alkalmazásával szűrtem (2.1. ábra). Az eljárás végén nyert sejtmentes kondicionált fermentleveket (CFCM) hűtőben tároltuk a felhasználásig, 4 °C hőmérsékleten.



2.1. ábra: Centrifugált *Xenorhabdus* fermentlé szűrése

2.2.4. Tisztított bioaktív frakció előállítása

Az EMA sejtmentes kondicionált fermentléből (CFCM) 3 liter mennyiséget további tisztításnak vetettem alá. Az előkészített oldatokat 48 órán keresztül rázattam 150 rpm fordulaton, 20 g/l - előzőleg desztillált vízben autokláv segítségével (121 °C, 30 perc) aktivált - Amberlite® XAD 1180^R (Alfa Aesar GmbH & Co KG) kationcserélő gyantával, a bioaktív anyagok adszorbeálása érdekében [Böszörményi, E., 2009]. A gyanta mosása és az extrahálás

ezután több lépésben, desztillált vízzel és különböző töménységű metanol-oldatokkal történt, vákuumszivattyú alkalmazása mellett a következő sorrendben:

1. 1 l steril deszt. vízzel üvegszűrőn mosatva a szennyeződések eltávolítása a gyantáról,
2. A gyanta átmosása 0,45 μm pórusátmérőjű szűrőfeltetre (Merck Millipore),
3. 500 ml 25 %-os MeOH-al további szennyező anyagok eliminálhatóak,
4. 3×300 ml 50 %-os MeOH a színanyagok és inaktív vegyületek eltávolítására,
5. 3×300 ml 80 %-os MeOH-al eluálható néhány további komponens - főként triptamin -,
6. 300 ml tömény MeOH, 3 ml 2 N HCl-val savanyítva.

Az eljárás 1-5. pontjaiban keletkező eluátumok antimikrobiális hatású anyagot nem, vagy csak elhanyagolható mennyiségben tartalmaznak. A savas kémhatású, tömény metanolos frakciót - amely a bioaktív komponenseket mennyiségileg tartalmazza - rotációs vákuum-desztilláló berendezés (Heidolph VV 2000) segítségével kíméletes körülmények között (35 °C hőmérsékleten) bepároltam hozzávetőleg 50 ml térfogatra (2.2. ábra), majd 2 N NH_4OH -oldat segítségével közömbösítettem pH~6 értékig.



2.2. ábra: CFCM bepárlása rotációs vákuum-desztillációval

A neutralizált mintát ezután teljesen szárazra pároltam, a folyamat végén pedig tömegméréssel meghatároztam az előállított biopreparátum mennyiségét (2.3. ábra).

Az eljárás eredményeként kapott EMA tisztított bioaktív anyag különféle *in vitro* kísérletekben, valamint növénykísérletben alma virágzatokon is tesztelésre került a szakirodalomban leírt módszerek alapján.

Az EMA és EMC CFCM oldatokból 1-1 liter mennyiséget ugyanilyen metodika alkalmazásával tisztítottam, arányosan kisebb vegyszermennyiségek felhasználásával. Az így kapott tisztított EMA és EMC biopreparátumon analitikai vizsgálatokat folytattam.



2.3. ábra: Az előállított EMA biopreparátum

2.2.5. *In vitro* vizsgálati módszerek

2.2.5.1. Teszt baktériumok érzékenysége hagyományos antibiotikumokkal szemben

A konvencionális antibiotikumokkal elvégzett kísérletek elsősorban annak megállapítására szolgáltak, hogy - a főleg *E. coli*-ra megállapított - antibiotikum koncentrációk közül melyek azok, amelyekre érzékenyek illetve rezisztensek a vizsgált növénypatogén teszt baktériumok. Ennek megfelelően minden antibiotikumból egy meghatározott koncentráció került vizsgálatra.

A minták összemérését steril lamináris fülkében, 96-lyukú sejtenyésztő plate-eken végeztem el. Az elrendezést a 2.5. táblázat szemlélteti. Minden egyes mikrotitrátor lemez két teszt baktérium érzékenységének vizsgálatára szolgált. Az antibiotikumokat 3-3 párhuzamos alkalmazásával teszteltem a baktériumok ellen (3-11. számú oszlopok). Ezekben az esetekben 188 µl autoklávozott LB tápoldatot mértem be, amelyet a kísérlet indításakor beoltottam 10 µl mennyiségű, előzőleg O/N felnevesztett teszt baktérium inokulummal, majd 2 µl-t

pipettáztam hozzá a megfelelő antibiotikum törzsoldatból, így kialakítva a végső vizsgált koncentrációt (2.4. táblázat).

A lemezek szélein (1. és 12. számú oszlopok), valamint a tesztelt minták között (D és H sorok) negatív kontrollként tiszta autoklávozott LB tápoldatot pipettáztam (200 µl). Ezzel ellenőrizhető, hogy a plate-ek nem fertőződtek be a kísérlet alatt. A 2. oszlopban 190 µl LB tápoldatot 10 µl mennyiségű teszt baktérium inokulummal oltottam be. Ezek a minták pozitív kontrollként a baktériumok szaporodását szemléltették antibiotikum hiányában.

2.5. táblázat: Teszt baktériumok vizsgálata hagyományos antibiotikumokkal szemben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	LB	LB+ Tb1*	AM	CB	CHL	GM	KM	NAL	RIF	STR	TET	LB
A												
B												
C												
D (LB)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	LB	LB+ Tb2*	AM	CB	CHL	GM	KM	NAL	RIF	STR	TET	LB
E												
F												
G												
H (LB)												

*Tb1 = Teszt baktérium1; Tb2 = Teszt baktérium2

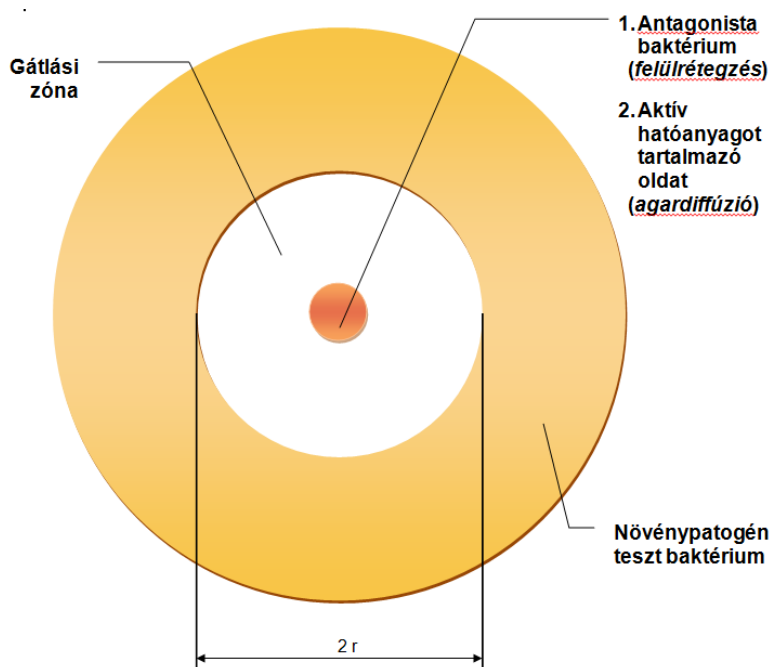
Összemérést követően a plate-eket fedőlemezzel ellátva rázógépre helyeztem, majd 120 rpm fordulatszámon rázattam 24 órán keresztül, 25 °C-on termosztálva. Az értékelés vizuálisan történt a minták optikai denzitása alapján, amely a sejtszaporulattal arányos. Egy adott teszt baktérium abban az esetben jelölhető rezisztensnek egy antibiotikum ellen, ha a pozitív kontrollhoz viszonyítva közel azonos zavarosság figyelhető meg az értékelés időpontjában.

2.2.5.2. Felülrétegzéses mérés

Az angol nyelvű szakirodalomban 'overlay bioassay' néven leírt módszer az élő *Xenorhabdus* sejtek antagonista hatásának vizsgálatára alkalmas [Furgani, G., 2008]. Segítségével igazolható az antimikrobiális anyagok termelése - primer fázis jelenléte folyadék-kultúrában -, amennyiben érzékeny törzsekkel szemben végezzük a tesztet.

Ugyanakkor mivel nincs standardizálva a lemezre kicseppentett EPB inokulum sejtszáma, pontosabb információt nem ad a keletkező antimikrobiális anyagok fajlagos mennyiségére vonatkozóan, ezért főként összehasonlító elemzésekre, valamint az érzékenység mértékének hozzávetőleges megállapítására használható rutinszerűen.

A felülrétegzés kísérletek előkészítéseként 9 cm átmérőjű steril, műanyag Petri csészékbe autoklávozott LBA táptalajt öntöttem ki. Megszilárdulást követően log fázisú EMA, illetve EMC baktériumok LB folyadékkultúrájából 5 µl mennyiséget pipettáztam az LBA táptalajt tartalmazó lemezek közepére. Ezt 5 napos inkubálás követte 25 °C hőmérsékleten, amely időszak alatt a kicseppentett antagonista baktérium növekedése biztosított, mindemellett a termelő bioaktív anyagok a tápközegebe diffundálnak a baktérium-telep környezetében. A vizsgálandó növénypatogén organizmusokat 5-5 ml steril LB tápoldatba oltottam kémcsövekben a teszt elvégzését megelőző napon, majd 25 °C-on termosztálva rázatásra kerültek 200 rpm fordulaton, 24 órán keresztül. A növénypatogén baktérium törzs felnövesztett folyadék-kultúrájából és 45 °C-on termosztált lágyagarból 1:20 arányban szuszpenziót készítettem (200 µl inokulum + 3,8 ml SA), majd homogenizáltam. A szuszpenziót ez után az előkészített LBA lemezek felületén kell szétoszlatni, mielőtt a lágyagar megdermed. Végül 48 óra inkubáció szükséges 25 °C-on.



2.4. ábra: Felülrétegzéses teszt és agardiffúziós lyuk teszt értékelése

Érzékeny teszt baktérium esetén koncentrikus kör alakú inaktivációs zóna kialakulása figyelhető meg az antibiotikum-termelő EPB törzs környezetében. Az értékelést a 48 óra inkubáció után mérhető gátlási zóna átmérőjének megállapítása jelenti, amit mm-ben szokás megadni (2.4. ábra). A teszteket minden esetben legalább három párhuzamos méréssel végeztem.

2.2.5.3. Agardiffúziós lyuk teszt

Az agardiffúziós módszer elnevezése és elméleti háttere abból a megállapításból ered, hogy a vizsgálandó vegyületek az agar tápközegben diffúzióval képesek terjedni és hatékonyságuktól függően váltják ki a teszt organizmusok szaporodás-gátlási zónáját. Az érzékeny teszt baktérium esetén kialakuló inaktivációs zóna mérete függ a vizsgált antimikrobiális hatású vegyület diffúziós sebességétől, koncentrációjától és természetesen a tesztelt mikroorganizmus érzékenységétől is. A mérés elvégzésére két, némileg eltérő változat is elterjedt. Az ún. korong diffúziós teszt esetén az előre elkészített táptalajba hordozóanyag segítségével (korong), míg a lyuk tesztben hordozóanyag nélkül, általában vizes oldat formájában juttatjuk a hatóanyagot a tápközegbe.

A kísérleteket a lyuk teszt alkalmazásával végeztem [Fodor, A., 2012]. Az agardiffúziós teszt az EPB sejtektől teljes mértékben elválasztott oldatok, vegyületek biológiai aktivitásának meghatározására használható. Ennek megfelelően az EMA illetve EMC folyadék-kultúrákból nyert sejtmentes fermentlevek (CFCM), valamint a további tisztítás eredményeként előállított EMA biopreparátum steril desztillált vízzel hígított oldatainak antibakteriális hatását vizsgáltam a módszerrel.

Az agardiffúziós kísérletek előkészítéseként 6 cm átmérőjű steril, műanyag Petri csészékbe autoklávozott LBA táptalajt öntöttem ki. A növénypatogén teszt baktériumokat 5-5 ml steril LB tápoldatba oltottam kémcsövekben a teszt elvégzését megelőző napon, majd 25 °C-on termosztálva rázatásra kerültek 200 rpm fordulaton, 24 órán keresztül. A növénypatogén baktérium törzs felnövesztett folyadék-kultúrájából és 45 °C-on termosztált lágyagarból 1:10 arányban szuszpenziót készítettem (200 µl inokulum + 1,8 ml SA), majd homogenizáltam. A szuszpenziót az előkészített LBA lemezek felületén kell szétoszlatni, mielőtt a lágyagar megdermed. Megszilárdulás után közvetlenül steril dugófúróval 8 mm átmérőjű lyukat fúrtam a lemezek középsébe, majd különböző koncentrációkban a lemez szintjével azonos magasságig pipettáztam a vizsgálandó oldatokat.

Az értékelés a felülrétegzéses teszthez hasonlóan a 48 óra inkubációs idő után mérhető gátlási zóna átmérőjének meghatározásával történik, az eredményt mm-ben adjuk meg (2.4. ábra). A kísérletek során minden minta esetén legalább három párhuzamos mérést végeztem.

2.2.5.4. Baktericid hatás folyadék fázisban

Folyékony közegben történő *in vitro* vizsgálatra a Furgani és munkatársai által leírt módszert alkalmaztam [Furgani, G., 2008]. Hígítási sort készítettem 6-lyukú sejttenyésztő plate-eken az előállított antibakteriális hatású EMA illetve EMC CFCM mintákból 2xLB tápoldat segítségével. Az összemérést steril lamináris fülkében végeztem el oly módon, hogy minden egyes lemezen egy adott baktérium ellen három különböző koncentráció vizsgálható, két párhuzamos méréssel. A mintánként 4-4 ml térfogatban kialakított végső CFCM koncentrációk térfogatszázalékban megadva a következők voltak: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 és 100 (V/V)% (2.6. táblázat).

2.6. táblázat: Minták előkészítése baktericid hatás folyadékban történő vizsgálatához

EMA/EMC CFCM (ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	3,2
2xLB (ml)	3,9	3,5	3,1	2,7	2,3	1,9	1,5	0,7
CFCM (V/V)%	0	10	20	30	40	50	60	80

A mérés indításakor 100 µl mennyiségű, előzőleg O/N felnövesztett teszt baktérium inokulumot pipettáztam az összemért oldatokhoz, majd 24 órán keresztül rázattam a lemezeket 120 rpm fordulaton, 25 °C-on termosztálva. Negatív kontrollként tiszta, összemért oldatokat használtam, melyek nem kerültek beoltásra baktérium inokulummal.

Az értékelés másnap a minták optikai sűrűségének (OD) meghatározásával történt. A teszt baktériumok sejtszámára kifejtett gátló hatás vizsgálata a tápoldatban lévő sejtek fényelnyelésén alapul. Az abszorbanciát 620 nm hullámhosszon mértem Hach-Lange DR 3900 spektrofotométerrel.

2.2.5.5. MID (maximális hatékony hígítás)

A folyadék fázisban elvégzett kísérlet értékelésének időpontjában minden egyes mintából 50 µl mennyiséget szélesztettem előre elkészített LBA táptalajra, két párhuzamos alkalmazásával. A lemezeket ezután 25 °C-on inkubáltam 48 órán keresztül, majd a kinőtt telepek alapján történt az értékelés [Furgani, G., 2008]. A MID érték a vizsgált antibakteriális hatású CFCM-nek az a legnagyobb hígítása, amely képes megakadályozni a teszt baktérium növekedését. Amennyiben az eredményt a CFCM-re vonatkozó térfogatszázalékban adjuk meg, minél kisebb a MID értéke, annál nagyobb az adott teszt baktériummal szemben kifejtett gátló hatás.

2.2.5.6. MIC (minimális inhibíciós koncentráció)

Az előállított EMA biopreparátum minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározásához a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által közölt szabvány makrodilúciós módszerét vettem alapul [CLSI, 2012]. A mérést az *E. amylovora* Ea1 törzssel szemben végeztem el, 6-lyukú sejtenyésztő plate-eken. Sorozathígítási módszert alkalmaztam folyékony LB tápközzel. A tisztítási eljárás eredményeként kapott szárazanyagot tömény metanolban feloldva 10 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettem, amelyből kiindulva steril desztillált víz segítségével felező hígítási sort készítettem az 1000 - 1,0 µg/ml tartományban. A mérés indításakor 100-100 µl azonos mennyiségeket pipettáztam az Ea1 teszt baktérium ismert sejtkoncentrációjú tenyészetéből a különböző hígításokhoz. Az Ea1 inokulum sejt-koncentrációját a telepszámlálási módszer eredményeként kapott sejtszám-OD összefüggés alapján állítottam be 5×10^5 CFU/ml értékre egy frissen növesztett sűrű baktérium-kultúra hígításával. Antimikrobiális anyagot nem tartalmazó kontroll mintát is készítettem a mikrobák szaporodásának ellenőrzésére. A minimális gátló koncentráció megállapítása a vizuálisan értékelhető módszerek közé tartozik. Az eredményeket 24 óra inkubálás (25 °C) és rázatás (120 rpm) után állapítottam meg. A teszteket 3 párhuzamos minta alkalmazásával végeztem, így minden egyes plate-en két különböző koncentráció volt vizsgálható.

2.2.5.7. MBC (minimális baktericid koncentráció)

A minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározásához a Smith-Palmer által leírt módszert vettem alapul [Smith-Palmer, A., 1998]. A MIC érték vizuális megállapítását követően a sejtenyészítő plate-ek minden egyes mintájából 50 µl mennyiségeket szélesztettem előre elkészített LBA lemezekre 3 párhuzamossal, majd 48 órán át inkubáltam 25 °C hőmérsékleten. Az MBC értékét az a legalacsonyabb koncentráció adja, amely esetében egyáltalán nem nőnek ki baktérium telepek a szélesztett lemezeken.

2.2.6. *In vivo* vizsgálati módszerek

2.2.6.1. Hatékonyság mesterségesen fertőzött alma virágokon tűzelhalás ellen

A *Xenorhabdus budapestensis* CFCM-ből kinyert szárazanyagot tömény metanolban feloldva 10 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettem. A tömény oldatot 250 ml-es mérőlombikokban steril desztillált vízzel hígítva állítottam elő a vizsgálandó mérőoldatokat az 500 - 4,0 µg/ml koncentráció-tartományban (500, 300, 200, 150, 100, 62, 31, 16, 8, 4 µg/ml).

A mérőoldatok tűzelhalás elleni hatékonyságát almafa virágokon teszteltem a Pusey által leírt módszer módosított változata alapján [Pusey, P. L., 1999; Tóth, M., 2013]. A tűzelhalásra érzékeny 'Watson Jonathan' fajtájú almafákról 300 darab ballon állapotú virágot gyűjtöttem a Budapesti Corvinus Egyetem tangazdaságában, Soroksáron. A laboratóriumba szállítás papírzacskókban, hűtés mellett történt (2.5. ábra).



2.5. ábra: Virág minták begyűjtése és szállítása

Ezt követően a virágzatokat az előkészített inkubációs dobozokban lévő kémcsövekbe helyeztem, amelyek 1 %-os szacharóz-oldattal voltak színültig töltve. Az átlátszó műanyagból készült inkubációs dobozok alján glicerín és víz meghatározott elegye biztosította az *E. amylovora* teszt baktérium számára optimális 84%-os relatív páratartalmat (2.6. ábra).

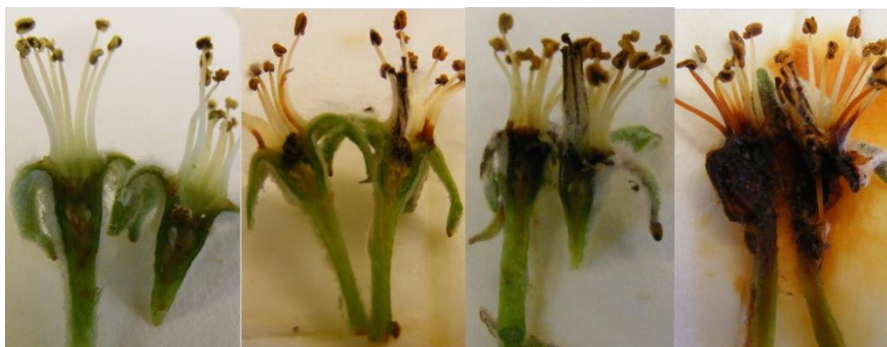


2.6. ábra: Virág minták elhelyezése az inkubációs dobozokban

Másnap a kinyílt virágokat kézi permetező segítségével preventív kezelésnek vettem alá. Az előállított antimikrobiális hatású preparátum 10 különböző koncentrációban került tesztelésre 10 külön inkubációs dobozban. Minden egyes doboz 20 kezelt, és 10 darab kezeletlen (desztillált vízzel permetezett) virágot tartalmazott. A kezelés után 3 órával virágonként 10 µl Ea1 inokulumot (5×10^8 CFU/ml) juttattam a bibeszálak tövéhez automata

pipetta segítségével. Negatív kontrollként 50 darab kezeletlen és nem fertőzött virág szolgált egy külön inkubációs dobozban. A laboratórium hőmérsékletét folyamatosan 23-24 °C között biztosítottuk a kísérlet alatt.

A virágok fertőzöttsége az inokulálást követő 5. napon értékelhető, a virágok hosszanti átvágásával, 4 fokozatú skála alapján (fertőzési index, $f_i = 0 - 3$) (2.7. ábra).



2.7. ábra: Virágok fertőzöttségének elbírálásához használt skála (f_i)
(0: tünetmentes, 1: 30%-ig barnult szerv (bibe és porzó),
2: 60%-ig barnult szerv (csésze és vacok), 3: 100%-ig barnult virág)

Az azonos kezelési csoportba tartozó virágok tekintetében a betegség mértéke a Bertrand és Gottwald által közölt alábbi képlet alapján számítható [Bertrand, P. F., 1978].

$$B_v = \sum f_i \times n_i / n$$

Ahol

B_v : a betegség mértéke a virágszerveken,

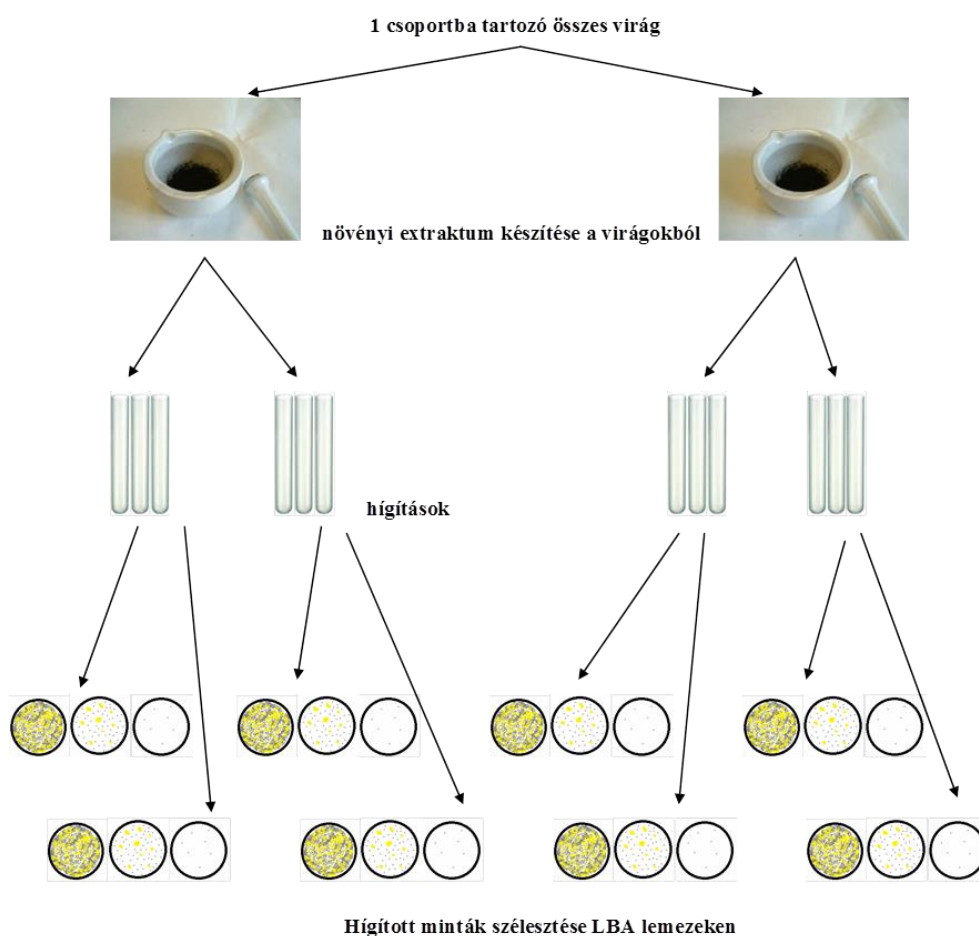
f_i : a fertőzési index (tünetek erőssége),

n_i : a fertőzési indexhez tartozó gyakoriság,

n : a vizsgált virágok száma.

Az eredményeket a teszt baktérium visszaizolálásával is megkíséréltem alátámasztani. Az értékelt virágokat kezelési módjuk szerint csoportosítva dörzsmozsárban elmorzsoltam virágonként 100 µl steril desztillált víz hozzáadása mellett, majd a képződött extraktumokból hígítási sort készítettem. Az oldatokból 50 µl mennyiségeket szélesztettem előre elkészített LBA lemezekre 2 párhuzamos alkalmazásával, majd 48 óra inkubálást (25 °C) követően a

kinőtt telepek morfológiája és száma (CFU) alapján becsülhető az élő *E. amylovora* sejtek átlagos mennyisége virágonként (2.8. ábra).



2.8. ábra: *E. amylovora* Ea1 sejtek visszaizolálása az értékelt virágokból

2.2.6.2. Fertőzési kísérlet burgonya növényeken

A fertőzési kísérletben a *Ralstonia solanacearum* R1240 teszt baktérium törzset LBA táptalajon szélesztettem, majd 25 °C hőmérsékleten 48 órán keresztül inkubáltam. A felnövesztett telepeket lamináris boxban sterilizált csapvízzel lemostam a szilárd táptalaj felszínéről és lombikba pipetázva 30 ml-re egészítettem ki. Az így kapott tömény sejt-szuszpenzióból kiindulva hígítási sort készítettem kémcsövekben autoklávozott csapvízzel 8 ml térfogatokban összemérve, 2-2 párhuzamossal. Kontrollként tiszta autoklávozott csapvizet használtam. Megállapítottam a különböző hígítások abszorbanciáját 620 nm hullámhosszon Hach-Lange DR 3900 spektrofotométerrel. A tömény kiindulási baktérium-szuszpenzió sejt-

koncentrációját telepszámlálós módszer alapján határoztam meg, a további oldatok esetében a hígítások arányában adtam meg a *R. solanacearum* sejtszámot (2.7. táblázat).

2.7. táblázat: Baktérium oldatok elkészítése a burgonya fertőzési kísérletben

Hígítás	1	0,5	0,25	10 ⁽⁻¹⁾	10 ⁽⁻²⁾	10 ⁽⁻³⁾	10 ⁽⁻⁴⁾
Abszorbancia (λ = 620 nm)	1,050	0,585	0,306	0,126	0,014	0,005	0,002
<i>R. solanacearum</i> R1240 sejtkoncentráció (CFU/ml)	6×10 ⁸	3×10 ⁸	1,5×10 ⁸	6×10 ⁷	6×10 ⁶	6×10 ⁵	6×10 ⁴

A kémcsövekben összemért teszt baktérium oldatokat inkubációs dobozba állítottam, majd kémcsövenként 2-2 mikroszaporított burgonya növényt helyeztem az oldatokba (2.9. ábra). Állapotuk változását vizuálisan követtem nyomon 18 napon keresztül, amely időszak alatt három alkalommal osztályoztam a növények fertőzöttségét 4 fokozatú skála alapján (fertőzési index, $f_i = 0$: tünetmentes, 1: 30%-ig barnult növény (hervadás, száron és a felső leveleken barnulás megjelenése), 2: 60%-ig barnult növény (teljes hervadás, levelek többsége elhalt), 3: 100%-ig barnult növény). Az azonos kezelési csoportba tartozó növényeken a betegség átlagos mértékét az alma virágok esetében alkalmazott Bertrand-Gottwald formula adaptálásával határoztam meg [Bertrand, P. F., 1978].

$$B_n = \sum f_i \times n_i / n$$

Ahol

B_n : a betegség mértéke a növényeken,

f_i : a fertőzési index (tünetek erőssége),

n_i : a fertőzési indexhez tartozó gyakoriság,

n : a vizsgált növények száma.



2.9. ábra: Mikroszaporított burgonya növények vizsgálata fertőzési kísérletben

A 2.2.5.4 fejezetben ismertetett módszerhez hasonló metodika alkalmazásával vizsgáltam meg, hogy egy megfelelően tömény *Ralstonia solanacearum* sejtszámmal rendelkező oldatot – amely a fertőzési kísérlet eredményei alapján biztonsággal okoz baktériumos hervadás betegséget burgonya növényen az adott kísérleti körülmények között – eltérő hígítású EMA CFCM-el elegyítve milyen mértékű baktericid hatás figyelhető meg az idő függvényében. A 6-lyukú sejttenyésztő plate-eken összemért mintákat (2.8. táblázat) 2-2 ml tömény *R. solanacearum* R1240 teszt baktérium inokulummal oltottam be, így kialakítva a megadott CFCM koncentrációkat.

Az inokulumot LBA lemezen előzőleg felnevesztett telepekből steril csapvízzel lemosva készítettem, majd telepszámlálós módszerrel határoztam meg az oldat sejt-koncentrációját.

2.8. táblázat: Minták összemérése *R. solanacearum* elleni baktericid hatás vizsgálatához

EMA CFCM (ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,2	3,6	4,0	6,0
Steril csapvíz (ml)	6,0	5,6	5,2	4,8	4,4	4,0	3,6	3,2	2,8	2,4	2,0	0
EMA CFCM (V/V)%	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	75

A mintákat 120 rpm fordulaton és 25 °C hőmérsékleten rázattam B. Braun Biotech International Certomat S és Certomat HK típusú termosztálható körkörös síkrázógépben. A kísérlet indítását követően 2, 4, 6, 8 és 24 óra elteltével mintát vettem az oldatokból, és 20-20 µl mennyiségeket szélesztettem LBA lemezekre 2-2 párhuzamossal, majd 48 óra inkubálás után sejtszámlálás alapján meghatározható az adott kezelési időpontokban vett minták sejtszám-koncentrációja.

2.2.6.3. Fitotoxikus hatás vizsgálata

Az antimikrobiális hatású EMA CFCM fitotoxicitását a fertőzési kísérlethez hasonló módon tanulmányoztam. A sejtmentes fermentléből 8 különböző hígítást készítettem kémcsövekben, autoklávozott csapvízzel 8 ml térfogatokban összemérve, 2-2 párhuzamossal. Kontrollként tiszta autoklávozott csapvizet használtam (2.9. táblázat).

2.9. táblázat: EMA CFCM hígítások elkészítése a fitotoxicitás vizsgálatához

EMA CFCM (ml)	0	0,4	0,8	1,6	2,4	3,2	4,0	6,0	8,0
Steril csapvíz (ml)	8,0	7,6	7,2	6,4	5,6	4,8	4,0	2,0	0
EMA CFCM (V/V)%	0	5	10	20	30	40	50	75	100

A kémcsövekben összemért oldatokat inkubációs dobozba állítottam, majd kémcsövenként 2-2 mikroszaporított burgonya növényt helyeztem az oldatokba. Állapotuk változását a fertőzési kísérletben is alkalmazott bonitáláson alapuló módszerrel követtem nyomon 18 napon keresztül. A kísérleti növények kondícióját 3, 6 és 18 nap után értékeltem 4 fokozatú skála segítségével (0 - 3), majd az adatok alapján számítottam átlagértéket az azonos kezelési csoportba tartozó növényekre vonatkozóan.

2.2.7. Statisztikai analízis

Az EMA és EMC baktériumok által indukált inaktivációs zónák mérete (felülrétegzéses mérés), valamint a különböző koncentrációjú CFCM kezelések (agardiffúziós teszt) közötti különbségek eldöntésére ANOVA analízist alkalmaztam, majd a többszörös összehasonlításokat a Scheffé post hoc teszttel végeztem $p < 0,05$ szignifikancia szinten.

A *X. budapestensis* sejtmentes fermentléből előállított biopreparátum nyolc eltérő hígításban szintén vizsgálatra került agardiffúziós tesztben *E. amylovora* Ea1 teszt baktériummal szemben. A null-hipotézis az volt, hogy összefüggés van az alkalmazott biopreparátum-dózis és az indukált inaktivációs zóna között, ezért a kísérleti eredményekből származó adatsorok korrelációját is vizsgáltam.

Az *E. amylovora* Ea1 baktériummal fertőzött és biopreparátummal kezelt alma virágokon észlelhető, tűzelhalás betegségre jellemző tünetek (nekrózissal érintett szövetek kiterjedésének mértéke) teljesen randomizált kísérletként lettek elemezve egy szempontos varianciaanalízissel, és nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszt szolgált a kezelések közötti különbségek megállapítására. Az alkalmazott biopreparátum-dózis és a kezelt virágok extraktumaiból kinyert életképes Ea1 sejtek visszaizolálásából nyert CFU/virág adatok közötti korreláció ugyancsak meghatározásra került.

A statisztikai analízist a STATISTICA 8 (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztem.

2.2.8. Analitikai vizsgálatok

Az EPB törzsek által termelt antimikrobiális hatású molekulák, elsősorban az antimikrobiális peptidek kémiai analízise, tanulmányozása többféle módon is megvalósítható. Pehr Edman fejlesztette ki az úgynevezett Edman degradáció módszerét [Edman, P., 1950], amely alkalmas az aminosav szekvencia meghatározására. Ebben az eljárásban az N-terminális aminosav minden lépésben szelektíven eltávolítható a fehérjéről és analizálható, általában valamilyen kromatográfiás módszerrel. Mivel a reakció hatásfoka nem 100%-os (előfordul, hogy nem hasad le az aminosav), minden ciklus után egyre több az azonosítandó fehérjemolekulától eltérő szekvenciájú összetevő. Ezért bár a módszer elméletileg alkalmas nagyobb méretű fehérjék aminosav-sorrendjének meghatározására is, a gyakorlatban általában 30 aminosav hosszúságig szokták elvégezni a fehérje szekvenálását.

Egy fehérje infravörös spektruma információt szolgáltat a polipeptidlánc szerkezetét és az aminosav oldalláncok elhelyezkedését illetően [Barth, A., 2000]. Ebből kifolyólag az infravörös spektroszkópia különösen hasznos eszközt jelent a fehérjeszerkezeti kutatásokban. Egy peptidben található adott oldallánc abszorbanciája lényegesen eltérhet az oldatban vagy kristályos anyagként mérhető abszorbanciájától. A proteinek speciális konformációs tulajdonságaiból fakadóan módosulhat a kötések elektron sűrűsége és polaritása, melynek következtében változik a rezgési frekvencia és az abszorpciós koefficiens is. Ezért a szakirodalomban megadott elnyelési sávokat érdemes csupán iránymutató adatként kezelni a mérés során kapott spektrum értelmezésekor [Hernandez-Ledesma, B., 2004].

Az FT-IR spektrum felvétele, elemzése Thermo Nicolet AVATAR FT-IR-330 FTIR spektrométerrel történt. Az UV spektrum meghatározása Hitachi U-2910 UV-Vis spektrofotométer alkalmazásával valósult meg.

A vizsgált EMA és EMC biopreparátum minták a 2.2.4 fejezetben leírt módszerrel készültek 1-1 l sejtmentes fermentléből kiindulva. A folyamat végén, a HCl-val savanyított tömény MeOH frakció kinyerése után egy további extrakciós lépés került beiktatásra, amely a MeOH-os kezeléssel ekvivalens mennyiségű *i*-PrOH felhasználásával történt, a gyantán átmosva. A tömény MeOH és az *i*-PrOH oldatokat az EMA és EMC esetében is szárazra pároltuk vákuum-desztillációval, így 4 különböző biopreparátum minta analitikai vizsgálata volt kivitelezhető (2.10. táblázat).

2.10. táblázat: Analitikai vizsgálatok céljából előállított biopreparátum minták jellemzői

Minta fajtája kezelés szerint	Minta tömege (g)	Bepárlási maradék jellege
EMA (cc. MeOH+HCl)	0,2191	száraz, világos barna színű
EMA (<i>i</i> -PrOH)	0,1207	nedves, világossárga színű
EMC (cc. MeOH+HCl)	0,2389	nedves, pirosas-barna színű
EMC (<i>i</i> -PrOH)	0,0347	nedves, pirosas-barna színű

Az infravörös spektroszkópia elvégzéséhez a minták előkészítésére volt szükség. Kis mennyiségű szilárd minta KBr finom porával lett összekeverve, majd mechanikus prés segítségével áttetsző pasztillák kialakítása történt meg. Nagy nyomás hatására a KBr keverék polimorf átalakuláson megy keresztül, amely homogén és infra-áteresztő pasztillát eredményez. A mérések során a felbontás $2,000\text{ cm}^{-1}$ volt. Összesen 16 pásztázás / felvétel készült.

3. Eredmények

A *Xenorhabdus budapestensis* és a *X. szentirmaii* entomopatogén baktérium törzsek antagonista képességét és az általuk előállított bioaktív anyagok szerkezetét, valamint hatékonyságukat vizsgáltam élelmiszertermelés szempontjából jelentőséggel bíró haszonnövények kórokozó baktériumaival szemben. A szakirodalomban számottevő mennyiségű publikáció található, mely a különböző EPB törzsek hatékonyságának vizsgálatára irányuló kísérleteket és azok eredményeit prezentálja. Új növénypatogén törzsek szabványos módszerrel történő tesztelése esetén így megfelelő összehasonlítási alap áll rendelkezésre. Az antimikrobiális hatással rendelkező anyagcseretermékek izolálásával és molekulaszerkezetük azonosításával szintén számos közlemény foglalkozik. A sejtmentes fermentlevekben előforduló vegyületek változatossága és a bioaktív molekulák nagy száma miatt azonban az ilyen irányú kutatások továbbra is indokoltak.

A jelen dolgozat egyik célja a két *Xenorhabdus* törzs növényvédelmi potenciáljának összehasonlítása, melyet 22 kórokozó baktérium törzs különféle *in vitro* módszerekkel történő tesztelése révén végeztem el. A bioaktív metabolitokat tartalmazó oldatok fitotoxikus, növényt károsító hatásával, valamint növényeken illetve azok egyes részein, szervein elvégzett kísérletekről jóval kevesebb publikáció található a szakirodalomban. A dolgozat másik fő irányvonala ebből az okból kifolyólag két kiválasztott növény – alma és burgonya – tisztított EPB fermentlevekre adott válaszreakcióinak tanulmányozását, valamint azok bakteriális fertőzésének, betegségének – tűzelhalás és baktériumos barna rothadás – megelőzésére, kezelésére irányuló kísérleteket foglalja magába.

A munka első fázisában megtörtént a növénypatogén teszt baktériumok érzékenységeinek felmérése konvencionális antibiotikumokkal szemben, majd a két EPB törzs antagonizmusának erősségét hasonlítottam össze néhány kiválasztott kórokozóval. A további *in vitro* és növényeken elvégzett kísérletek, valamint az analitikai vizsgálatok előkészítéseként szükséges volt a sejtmentes, antimikrobiális metabolitokat tartalmazó oldatok és a tisztított biopreparátumok előállítása.

Az EPB sejtektől elválasztott bioaktív anyagok nagyszámú mintán és kísérletben elvégzett tesztelése során nyert adatokból a két *Xenorhabdus* törzs növényvédelmi potenciálja összehasonlítható a hatásosság alapján, emellett a vizsgálati eredmények jelentős hányada alkalmas a biopreparátum antimikrobiális hatásának számszerű meghatározására is.

A növénykísérleteket már csak az egyik, ígéretesebbnek bizonyuló EPB törzzsel végeztem. A vonatkozó eredmények egyrészt rámutatnak a kinyert fermentlevek további tisztításának és formulázásának szükségességére, másrészt alátámasztják az *in vitro* kísérletekben tapasztalt antibiotikus hatást és előrevetítik a tisztított anyagok növényeken történő alkalmazásának lehetőségét.

Mindemellett a két EPB törzs fermentlevéből kinyert bioaktív szárazanyag mintákat analitikai vizsgálatokban is elemeztem, melynek eredményeként kvalitatív információkat kaptam a törzsek által termelt antimikrobiális peptideket felépítő aminosavakra vonatkozóan.

3.1. *In vitro* vizsgálati módszerek

A kutatás ezen fázisában lamináris boxban, steril körülmények között hajtottam végre a kísérleteket. A növénypatogén teszt baktériumok érzékenységét különféle szabványos, és a szakirodalomban közölt mikrobiológiai módszer alkalmazásával vizsgáltam. A mérések között megtalálható folyadék-fázisban és szilárd táptalajon elvégzett kísérlet is, melyek információt szolgáltatnak a jelentkező antimikrobiális hatás mértékét illetően.

3.1.1. Teszt baktériumok érzékenysége hagyományos antibiotikumokkal szemben

A CLSI szabvány előírásai alapján elkészített antibiotikum oldatokat 17 kiválasztott kórokozó törzsön teszteltem. Az elvégzett kísérletek eredményeit a 3.1. táblázat mutatja be. A 96-lyukú sejtenyészítő plate-eken az értékelés időpontjában a pozitív kontrollhoz viszonyítva hasonló sejtszaporulatot elérő minták esetében az adott antibiotikummal szemben egyértelműen rezisztensnek (R) jelöltem a teszt baktériumot. A szemmel látható, de kevésbé intenzív sejtszám-növekedés esetében mérsékelt rezisztens (MR) jelölést használtam. A további esetekben, amikor az inokulummal bejuttatott baktérium mennyiség nem volt képes reprodukcióra, az adott antibiotikum ellen érzékeny a teszt baktérium.

A kísérlet eredményei alapján természetesen nem lehet biztonsággal kijelenteni, hogy minden megállapított antibiotikum-rezisztencia általános jelleggel érvényes az adott törzsre nézve, hiszen egyrészt az *E. coli*-ra megállapított antibiotikum koncentrációkat alkalmaztam az összes teszt baktérium esetében, másrészt az O/N felnövesztett baktérium-inokulumok a törzsenként eltérő szaporodási sebességek miatt különféle kiindulási sejtszám-koncentrációkat

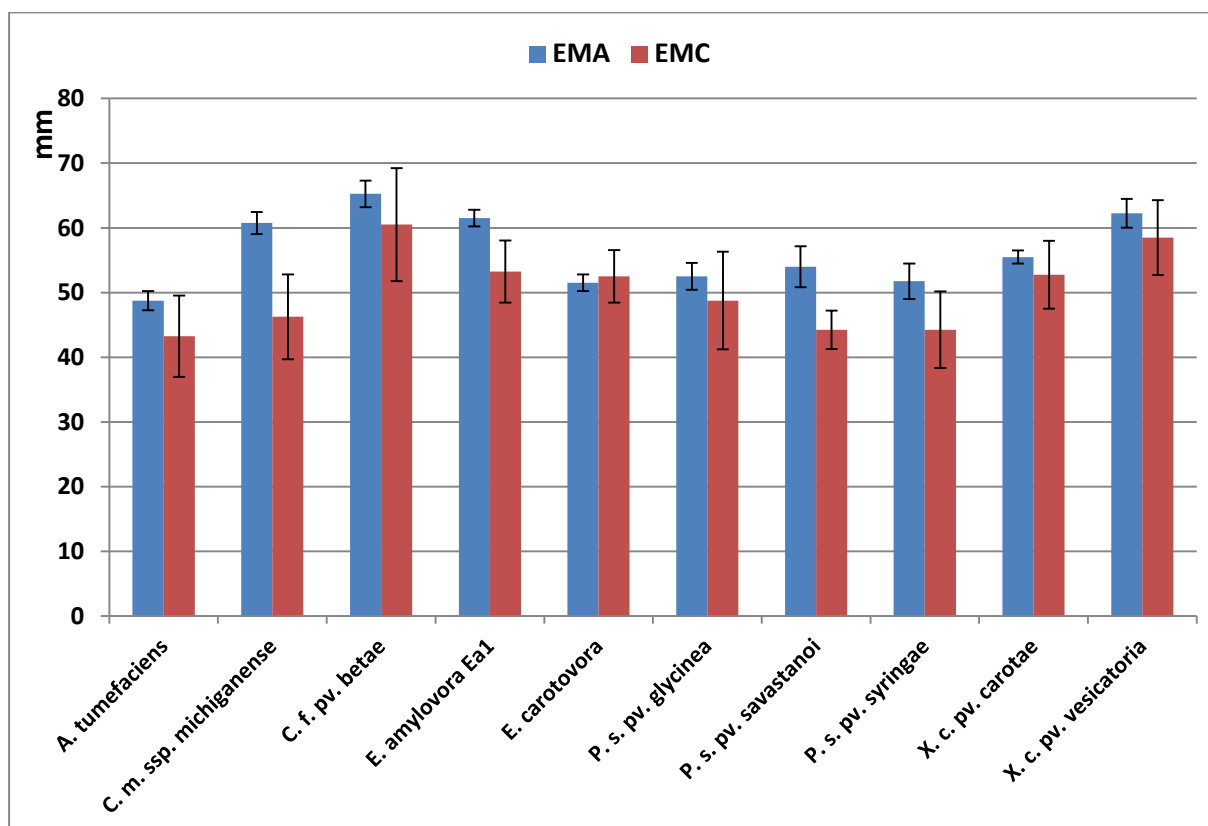
eredményeztek a 24 órás rázatás indításának időpontjában. A kapott adatokat mindezek figyelembe vételével szükséges értelmezni és elemezni.

**3.1. táblázat: Teszt baktériumok rezisztenciája antibiotikumokkal szemben
(R – rezisztens, MR – mérsékelt rezisztens)**

	GM	KM	STR	AM	CB	TET	CHL	NAL	RIF
<i>Clavibacter michiganense</i> <i>ssp. michiganense</i>			R					R	
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. betae</i>					R			R	
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	MR	R						R	MR
<i>Erwinia amylovora</i> Ea1									MR
<i>Erwinia amylovora</i> Ea88			R	R	R				
<i>Erwinia amylovora</i> Ea110				R	R				R
<i>Erwinia amylovora</i> EaCa11			R	R	R				
<i>Erwinia carotovora</i>								R	
<i>Pseudomonas corrugata</i>				R	R				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B1665				R	R		R	R	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B1969			R	MR	R		R	MR	
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. glycinea</i>								MR	MR
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. lachrymans</i>		R				MR		R	MR
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. morsprunorum</i>					R			MR	
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. savastanoi</i>	MR	R	MR			MR		R	R
<i>Ralstonia solanacearum</i> 1240				R	R		R	R	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>pv. phaseoli</i>			MR	R	R		MR	R	MR

3.1.2. Felülrétegzéses mérés

A felülrétegzéses teszt az élő EMA és EMC sejtek antibiotikum termelését és antagonizmusát bizonyítja. Ezáltal választ ad arra is, hogy a kiindulási baktérium kultúrában nem történt fázisváltás, azaz a primer sejtek termelik az antimikrobiális hatású anyagokat. A mérést 10 kiválasztott növénypatogén baktériumon végeztem el mindkét EPB törzssel.

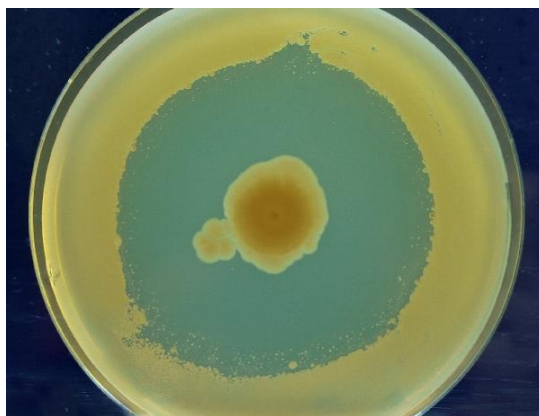


3.1. ábra: Felülrétegzéses mérés eredményei

Az eredményeket (inaktivációs zóna átmérője mm-ben megadva) a 3.1. ábra szemlélteti. Az összes tesztelt kórokozó érzékenynek bizonyult, minden esetben tisztán kivehető inaktivációs zóna volt megfigyelhető az értékelés időpontjában (3.2. ábra).

Három teszt baktérium esetében (*Clavibacter michiganense* ssp. *michiganense*, *Erwinia amylovora* Ea1 és *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*) az LBA lemez közepén lévő *X. budapestensis* szignifikánsan nagyobb méretű gátlási zóna kialakítására volt képes, mint a *X. szentirmai*. A legnagyobb inaktivációs zóna átmérő ($65,3 \pm 2,1$ mm) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae* tesztelése esetén adódott *X. budapestensis* entomopatogén baktériummal szemben.

Általánosságban megállapítható, hogy a *X. szentirmai* EPB törzs vonatkozó mérési eredményei nagyobb szórással adhatóak meg. Ennek oka az angol szakirodalomban „swarming motility” kifejezéssel hivatkozott jelenség, amely a baktériumkolónia gyors helyváltoztató mozgására utal. Ez a tulajdonság a két EPB törzs közül csak az EMC-re jellemző, következménye pedig, hogy az LBA lemez közepére kicseppentett sejtek telepet alkotva eltérő, sok esetben kiterjedtebb alakzatot formálnak, növelve ez által a gátlási zóna átmérőjét is.



3.2. ábra: *X. budapestensis* (EMA) antagonista hatása *E. amylovora* Ea1 növénypatogén baktériummal szemben felülrétegzéses tesztben

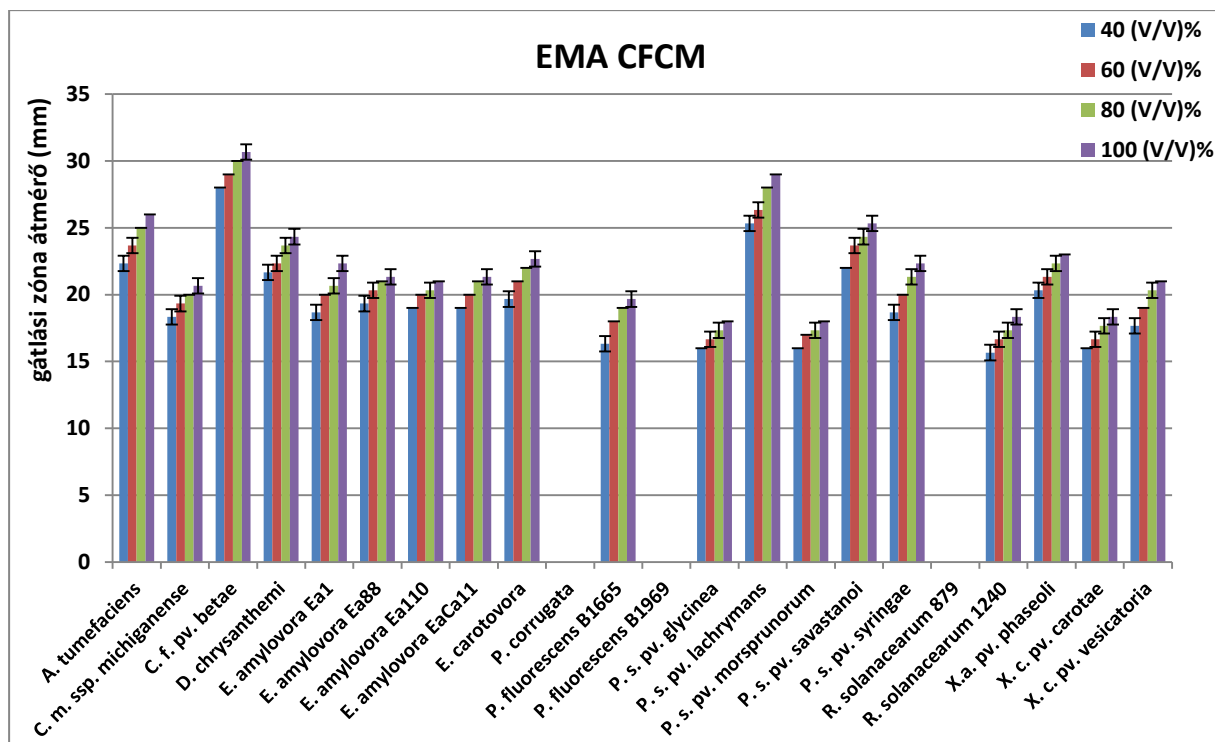
3.1.3. Agardiffúziós lyuk teszt

Agardiffúziós tesztben a baktérium sejtektől elválasztott folyadékok, illetve a további tisztítási eljárások segítségével előállított száraz minták vizes oldatainak antimikrobiális hatása is vizsgálható.

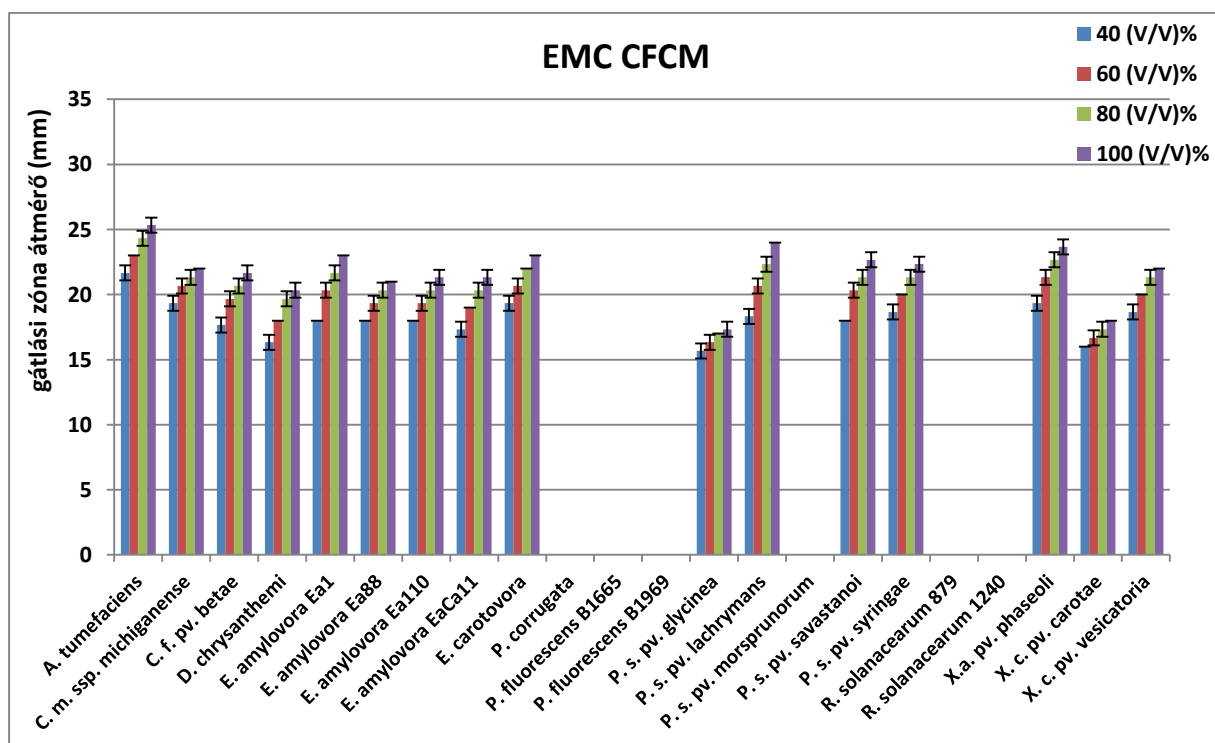
A mérést 22 teszt baktériumon végeztem el mindkét EPB törzs sejtmentes fermentleveinek hígításaival. Négy koncentrációban (40, 60, 80 és 100 (V/V)%) teszteltem az antimikrobiális hatású oldatokat. Az eredményeket (inaktivációs zóna átmérője mm-ben megadva) teszt baktériumok szerint csoportosítva ábrázoltam a CFCM oldatok térfogatszázalékos összetételének függvényében, külön diagramon az EMA és az EMC fermentlevek vonatkozásában (3.3. ábra és 3.4. ábra).

A teszt baktériumok közül az EMA CFCM 19, míg az EMC CFCM 16 törzs növekedését gátolta. Mindkét entomopatogén baktérium (EMA és EMC) sejtmentes fermentleve hatástalannak bizonyult három növénypatogén törzsszel szemben (*Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens* B1969, *Ralstonia solanacearum* 879). Ezen felül az EMC CFCM még további három kórokozó növekedését nem gátolta (*Pseudomonas fluorescens* B1665, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Ralstonia solanacearum* 1240).

A különböző CFCM koncentrációk közötti különbségek analízisére a Scheffé post hoc tesztet alkalmaztam, amely alapján a gátlási zóna átmérők mérete – azaz a kiváltott antibakteriális hatás erőssége – statisztikailag nem minden esetben dózis-függő. Két hasonló mértékű hígítás esetében gyakran nem kimutatható az eltérés az eredmények szórása miatt. Ennek ellenére az átlagértékek között határozott tendencia megnyilvánulása látható, egyértelmű dózis-függés állapítható meg.

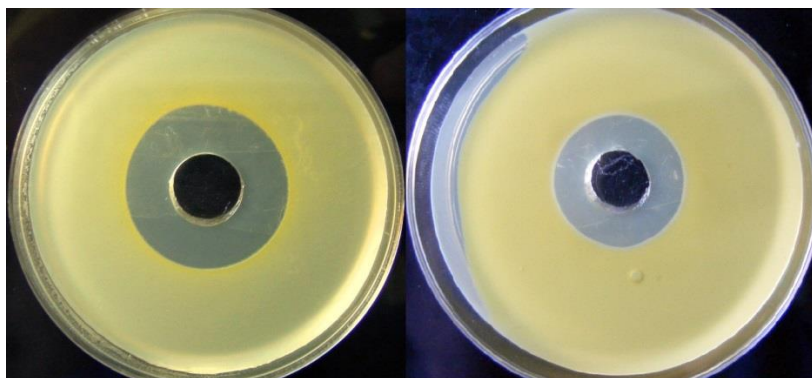


3.3. ábra: EMA CFCM mérési eredményei agardiffúziós tesztben



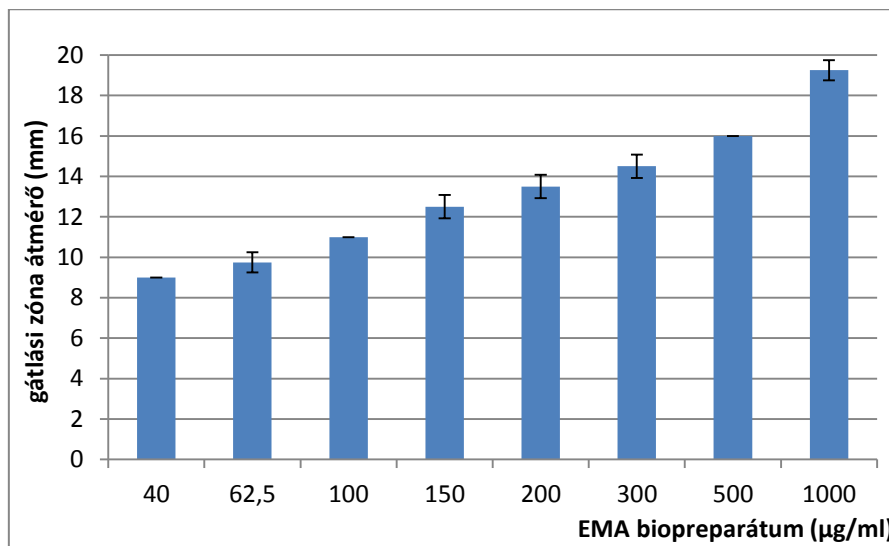
3.4. ábra: EMC CFCM mérési eredményei agardiffúziós tesztben

Az érzékeny teszt baktériumok esetében tisztán kivehető inaktivációs zóna volt megfigyelhető az értékelés időpontjában (3.5. ábra).



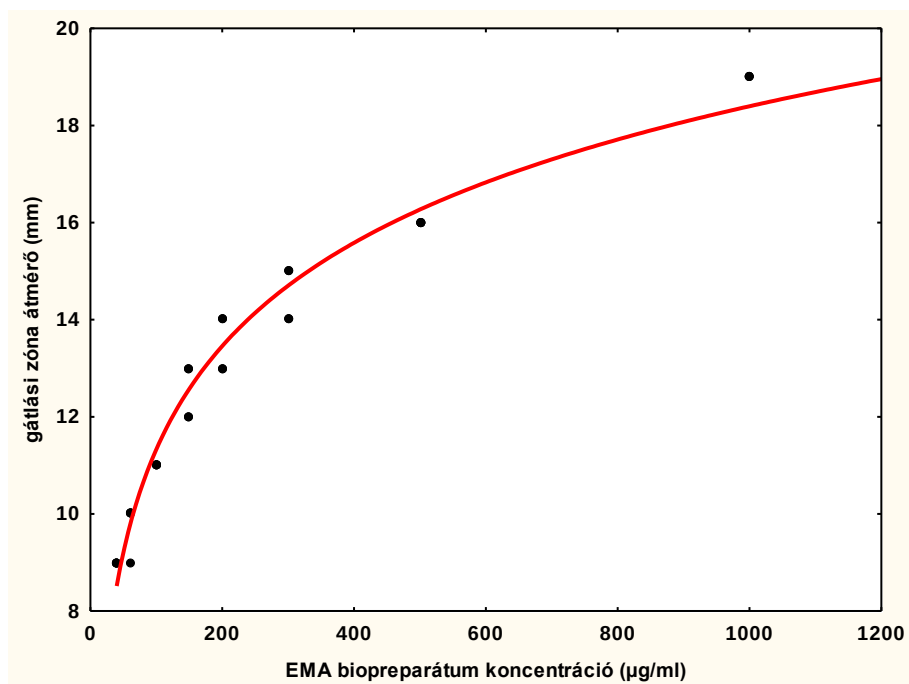
3.5. ábra: EMA (bal) és EMC (jobb) CFCM oldatok 40 (V/V)%-os hígításainak antibakteriális hatása agardiffúziós lyuk tesztben *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* teszt baktérium ellen

A *X. budapestensis* fermentlevek feldolgozásából nyert EMA biopreparátum szintén tesztelésre került agardiffúziós mérésben. A száraz minta egy részének steril desztillált vízben történő feloldásával egy tömény törzsoldat készült (5 mg/ml), amelyből további vizes hígítással hoztam létre a kísérletben használt munkaoldatokat (40, 62, 100, 150, 200, 300, 500, 1000 µg/ml). A mérést csak az *E. amylovora* Ea1 kórokozó törzsön végeztem el, amely a CFCM kísérletekben érzékenynek bizonyult. A mérési eredményeket a 3.6. ábra mutatja be.



3.6. ábra: EMA biopreparátum vizes oldatainak hatása agardiffúziós tesztben, *E. amylovora* Ea1 baktériummal szemben

Mivel ebben az esetben aktív szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva lehet megadni az oldatok koncentrációját, a mérés egyik fő célja a dózis-hatás összefüggés megállapítása volt.



3.7. ábra: Dózis-hatás összefüggés agardiffúziós tesztben

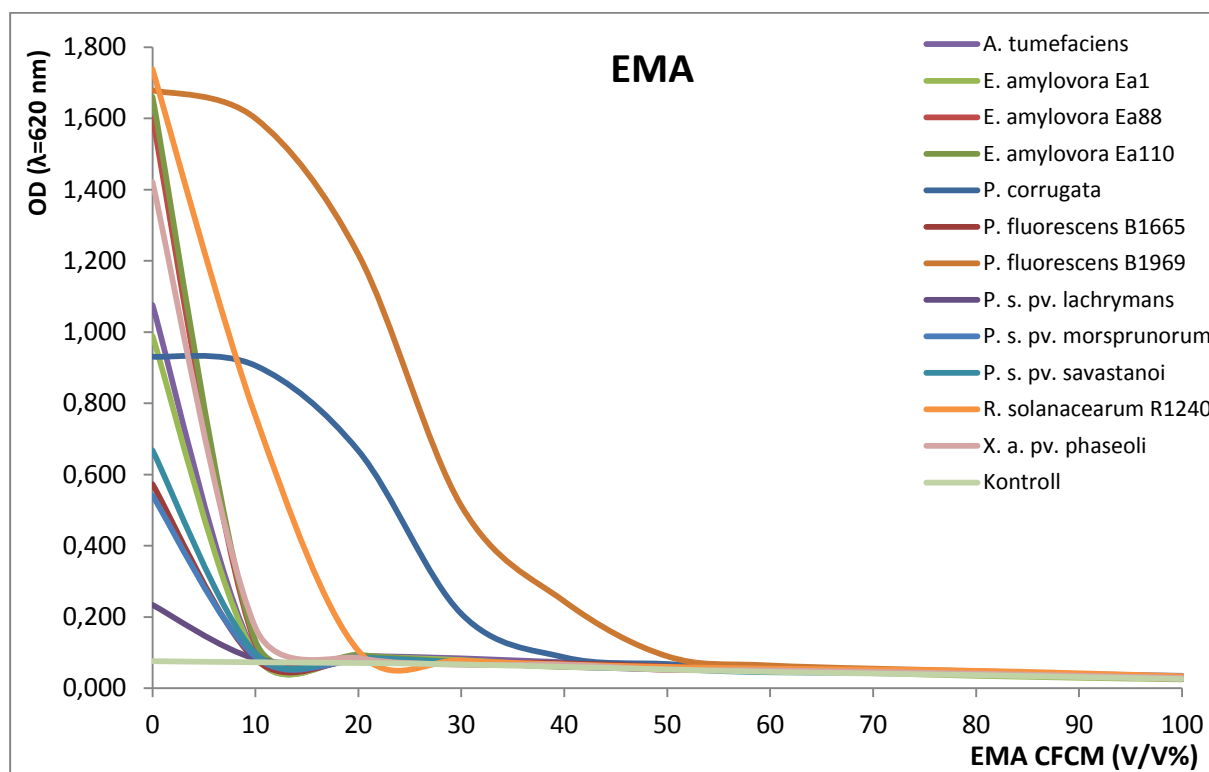
A legjobb illeszkedéssel logaritmikus korreláció állapítható meg az adatsorban (3.7. ábra). Ennek oka, hogy viszonylag széles koncentráció-tartomány került vizsgálat alá. Az 50 - 200 µg/ml közötti tartomány megközelítőleg lineárisnak tekinthető, azonban 500 µg/ml-nél töményebb oldatok esetén a módszer adottságaival kapcsolatos limitáló tényezők (pl. diffúziós gátlás) hatása egyre inkább érvényesül, a görbe telítési tartomány felé közelít magasabb koncentrációk esetén.

3.1.4. Baktericid hatás folyadék fázisban

Az EPB sejtektől elválasztott CFCM oldatok (EMA és EMC) baktericid hatását folyékony tápközegben 12 teszt baktérium ellen vizsgáltam. A különböző koncentrációjú CFCM oldatokat a mérés indításakor O/N felnövesztett kórokozó inokulummal oltottam be. A sejtszaporulatra kifejtett gátló hatás a 24 óra rázatás és inkubálás után mérhető optikai sűrűség alapján állapítható meg. A mérési eredményeket (az oldatok CFCM-tartalmának függvényében a kialakult optikai denzitás értékek) növénypatogén törzsenként eltérő színben ábrázolva a 3.8. ábra és a 3.9. ábra mutatja be.

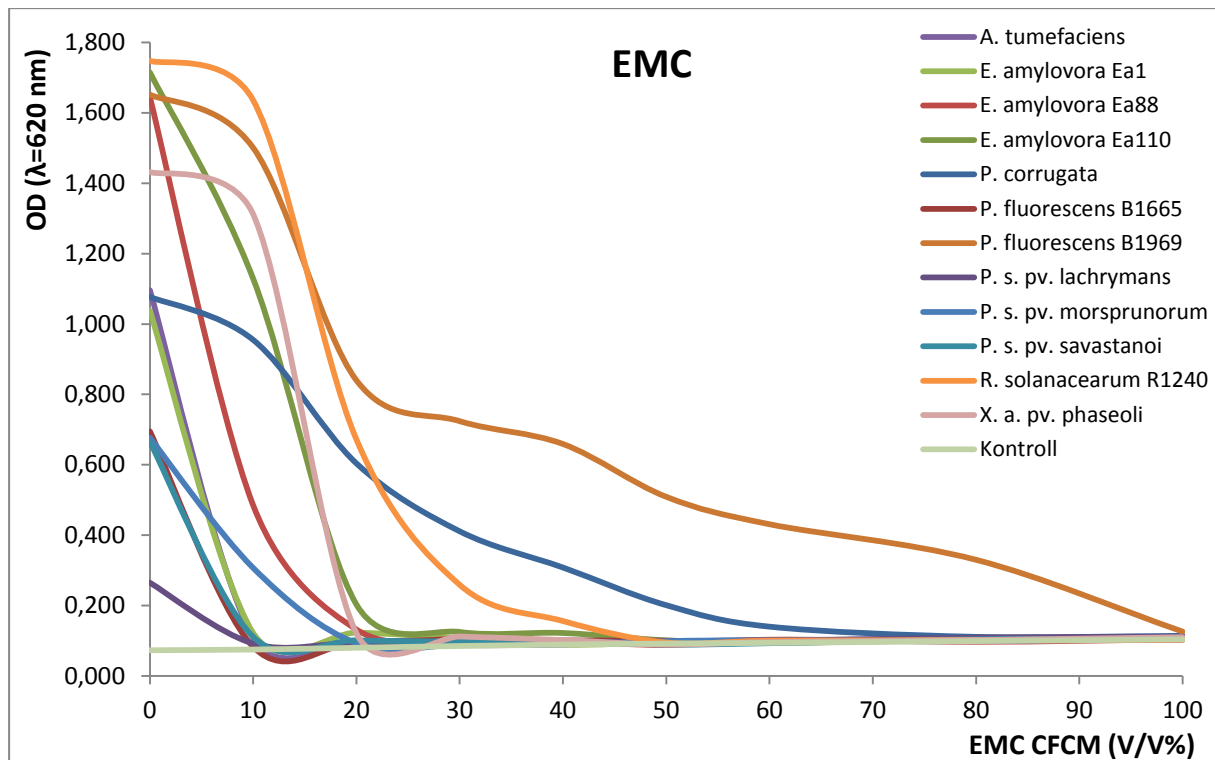
Az O/N felnövesztett teszt baktérium törzsek eltérő szaporodási sebességüknek és sejtméretüknek köszönhetően különböző optikai sűrűség elérését tudják megvalósítani. Az *Erwinia*, *Ralstonia* és *Xanthomonas* törzsekre magasabb abszorbancia érték volt jellemző

CFCM hiányában, míg a *Pseudomonas* törzsek – a *P. fluorescens* B1969 kivételével – esetében alacsonyabb volt az optikai sűrűség az értékelés időpontjában.



3.8. ábra: EMA CFCM baktericid hatása folyékony tápközegben

A *X. budapestensis* tenyészetből nyert EMA CFCM már 10 (V/V)%-os töménységben is képes volt gátolni a sejtek növekedését 9 teszt baktérium (*P. s. pv. lachrymans*, *P. s. pv. morsprunorum*, *P. fluorescens* B1665, *P. s. pv. savastanoi*, *A. tumefaciens*, *E. amylovora* Ea1, *E. amylovora* Ea88, *E. amylovora* Ea110 és *X. a. pv. phaseoli*) esetében. A *R. solanacearum* R1240 törzzsel szemben a teljes gátláshoz legalább 20 (V/V)% CFCM koncentráció volt szükséges. A *P. corrugata* és *P. fluorescens* B1969 növénypatogén törzsek az alacsonyabb CFCM-tartalommal rendelkező oldatokban közel azonos sejtszaporulatot értek el az antimikrobiális anyagot nem tartalmazó mintához viszonyítva, így ezek a törzsek ellenállónak tekinthetők az EMA hatóanyagaival szemben. A CFCM koncentráció növekedésével a hígító tápközeg (2xLB) aránya csökken, így a tápanyag-limitáció hatása egyre inkább érvényesül. Ez magyarázhatja, hogy az ellenálló kórokozókat tartalmazó minták optikai denzitásának értéke 40 (V/V)%-os CFCM-tartalom felett jelentősen csökken, a negatív kontrollhoz közelít.



3.9. ábra: EMC CFCM baktericid hatása folyékony tápközegben

A *X. szentirmaii* kultúrából készített EMC CFCM 10 (V/V)%-os koncentrációban 5 teszt baktérium (*P. s. pv. lachrymans*, *P. s. pv. savastanoi*, *P. fluorescens* B1665, *E. amylovora* Ea1 és *A. tumefaciens*) növekedését volt képes teljesen gátolni. További 4 növénypatogén baktérium (*P. s. pv. morsprunorum*, *E. amylovora* Ea88, *E. amylovora* Ea110, *X. a. pv. phaseoli*) ellen a 20 (V/V)%-os koncentráció bizonyult hatékonynak. Az EMC CFCM hatóanyagaival szemben ellenállónak tekinthető a *R. solanacearum* R1240, a *P. corrugata* és a *P. fluorescens* B1969 törzs.

A teljes CFCM koncentráció-tartományt tekintve további következtetéseket lehet levonni az abszorbancia adatok összekötésével megrajzolt görbék lefutása alapján. Figyelembe véve, hogy az előállított antimikrobiális hatású minták a szakirodalmi ismeretek szerint többféle, változatos hatásmechanizmussal rendelkező bioaktív komponenst is tartalmazhatnak, a CFCM oldatokat „hatóanyag-koktél”-ként érdemes kezelni. Ebben az esetben a *P. corrugata* és a *P. fluorescens* B1969 törzsekről biztonsággal megállapítható a kísérlet eredményei alapján, hogy az EMC CFCM oldat egyik összetevője nincs hatással a kórokozó szaporodására, hiszen a görbék szigorúan monoton csökkenő tendenciája a tápanyag-limitációval van összhangban. Azokban az esetekben, amikor az OD magas értékről hirtelen a negatív kontroll szintjére csökken (pl. *X. a. pv. phaseoli* 20 (V/V)% EMC CFCM mellett),

arról lehet szó, hogy egy (vagy több) aktív komponens elérte a gátláshoz szükséges küszöbdózis szintjét.

3.1.5. MID (maximális hatékony hígítás)

A MID definíció szerint a vizsgált antibakteriális hatású oldatnak az a legnagyobb hígítása, amelyben az adott teszt baktérium megfelelő tápközeg és környezeti körülmények biztosítása mellett is növekedésre képtelen. Az EMA és EMC CFCM oldatok MID értékeit az egyes tesztelt növénypatogén kórokozókkal szemben a 3.2. táblázat mutatja be.

3.2. táblázat: Teszt baktérium törzsek MID értékei EMA és EMC CFCM oldatokra

Teszt baktérium	MID (EMA CFCM)	MID (EMC CFCM)
<i>A. tumefaciens</i>	10	10
<i>E. amylovora</i> Ea1	10	10
<i>E. amylovora</i> Ea88	10	20
<i>E. amylovora</i> Ea110	10	20
<i>P. corrugata</i>	40	80
<i>P. fluorescens</i> B1665	10	10
<i>P. fluorescens</i> B1969	50	100
<i>P. s. pv. lachrymans</i>	10	10
<i>P. s. pv. morsprunorum</i>	10	20
<i>P. s. pv. savastanoi</i>	10	10
<i>R. solanacearum</i> R1240	20	50
<i>X. a. pv. phaseoli</i>	10	20

Az eredmény a CFCM-tartalomra vonatkoztatva térfogatszázalékban adható meg, így minél kisebb a MID értéke, annál nagyobb az adott teszt baktériummal szemben kifejtett gátló hatás.

3.1.6. MIC és MBC értékek

A minimális inhibíciós koncentráció (MIC) meghatározása általánosságban tekintve az egyik legalapvetőbb laboratóriumi mérés, amellyel egy antimikrobiális hatású anyag aktivitása mérhető egy organizmussal szemben [Turnidge, J. D., 2003]. Az EMA CFCM oldatokból további tisztítással előállított biopreparátum különböző hígításai a CLSI szabvány makrodilúciós módszere alapján kerültek tesztelésre *E. amylovora* Ea1 növénypatogén törzzsel szemben az antibakteriális aktivitás meghatározása céljából [CLSI, 2012].

Vizuálisan értékelve a mintákat a legkisebb gátló koncentráció, azaz a MIC értéke 8 µg/ml-nek adódott. A minták szélesztését követően néhány telep mégis képes volt növekedni LBA lemezekben ebben a koncentrációban, így a minimális baktericid koncentráció (MBC) eredménye az eggyel nagyobb tesztelt koncentrációként, 16 µg/ml értéken került meghatározásra. Megállapítható, hogy nincs jelentős különbség a hatékony MIC és MBC értékek között, így a kiváltott hatás inkább baktericidnek tekinthető, mint bakteriosztatikusnak.

3.2. *In vivo* vizsgálati módszerek

A kutatómunka ezen szakaszában az *in vitro* kísérletek alapján némileg erősebb antimikrobiális hatást kiváltó *X. budapestensis* EPB törzs, illetve a baktérium sejtektől elválasztott EMA CFCM oldatok és az EMA biopreparátum desztillált vizes oldatainak tesztelése történt. A vizsgálatokat olyan gazdanövényeken végeztük el, amelyek potenciálisan veszélyeztetettek az adott károsítóval szemben. Megfelelő védekezési módszer hiányában az újfajta növényvédelmi célú készítmények fejlesztése esetükben indokolt és megalapozott.

Az *E. amylovora* és a *R. solanacearum* baktériumokra egyaránt karantén előírások érvényesek Magyarországon, ezért szabadföldi kísérletek végzése nem engedélyezett. A vizsgálatokat ebből az okból kifolyólag laboratóriumi körülmények között, szeparáltan hajtottuk végre alma virágzatokon és mikroszaporított burgonya növényeken, különös figyelmet fordítva a fertőzött növények és anyagok ártalmatlanítására, fertőtlenítésére a kísérletek végeztével.

Az előállított minták antimikrobiális hatása mellett a védendő növényeken tapasztalható fitotoxikus tünetek értékelése, tanulmányozása is megvalósult.

3.2.1. Hatékonyság mesterségesen fertőzött alma virágokon tűzelhalás ellen

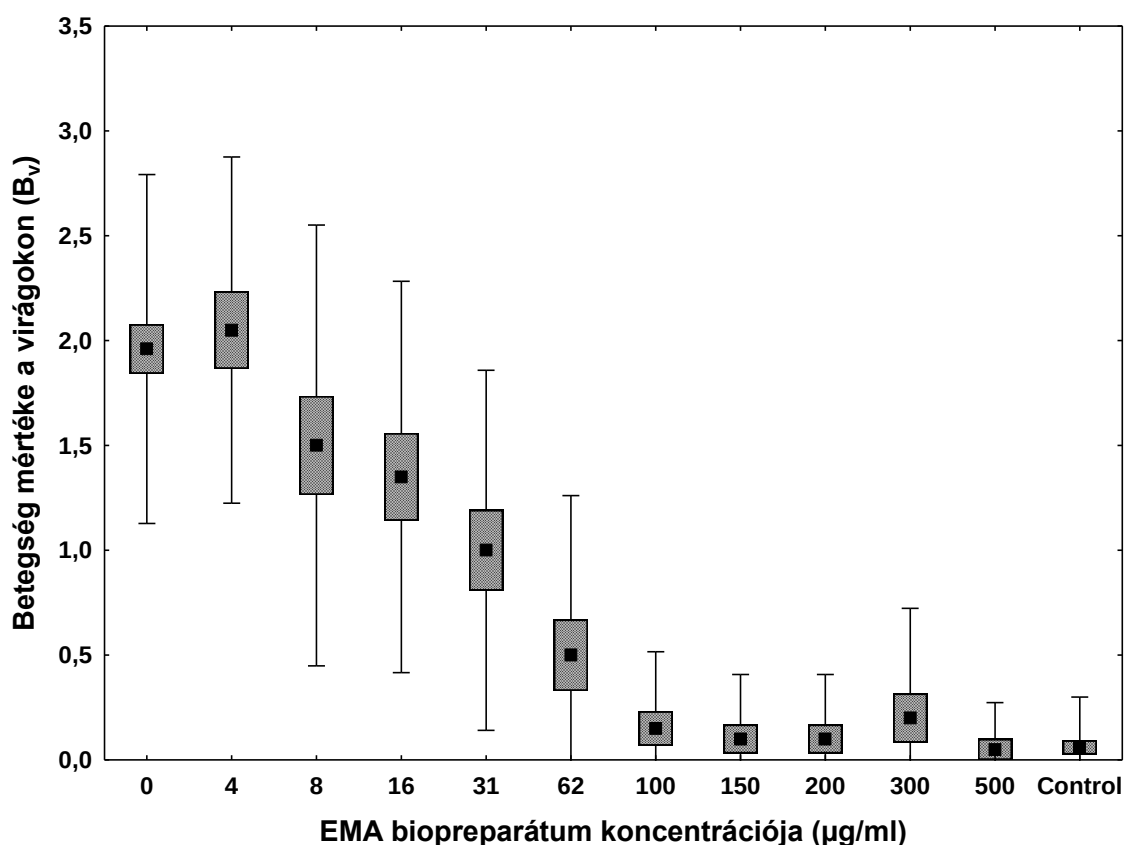
Előzetes kísérletek során bizonyítást nyert, hogy a hígítatlan EMA CFCM oldat ártalmas alma virágzatra. Kézi permetezővel történő kezelés barnulást, nekrotikus tüneteket, a szövetek elhalását okozta a virágokon. Érdekes megjegyezni, hogy a sejtmentes fermentlében olyan anyagok jelenléte is feltételezhető, amelyek a mikrobiális növekedést gátolják, illetve látszólagos biológiai hatással rendelkeznek, azonban nem nevezhetőek a klasszikus értelemben véve antibiotikus hatású komponenseknek. Ezek a vegyületek általában nem közvetlenül fejtik ki hatásukat a sejtekre, hanem valamilyen egyéb tényező megváltoztatásán keresztül (pl. pH eltolás) [Baell, J., 2014]. A tervezett *in vivo* kísérletben ezért a további tisztítási folyamatoknak alávetett EMA biopreparátum került tesztelésre az *E. amylovora* Ea1 törzsszel szemben.

A tisztított biopreparátum hatásosságát az alma virágzatok értékelése alapján számszerű adatokkal a 3.3. táblázat mutatja be.

3.3. táblázat: EMA biopreparátum hatásossága alma virágzatokon

Kezelés		Értékelés					
Elő-kezelés: EMA bioprep. koncentrációja (µg/ml)	Fertőzés: Ea1 inokulum 5×10 ⁸ CFU/ml	Fertőzési index (f _i)				B _v	Ea1 sejtek átlagos száma (CFU/virág)
		0	1	2	3		
		Fertőzési index gyakorisága (n _i)					
0	10 µl	4	6	28	12	1.96	1.0×10 ⁷
4	10 µl	1	3	10	6	2.05	8.4×10 ⁶
8	10 µl	3	9	3	5	1.50	6.2×10 ⁶
16	10 µl	3	10	4	3	1.35	5.4×10 ⁶
31	10 µl	6	9	4	1	1.00	2.8×10 ⁶
62	10 µl	13	4	3	0	0.50	6.5×10 ⁵
100	10 µl	17	3	0	0	0.15	1.1×10 ⁵
150	10 µl	18	2	0	0	0.10	5.0×10 ⁴
200	10 µl	18	2	0	0	0.10	6.3×10 ⁴
300	10 µl	17	2	1	0	0.20	1.4×10 ⁵
500	10 µl	19	1	0	0	0.05	3.8×10 ⁴
Kontroll	-	47	3	0	0	0.06	0

Az azonos kezelési csoportba tartozó virágok összefüggésében a betegség mértékének (B_v) számítása a Bertrand-Gottwald formula alapján történt [Bertrand, P. F., 1978]: $\sum f_i \times n_i / n$, ahol f_i jelöli a tünetek erőssége alapján megállapított fertőzési indexet, n_i az egyes fertőzési indexhez tartozó gyakoriságot adja meg, míg n az adott kezelési csoportba tartozó összes virág száma. A különböző kezelések összehasonlítása a virágokon észlelt tűzelhalásra jellemző tünetek alapján egy 0-tól 3-ig terjedő skálán történt, így parametrikus tesztek nem használhatóak statisztikai analízis céljára. A kezelési módok átfogó összehasonlítását ebből az okból a nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszt alkalmazásával végeztem. Az eredményeket a 3.10. ábra szemlélteti.



3.10. ábra: EMA biopreparátummal történő preventív kezelés hatása előzőleg *E. amylovora* Ea1 teszt baktériummal mesterségesen fertőzött alma virágokon

Az adott körülmények között preventív kezelésnek alávetett és előzőleg mesterségesen *E. amylovora* Ea1 törzsszel fertőzött Watson Jonathan alma virágokon 62 µg/ml és annál nagyobb EMA hatóanyag dózisok esetében szignifikánsan csökkent a fertőzési indexhez tartozó gyakoriság (a virágokon észlelhető tűzelhalás tünetek mértéke) a negatív kontrollhoz (desztillált vízzel kezelve) viszonyítva, és szignifikánsan nem különbözik a pozitív

kontrollhoz képest (nem fertőzött Ea1 törzsszel). A 300 µg/ml és annál nagyobb töménységben történő kezelések azonban nekrotikus tüneteket, apró barna foltokat okoztak az alma virágzatok szíromlevelein (3.11. ábra).



3.11. ábra: 300 µg/ml EMA biopreparátummal kezelt, *E. amylovora* Ea1 baktériummal fertőzött virágok az értékelés időpontjában

Az Ea1 baktérium sejtek átlagos számának meghatározása (CFU/virág) a kísérleti növényanyag feldolgozásával történt, majd a visszaizolálható és morfológia alapján beazonosítható *E. amylovora* telepek számlálásán alapult. A virág mintákból kezelési csoportonként vizes extraktumot képeztem, majd többféle hígításban, 2-2 párhuzamos alkalmazásával LBA lemezeken szélesztve, 48 óra inkubálást követően került sor az értékelésre. Szignifikáns korreláció állapítható meg ($p < 0,05$) az EMA biopreparátum dózisok között a virág mintákból visszaizolált életképes Ea1 sejtek száma alapján. Mindamellet fontos megjegyezni, hogy az adatsor szórása viszonylag nagy, az illeszkedés nem tökéletes ($r = -0,56$), amely jelzi a módszer hiányosságait. Mindazonáltal, kiegészítő vizsgálatként a metodika alkalmasnak bizonyult az életképes kórokozó sejtszám nagyságrendbeli változásának kimutatására.

3.2.2. Fertőzési kísérlet burgonya növényeken

A fertőzési kísérlet annak megállapítására szolgált, hogy az adott körülmények között mekkora az a *R. solanacearum* sejtszám-koncentráció, amely esetében a mikroszaporított burgonya növényeken a baktériumos barna rothadás betegség tünetei egyértelműen

jelentkeznek. A vizsgálat értékelését az alma virágok esetében alkalmazott Bertrand-Gottwald formula adaptálásával végeztem el [Bertrand, P. F., 1978].

A kémcsövekben összemért teszt baktérium oldatokban elhelyezkedő mikroszaporított burgonya növényeken 3 különböző időpontban történt a fertőzési indexek megállapítása, amely alapján a B_n érték meghatározásra került az egyes kezelési csoportokra (3.4. táblázat).

3.4. táblázat: Kísérleti burgonya növények állapota alapján meghatározott B_n értékek a *R. solanacearum* fertőzési kísérletben

<i>R. solanacearum</i> R1240 sejtszám (CFU/ml)	6×10^8	3×10^8	$1,5 \times 10^8$	6×10^7	6×10^6	6×10^5	6×10^4	Kontroll
B_n (3 nap)	1,75	1,25	0,75	0	0	0	0	0
B_n (6 nap)	2,25	2	1,5	0,5	0	0	0	0
B_n (18 nap)	3	3	3	3	0,75	0,25	0,25	0,12

Az adatok alapján 6×10^7 CFU/ml és annál nagyobb *R. solanacearum* R1240 baktérium sejtszám esetében szignifikánsan növekedett a fertőzési indexhez tartozó gyakoriság (a növényeken észlelhető baktériumos barna rothadás tünetek mértéke) a kontrollhoz (sterilizált csapvízbe merítve a növényeket) viszonyítva, 18 nap kezelést követően.

Az EMA CFCM oldat különböző fokú hígításainak teszt baktériumra kifejtett baktericid hatását az idő függvényében külön kísérletben vizsgáltam. A *R. solanacearum* inokulum LBA lemezen előzőleg felnövesztett telepekből steril csapvízzel lemosva készült, majd telepszámlálós módszerrel került meghatározásra az oldat sejt-koncentrációja, amely $4,8 \times 10^8$ CFU/ml-nek adódott. A 6-lyukú sejttenyésztő plate-eken összemért EMA CFCM oldatok (2.8. táblázat) beoltása 2-2 ml tömény *R. solanacearum* R1240 inokulummal történt, így a 8-8 ml végtérfogatokban $1,2 \times 10^8$ CFU/ml teszt baktériumot tartalmaztak a minták, amely a fertőzési kísérlet eredményei alapján a betegségre jellemző kórképet okozták a kísérleti növényeken az adott körülmények között. Összemérést követően az oldatok inkubálás mellett rázatásra kerültek, majd 5 eltérő időpontban történtek a mintavételek. Az LBA lemezek szétosztott mennyiségekből kialakult baktérium telepek száma alapján az adott kezelési időpontban jelenlévő életképes *R. solanacearum* sejtszám-koncentráció (CFU/ml) került meghatározásra, melyet a 3.5. táblázat mutat be.

3.5. táblázat: EMA CFCM oldatok baktericid hatásának nyomonkövetése folyadék közegben *R. solanacearum* R1240 teszt baktériummal szemben

EMA CFCM (V/V)%	0	5	10	15	20	25
2 óra után (CFU/ml)	pázsit	$4,65 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	2×10^4
4 óra után (CFU/ml)	pázsit	$4,05 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$	6×10^4	$2,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
6 óra után (CFU/ml)	pázsit	$3,4 \times 10^5$	7×10^4	4×10^4	$1,65 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$
8 óra után (CFU/ml)	pázsit	8×10^4	10^4	$1,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$	-
24 óra után (CFU/ml)	pázsit	$2,5 \times 10^4$	-	-	-	-

- : nem kimutatható

EMA CFCM (V/V)%	30	35	40	45	50	75
2 óra után (CFU/ml)	10^4	10^4	-	5×10^3	5×10^3	5×10^3
4 óra után (CFU/ml)	5×10^3	-	-	-	-	-
6 óra után (CFU/ml)	$2,5 \times 10^3$	-	-	$2,5 \times 10^3$	5×10^2	-
8 óra után (CFU/ml)	-	-	-	-	-	-
24 óra után (CFU/ml)	-	-	-	-	-	-

- : nem kimutatható

Az adatok alapján megállapítható, hogy a *X. budapestensis* sejtmentes fermentleve erős citotoxikus hatást fejt ki a kórokozó *R. solanacearum* R1240 törzsének sejtjeire. A baktérium sejtszám csökkenése már 2 órás kezelés során is kvantitatíve kimutatható, a változás mértéke több mint két nagyságrend 5 (V/V)% EMA CFCM koncentráció esetében. 8 órás kezelés esetén a baktericid hatás csaknem teljes, 24 órás kezelés után pedig teljes, 10 (V/V)% és annál nagyobb dózisok esetén.

3.2.3. Előállított minták fitotoxikus hatása

A *X. budapestensis* kultúrából előállított EMA CFCM oldat kísérleti burgonya növényekre gyakorolt hatásának, toxikusságának vizsgálata a fertőzési kísérletben alkalmazott módszerrel történt, a növényeket különböző hígítású mintákban elhelyezve.

A kísérleti növények kondíciója 3, 6 és 18 nap elteltével került értékelésre, majd a középértékek meghatározásával az egyes kezelési csoportok átlagos állapot-romlása számszerűsíthető (3.6. táblázat).

3.6. táblázat: EMA CFCM oldat fitotoxikus hatásának vizsgálata alapján megállapított értékek mikroszaporított burgonya növényeken

EMA CFCM (V/V)%	100	75	50	40	30	20	10	Kontroll
3 nap után	0,75	0,25	0	0	0	0	0	0
6 nap után	2,25	2,5	1,75	1,5	1	0,25	0	0
18 nap után	3	3	3	3	3	3	1,75	0

0: tünetmentes, 1: 30%-ig barnult növény (hervadás, száron és a felső leveleken barnulás megjelenése), 2: 60%-ig barnult növény (teljes hervadás, levelek többsége elhalt), 3: 100%-ig barnult növény

Az eredmények alapján megállapítható, hogy 3 nap elteltével csak a tömény sejtmentes fermentlében elhelyezett növényeken volt tapasztalható enyhe károsodás. 6 nap után a 20 (V/V)% és annál hígabb minták esetében továbbra sem mutatkozott szignifikáns eltérés a kontroll növényekhez viszonyítva, azonban 18 nap eltelte után - a 10 (V/V)% alsó tesztelt értékkel kezelték és a kontroll kivételével - az összes növény elpusztult. E késeltetett fitotoxikus hatás feltehetőleg a *X. budapestensis* anyagcseretermékeinek (antimikrobiális hatású vegyületek mellett különféle toxinok és enzimek) felhalmozódásával és a komponensek egy részének lassú lebomlásával magyarázható. A CFCM oldat összetevői tehát tartalmaznak olyan elemeket, amelyek a gyökérszónán keresztül felszívódva burgonya növény károsodását idézhetik elő.

3.3. Analitikai vizsgálatok

A peptidek és proteinek nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiával (HPLC) történő elválasztását követően azonosításuk legprecízebben tömegspektroszkópiás módszerrel végezhető el [Herraiz, T., 1997]. Jóllehet, ez egy meglehetősen drága módszer.

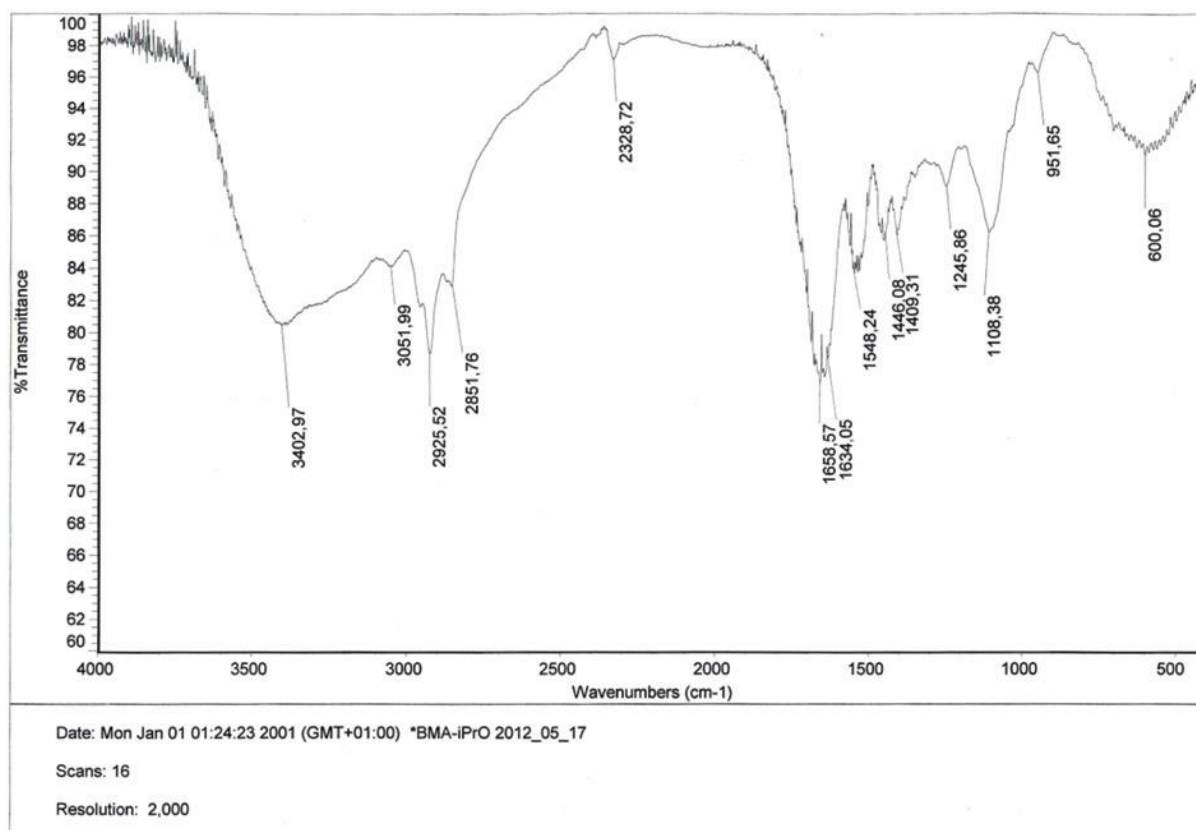
Alacsony hullámhosszon (<220 nm) az abszorbancia alapján detektálhatóak peptid kötések és aminosav oldalláncok nanomól és pikomól közötti kimutatási határ mellett. Az aromás

oldallánccal rendelkező peptidek (fenilalanin (Phe), tirozin (Tyr) és triptofán (Trp)) 254 és/vagy 280 nm hullámhosszon detektálhatóak. Ebből adódóan felvettük az antimikrobiális hatású minták UV spektrumait. A mérések eredményeit a 3.7. táblázat mutatja be.

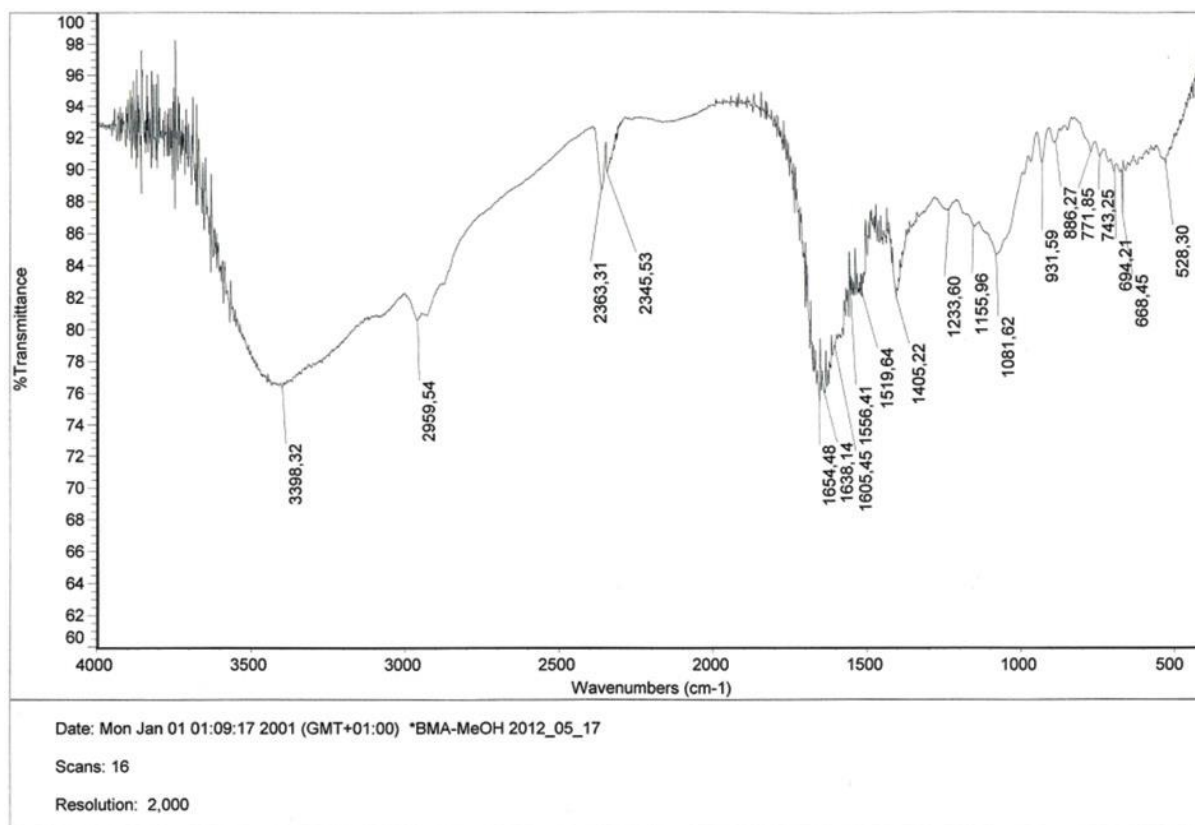
3.7. táblázat: Tisztított minták UV abszorbanciája (nm)

EMA		EMC	
<i>i</i> PrOH	MeOH	<i>i</i> PrOH	MeOH
201	203	200	202
213	218	-	217

Az FT-IR spektrumok felvétele a 2.2.8 fejezetben leírt módon történt. Az eredmények az alábbi ábrákon láthatóak a forrás EPB törzsek (EMA és EMC), illetve az oldószerek (cc. MeOH + HCl, *i*-PrOH) különböző kombinációinak vonatkozásában (3.12. ábra, 3.13. ábra, 3.14. ábra, 3.15. ábra).



3.12. ábra: Tisztított EMA biopreparátum *i*-PrOH frakciója

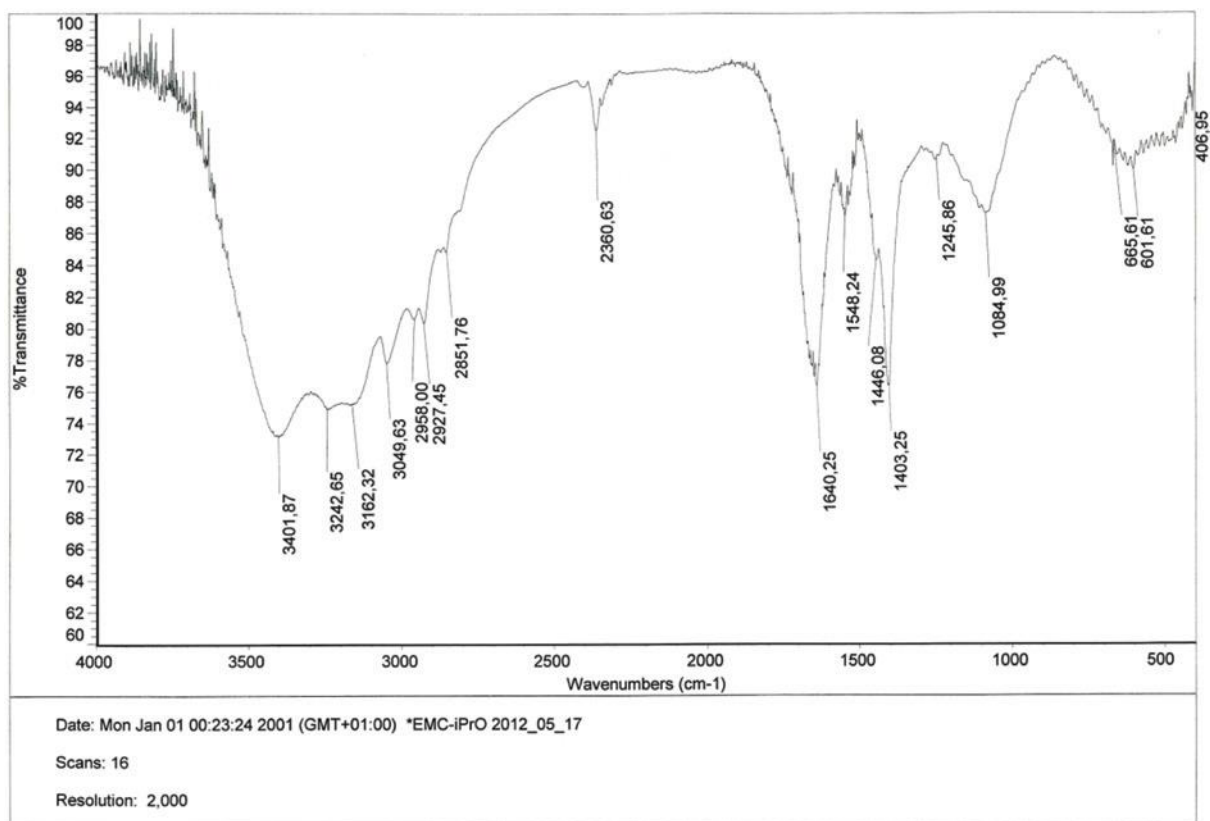


3.13. ábra: Tisztított EMA biopreparátum MeOH frakciója

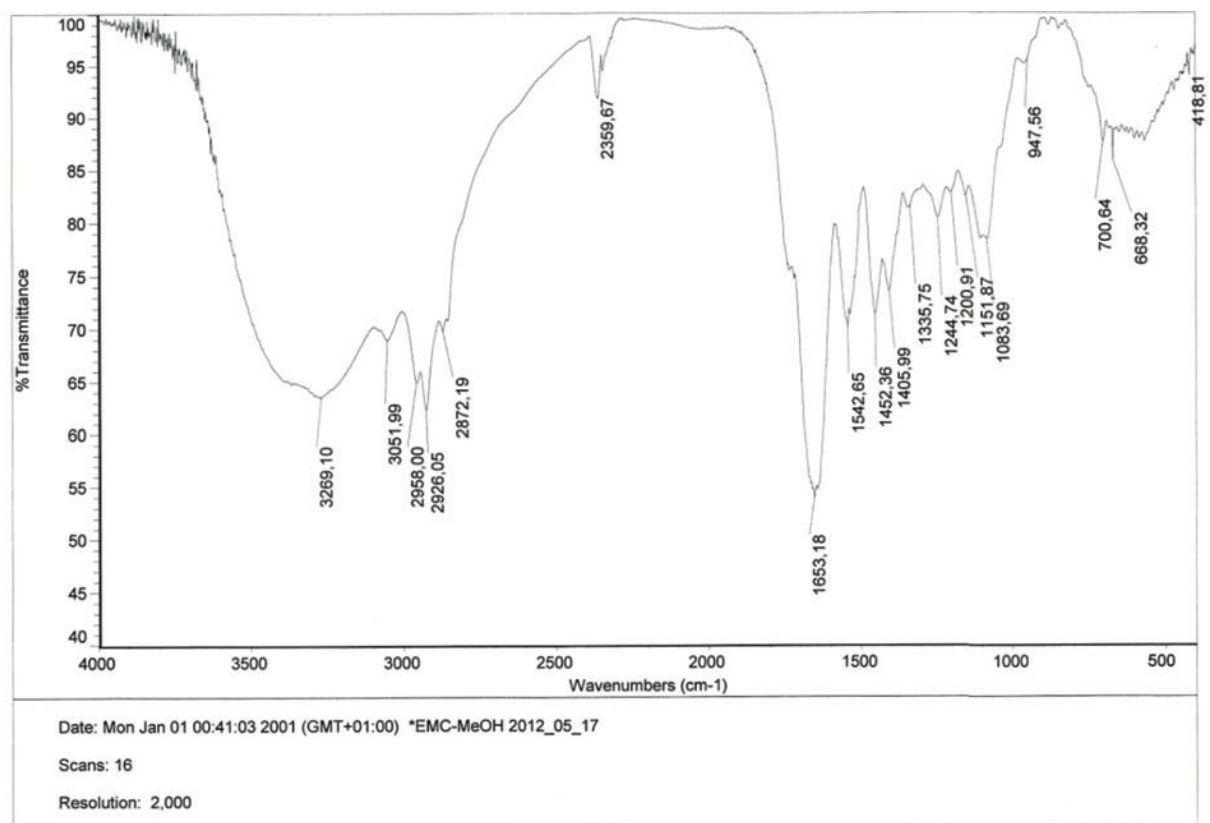
Aminosavak esetében csak két oldallánc csoport elnyelése valósul meg abban a színekép-sávban, amely más csoportokkal történő átfedésektől mentes, és így alkalmas lehet egyértelmű konzekvencia levonására további kísérletek elvégzése nélkül is. Ezek a cisztein SH csoportja ($2550\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$), valamint a protonált karboxil csoportok karbonil csoportja ($1710\text{--}1790\text{ cm}^{-1}$). Ezek a csoportok a minták elemzéséből kapott FT-IR spektrumok egyikén sem voltak kimutathatóak.

Az összes többi oldallánc elnyelése átfedésben van más oldalláncok vagy a polipeptidlánc elnyelésével, így további kiegészítő vizsgálatok szükségesek, hogy a színeképekben előforduló elnyelési sávok egyértelműen hozzárendelhetők legyenek specifikus oldallánc csoportokhoz a kötési és csoportfrekvenciák karakterisztikus hullámszámai alapján.

Megfelelő elválasztás-technika alkalmazásának hiányában, csupán az FT-IR spektrumok értelmezése alapján valóban nem azonosíthatók egyértelműen sem egyedi komponensek, sem peptideken található oldalláncok. A mintákban az egyes kötési és csoportfrekvenciák elnyelési sávjai alapján feltételezhetők bizonyos aminosav oldalláncok jelenléte, azonban ezek a megállapítások egyértelmű kijelentéseket nem tesznek lehetővé.



3.14. ábra: Tisztított EMC biopreparátum *i*-PrOH frakciója



3.15. ábra: Tisztított EMC biopreparátum MeOH frakciója

A glutamin oldalláncok $\nu(\text{C=O})$ rezgése 1680 cm^{-1} körül erősen abszorbeál az infravörös tartományban, az elnyelési sáv érzékeny a H-kötésre, és minél alacsonyabb az elnyelési sáv pozíciója, annál erősebb a H-kötés.

A glutamát deprotonált karboxil csoportjának $\nu(\text{C=O})$ rezgése két erős elnyelési sávot mutat 1400 és 1570 cm^{-1} közelében, ezek a szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgéseket jelölik.

A hisztidin $\nu(\text{CN})$ rezgése egy további jól használható elnyelési sáv 1100 cm^{-1} közelében.

A tirozin viszonylag erős infravörös abszorber, poláris karakterének köszönhetően. A legélesebb elnyelési sávok a $\nu(\text{CC})$, a $\nu(\text{C-O})$ és a $\delta(\text{COH})$ rezgésekből származnak, sorban az 1517 , a $1235\text{-}1270$ és a $1169\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ tartományban (3.8. táblázat és 3.9. táblázat).

3.8. táblázat: Tisztított EMA preparátum különböző oldószer frakcióinak FT-IR spektruma

Elnyelési sáv pozíciója (cm^{-1})		Azonosítható csoport
<i>i</i> -PrOH	MeOH	
1659	1654	glutamin ($\nu(\text{CO})$ proteinekben $1659\text{-}1696\text{ cm}^{-1}$)
1634	1638	hisztidin ($\nu(\text{C=C})$ proteinekben 1617 cm^{-1})
-	1605	tirozin ($\nu(\text{CC})$ gyűrű proteinekben 1615 cm^{-1})
1548	1556	glutamin ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ proteinekben $1553\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$)
-	1520	tirozin ($\nu(\text{CC})$ gyűrű, $\delta(\text{CH})$ proteinekben $1516\text{-}1518\text{ cm}^{-1}$)
1446	-	lizin ($\delta(\text{CH}_2)$ proteinekben 1445 cm^{-1})
1409	1405	glutamin ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ proteinekben $1397\text{-}1424\text{ cm}^{-1}$)
1246	1234	tirozin ($\delta(\text{COH})$ proteinekben $1228\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$)
1108	1082	hisztidin ($\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CH})$ proteinekben $1094\text{-}1114\text{ cm}^{-1}$)

Amíg a $\delta_{as}(\text{CH}_3)$, a $\delta(\text{CH}_2)$ és a $\delta_s(\text{CH}_3)$ rezgések elnyelési sávjai 1465, 1450 és 1375 cm^{-1} közelében viszonylag jól detektálható csoportfrekvenciák, a $\delta(\text{CH})$ és a $\gamma(\text{CH}_2)$ rezgések már gyakran átfedésben vannak más csoportok elnyelési sávjaival. Csupán a számottevő infravörös elnyeléssel rendelkező triptofán azonosítható a 1334 és 1455 cm^{-1} hullámszámoknál észlelt abszorbancia alapján (3.8. táblázat és 3.9. táblázat).

3.9. táblázat: Tisztított EMC preparátum különböző oldószer frakcióinak FT-IR spektruma

Elnyelési sáv pozíciója (cm^{-1})		Azonosítható csoport
<i>i</i> -PrOH	MeOH	
-	1653	glutamin ($\nu(\text{CO})$ proteinekben 1659-1696 cm^{-1})
1640	-	hisztidin ($\nu(\text{C}=\text{C})$ proteinekben 1617 cm^{-1})
1548	1542	glutamin ($\nu_{as}(\text{COO}^-)$ proteinekben 1553-1575 cm^{-1})
1446	1452	triptofán ($\nu(\text{CHb})^a$, $\nu(\text{CCb})^a$, $\nu(\text{CN})$ proteinekben 1455 cm^{-1}) / lizin ($\delta(\text{CH}_2)$ proteinekben 1445 cm^{-1})
1403	1406	glutamin ($\nu_s(\text{COO}^-)$ proteinekben 1397-1424 cm^{-1})
-	1336	triptofán ($\nu(\text{CCp})^a$, $\nu(\text{CN})$ proteinekben 1334 cm^{-1}) / lizin ($\gamma(\text{CH}_2)$, $\gamma(\text{CH}_2)$ proteinekben 1345 cm^{-1})
1246	1245	tirozin ($\delta(\text{COH})$ proteinekben 1228-1250 cm^{-1})
-	1201	triptofán ($\nu(\text{CC})$, 1203 cm^{-1})
-	1152	prolin ($\gamma(\text{CH}_2)$, 1168 cm^{-1})
1085	1084	hisztidin ($\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CH})$ proteinekben 1094-1114 cm^{-1})

“b” és “p” jelöli a benzol és pirrol csoportokat.

4. Összefoglalás

A doktori munkámban entomopatogén baktériumokkal végeztem számos kísérletet, növényi kórokozók elleni védekezés céljából. A szakirodalmi adatok alapján kiválasztott EPB törzsek anyagcseretermékeinek antimikrobiális hatása élő sejtek segítségével, valamint a fermentlevek feldolgozásával különböző tisztítottsági fokú, sejtektől elválasztott minták tesztelésével is meghatározásra került. A dolgozat és a doktori munka célja, hogy megvizsgáljam két olyan baktérium (*Xenorhabdus budapestensis* és *X. szentirmaii*) növényvédelmi célokra történő hasznosításának lehetőségét, amelyek a külföldi szakirodalomból és a hazai kutatásokból egyaránt ismertek, valamint publikációk sora bizonyítja, hogy bioaktív metabolitok széles skálájának termelésére képesek. A kísérletek tárgyköre a mikrobiológiai tesztek mellett kiterjedt a laboratóriumban végezhető növénykísérletekre, valamint a fermentlevekből kinyert preparátumok analitikai vizsgálatára is.

A teszt baktériumok általános érzékenységét 9 különböző hagyományos antibiotikummal szemben vizsgálva az a következtetés vonható le, hogy az *E. coli*-ra megállapított antibiotikum koncentrációk esetében a kiválasztott kórokozók mindegyike egy vagy több komponensre rezisztens, illetve mérsékelten rezisztens.

A felülrétegzéses teszt két vagy több antibiotikum termelő baktérium hatásának összevetésére jól alkalmazható módszer. A mérések precíz elvégzését ugyan megnehezítette a *X. szentirmaii* törzs esetében észlelhető „swarming motility” effektus, azonban az élő primer sejtek antagonista képessége minden tesztelt növénypatogén törzsszel szemben egyértelműen mutatkozott. A mérési eredmények alapján a *X. budapestensis* átlagosan nagyobb méretű gátlási zónák kialakítására volt képes.

Fodor és munkatársai a tesztelt kórokozó törzsek közül EMA esetében 8, EMC esetében pedig 7 azonos növénypatogén baktériumon végezték el a felülrétegzéses mérést, melyek kivétel nélkül pozitív eredményt adtak, tehát a két *Xenorhabdus* törzs antagonizmusa és a reprodukálhatóság igazolva lett ezen növényi kórokozókkal szemben [Fodor, A., 2012]. Az adatok összevetése alapján jellemzően 10-20% eltérés tapasztalható az inaktivációs zóna átmérők között, amely a viszonylag sok, mérést befolyásoló faktor (táptalaj rétegvastagsága, baktérium törzsek sejtszám-koncentrációja, stb.) miatt nyilvánulhat meg. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *Erwinia carotovora*, valamint EMC esetében *Clavibacter michiganense* ssp. *michiganense* nem került tesztelésre korábbi kutatásokban (4.1. táblázat).

4.1. táblázat: Felülrétegzéses mérés eredményeinek összehasonlítása szakirodalmi adatokkal

Teszt baktérium	Jelen dolgozat		Fodor, A., 2012	
	EMA	EMC	EMA	EMC
<i>A. tumefaciens</i>	48,75 ± 1,50	43,25 ± 6,29	36,67 ± 1,15	24,33 ± 4,04
<i>C. m. ssp. michiganense</i>	60,75 ± 1,71	46,25 ± 6,55	47,33 ± 2,33	NT
<i>C. f. pv. betae</i>	65,25 ± 2,06	60,50 ± 8,74	34,16 ± 0,76	47,67 ± 2,08
<i>E. amylovora Ea1</i>	61,50 ± 1,29	53,25 ± 4,79	44,00 ± 0,50	43,33 ± 1,44
<i>E. carotovora</i>	51,50 ± 1,29	52,50 ± 4,04	NT	NT
<i>P. s. pv. glycinea</i>	52,50 ± 2,08	48,75 ± 7,54	48,75 ± 10,04	45,33 ± 3,05
<i>P. s. pv. savastanoi</i>	54,00 ± 3,16	44,25 ± 2,99	NT	NT
<i>P. s. pv. syringae</i>	51,75 ± 2,75	44,25 ± 5,91	45,50 ± 0,50	23,83 ± 2,02
<i>X. c. pv. carotae</i>	55,50 ± 1,00	52,75 ± 5,25	51,00 ± 1,22	48,50 ± 11,67
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	62,25 ± 2,22	58,50 ± 5,80	58,50 ± 0,50	19,00 ± 2,60

NT: nem tesztelt

A tapasztalt gátló hatás alapján az antagonista, élő *Xenorhabdus* sejtek kijuttatása a védendő növényekre, környezetükbe a betegség kezelésének és a tünetek csökkentésének egy elméleti alternatívája lehet, bár kivitelezése vélhetően számos akadályba ütközne. Az élő preparátum hatékonysága nehezen szabályozható, a baktérium sejtek mikroflórára gyakorolt hatása ismeretlen, ezért további ökológiai vizsgálatok elvégzését igényelné. Az alkalmazást tovább nehezítené, hogy a környezeti feltételek a gyakorlatban általában nem adták az EPB fajok megfelelő ideig tartó túléléséhez. Emellett a sejtek spontán fázisváltása és ezzel párhuzamosan az antibiotikus hatással rendelkező anyagok termelésének megszűnése egy nem szabályozható folyamat, így a szimbiota nematodák jelenléte nélkül a primer variánsok átalakulása feltehetően hamar bekövetkezne.

A sejtmentes *Xenorhabdus* fermentleveket agardiffúziós tesztben vizsgálva 7 teszt baktérium (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae*, *Dickeya chrysanthemi*, *Pseudomonas fluorescens* B1665, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *Ralstonia solanacearum* R1240) ellen EMA CFCM esetében szignifikánsan nagyobb méretű inaktivációs zóna átmérők voltak megfigyelhetők az azonos koncentrációjú EMC CFCM oldatokhoz viszonyítva. A vad típusú

(Ea1) és az antibiotikum rezisztens mutáns *Erwinia amylovora* törzsek (Ea88, Ea110, EaCa11) egyformán reagáltak az EPB hatóanyagokra, szignifikáns különbség nem tapasztalható az indukált gátlási zónák átmérője között. Tehát a streptomycin és rifampin elleni rezisztencia nem jelent védelmet az EMA és EMC antimikrobiális anyagcseretermékeivel szemben. A *Pseudomonas fluorescens* és *Ralstonia solanacearum* fajokat tekintve eltérés állapítható meg az egyes törzsek érzékenysége között. A *P. fluorescens* B1969 és a *P. corrugata* (amely a *P. fluorescens* csoportéhoz tartozik) törzsek rezisztensnek mutatkoztak EMA CFCM ellen, míg a *P. fluorescens* B1665 egyértelműen érzékeny volt. Hasonlóképpen *R. solanacearum* 879 rezisztens, míg az R1240 törzs szenzitív fenotípus.

Szakirodalmi adatokkal összevetve Fodor és munkatársai azonos növénypatogén kórokozók ellen az EMC CFCM esetén közel azonos méretű, míg EMA CFCM vonatkozásában jellemzően 30-40 %-al kisebb gátlási zóna átmérőket kaptak (4.2. táblázat) [Fodor, A., 2012]. Az eltérést a folyadék-kultúrákban elért *X. budapestensis* sejtkoncentráció, a primer sejtek aránya, valamint ezen tényezők függvényében az előállított antimikrobiális anyagok mennyisége közötti különbség okozhatta.

4.2. táblázat: Agardiffúziós mérés eredményeinek összehasonlítása szakirodalmi adatokkal

Teszt baktérium	Jelen dolgozat		Fodor, A., 2012	
	EMA CFCM	EMC CFCM	EMA CFCM	EMC CFCM
<i>C. f. pv. betae</i>	30,67 ± 0,58	21,67 ± 0,58	19,18 ± 0,88	23,10 ± 0,09
<i>D. chrysanthemi</i>	24,33 ± 0,58	20,33 ± 0,58	19,24 ± 0,84	24,64 ± 0,83
<i>E. amylovora Ea1</i>	22,33 ± 0,58	23,00 ± 0,00	20,79 ± 0,69	24,82 ± 1,13
<i>P. s. pv. lachrymans</i>	29,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00	22,54 ± 1,58	23,97 ± 1,75
<i>P. s. pv. syringae</i>	22,33 ± 0,58	22,33 ± 0,58	16,88 ± 0,88	20,13 ± 4,3
<i>X.a. pv. phaseoli</i>	23,00 ± 0,00	23,67 ± 0,58	20,52 ± 3,18	22,04 ± 2,76

A folyadék-fázisban végrehajtott kísérletek eredményei – a MID értékek megállapítása egyes növényi kórokozók ellen – alátámasztották, hogy a *X. budapestensis* kultúrából előállított CFCM oldat erősebb antimikrobiális hatással bír, mint az EMC CFCM. Az agardiffúziós tesztben ellenállónak mutakozó törzsek esetében a MID értéke általában 30-nál nagyobb, míg az érzékeny törzsek vonatkozásában rendszerint 10-20 (V/V)% CFCM koncentrációval teljes baktericid hatás volt kimutatható.

Az elvégzett *in vitro* mikrobiológiai tesztek eredményei alapján a két EPB törzs antimikrobiális hatása között jelentős különbség nem tapasztalható, azonban a *X. budapestensis* törzsről megállapítható, hogy általánosságban némileg nagyobb mértékű gátlást indukált, valamint szélesebb célszervezet-skálán fejtette ki hatását, ezért ígéretesebb mikroorganizmusnak tekinthető növényvédelmi célú biopreparátum előállítására. A további vizsgálatokat ebből az okból kifolyólag a *X. budapestensis* DSM-16342^T (EMA) EPB törzsre fókuszálva hajtottam végre.

Az EMA CFCM oldatokból ioncserélő gyantán adszorbeált, majd több lépéses metanolos extrakcióval és rotációs vákuum-desztillációval dúsított biopreparátum minta vizes oldata a CLSI szabvány makrodilúciós módszere alapján került tesztelésre *E. amylovora* Ea1 növénypatogén törzssel szemben az antibakteriális aktivitás meghatározása céljából [CLSI, 2012]. Megállapítottam, hogy a legkisebb gátló koncentráció, azaz a MIC értéke 8 µg/ml, a minimális baktericid koncentráció (MBC) pedig 16 µg/ml-nek adódott. A kapott eredmények alapján az előállított biopreparátum a hagyományos antibiotikum komponensekre megállapított MIC standard értékek koncentráció-tartományában képes kifejteni antibakteriális hatását (2.3. táblázat). A tisztított szárazanyag minta többféle hatóanyag komponens keverékének tekinthető, emellett összetevői között kis mennyiségben inaktív anyagok is lehetnek. Az egyes EMA hatóanyag komponensek között előfordulhatnak szinergisztikus hatások, melyek egy ilyen komplex keverék hatásosságát fokozzák, növényvédelmi célokra történő hasznosítását pedig elősegíthetik.

Böszörményi és munkatársai fiatal almafák hajtásain kimutatták a *X. budapestensis* CFCM szűrletének hatásosságát a tűzelhalás tüneteinek mérséklésében, laboratóriumi és üvegházi kísérletekben egyaránt [Böszörményi, E., 2009]. Ez a tanulmány főként a vegetatív hajtásfertőzésre fókuszált, azzal összefüggésben állapított meg kísérleti eredményeket, melyek közelítőleg a streptomycin korábban alkalmazott dóziséval megegyező hatásról számolnak be, hígítatlan EMA CFCM használata esetén.

Alma virágzatok EMA hatóanyagokkal történő kezelésére vonatkozóan azonban nem történtek korábbi vizsgálatok. Az elterjedt kísérleti metodikákat alkalmazva az értékelésnél általában a növény különböző részein (virág, hajtás) megjelenő betegségtünet súlyosságából vonható le következtetés. A virágzat, különösen az elsődleges virágzatok megóvása kiemelt szempont, hiszen az *E. amylovora* fertőzések leggyakrabban tavasszal, az elsődleges virágzatok megjelenésekor következnek be. Ebben az esetben közvetlenül csökken a termés hozama, tovább terjedve pedig a baktérium sejtek elpusztítják a főágakat, valamint inokulumként szolgálnak a hajtásfertőzés és másodlagos virágfertőzés számára [Beer, S. V.,

1976]. Mindemellett, az ültetvények permetezését bakteriális fertőzések elleni védekezés gyanánt általában a virágzási periódus alatt célszerű elvégezni gyümölcsfák esetében. Tehát, a fertőzés megelőzésére kipermetezett növényvédő készítménynek képesnek kell lennie a kórokozók számának csökkentésére, a virágzatok károsítása nélkül.

A mesterségesen *E. amylovora* Ea1 kórokozóval fertőzött alma virágzatokon végrehajtott kísérletek arról tettek tanúbizonyságot, hogy a 62-200 µg/ml koncentráció-tartományban alkalmazva az EMA biopreparátumot a preventív kezelés szignifikánsan csökkentette az életképes *E. amylovora* sejtek számát és a betegség mértékét, emellett nem okozott károsodást a környezeti hatásokra érzékeny virágszerveken. Az *E. amylovora* kisebb nagyságrendű populációi ($<10^5$ CFU) az egyes kezelt virágzatokon nem bizonyultak elegendőnek tünetek előidézéséhez. A kísérlet eredményei alapján az antimikrobiális komponenseket tartalmazó EMA CFCM oldatból tisztított frakció egy ígéretes biopreparátum, amely alkalmas a tűzelhalás betegség tüneteinek mérséklésére ellenőrzött körülmények között a fertőzést megelőzően alkalmazva.

A mikroszaporított burgonya növényeken elvégzett fertőzési kísérletben meghatároztam, hogy az adott körülmények között 6×10^7 CFU/ml *R. solanacearum* sejtszám-koncentráció szükséges a baktériumos barna rothadás betegség kialakulásához. A módszer további fejlesztésével olyan laboratóriumban végezhető eljárás alapjául szolgálhat, amely alkalmas lehet a *R. solanacearum* fertőzéssel szemben mutatott ellenálló képesség vizsgálatára különböző burgonya fajták esetében, valamint a betegség kialakulásának megelőzését célzó növényvédő szerek tesztelése is elvégezhető.

Az EMA CFCM oldat baktericid hatását az idő függvényében vizsgálva megállapítható, hogy a *X. budapestensis* sejtmentes fermentleve a *R. solanacearum* R1240 törzsének sejtjeire már 2 órás kezelés során is erős citotoxikus hatást fejt ki. A *R. solanacearum* sejtek száma több mint két nagyságrenddel csökkent 5 (V/V)% EMA CFCM koncentrációt alkalmazva, 24 órás kezelés után pedig teljes baktericid hatás érhető el 10 (V/V)% és annál nagyobb dózisok esetén.

A CFCM oldat fitotoxikus hatása mikroszaporított Balatoni rózsfa fajtájú burgonya növények gyökérzónáján keresztül felszívódva 3 napos kezelés után csak a tömény sejtmentes fermentlé esetében mutatkozott meg, azonban 18 napos kezelés után már a 10 (V/V)% alsó tesztelt koncentráció is egyértelműen kimutatható károsodást idézett elő a kezeletlen kontroll növényekhez viszonyítva. Alma virágzatok permetezéssel történő kezelése szintén erős szövetkárosodást idézett elő hígítatlan EMA CFCM oldatot alkalmazva, így – bár a vegetatív hajtásfertőzés tüneteinek és terjedésének mérséklésére alkalmas lenne a *X. budapestensis*

tömény sejtmentes fermentleve [Böszörményi, E., 2009] – felhasználhatósága növényvédelmi célokra erősen korlátozott, a CFM oldat további tisztítása, az antimikrobiális hatású anyagcseretermékek dúsítása szükséges lépés.

A nagyműszeres analitikai vizsgálatok az elkészített biopreparátum mintákban valószínűsítik *X. budapestensis* esetében glutamin, hisztidin, tirozin és lizin, *X. szentirmaii* esetében glutamin, hisztidin, triptofán, lizin, tirozin és prolin aminosav egységek jelenlétét, melyek feltehetően az aktív AMP molekulák alkotóelemei.

Az összetétel még a tisztított minták esetében is rendkívül komplex és változatos, ezért nehéz feladat a hatóanyagok molekulaszervezetének precíz meghatározása. A hasonló profillal foglalkozó modern kutató intézetekben manapság már nem „vakon” keresnek aktív anyagcseretermékeket a fermentlevekben, hanem az EPB törzs genom szekvenciája alapján megjósolják, hogy milyen komponensek várhatók, majd célzottan ezeket azonosítják.

Ehhez hasonló infrastruktúrával és apparátussal sajnos nem rendelkezünk a munka során, ezért esetemben a cél főként az lehetett, hogy viszonylag reprodukálható peptid-összetételű frakciókat izoláljak, és azok felhasználóságát vizsgáljam, hiszen a szinergista hatásoknak köszönhetően a különféle összetevők akár erősíthetik is egymást a megfelelő mértékben tisztított preparátumban.

Mivel a kinyert frakció hatóanyag-összetétele rendkívül komplex, érdemes a bioaktív komponensek feltárásával, azonosításával, hatásmechanizmusuk megértésével foglalkozni a továbbiakban is. Emellett az egyes hatóanyag komponensek között létrejövő szinergisztikus hatások kutatása is lényeges és indokolt.

A növényvédelmi célú felhasználást szem előtt tartva egy termék fejlesztése esetén az optimális mértékben tisztított *Xenorhabdus* hatóanyagokat adalékanyagok hozzáadásával, az alkalmazás körülményeinek megfelelően formulázva állítható elő hasznosítható készítmény. Az engedélyezési folyamat során a biológiai hatékonyság alátámasztása mellett számos további kérdésre is választ kell adni (növényvédő szer fizikai, kémiai és technikai tulajdonságai, alkalmazási adatok, toxikológiai vizsgálatok, kezelt termékekben, élelmiszerekben és takarmányokban, illetve ezek felületén található szermaradékok, a növényvédő szer sorsa és viselkedése a környezetben, ökotoxikológiai vizsgálatok) [89/2004. FVM rendelet].

A mezőgazdaságban kialakuló új szemlélet kulcseleme az integrált védelem, melynek egyik határterülete az élő szervezetek által termelt antimikrobiális hatású anyagok felhasználása a növényorvoslásban. Tapasztalataim azt mutatják, hogy a *X. budapestensis* másodlagos anyagcseretermékei potenciálisan alkalmasak a tüzelhalás betegség

megelőzésére. A vizsgált *X. budapestensis* és *X. szentirmaii* EPB törzsek széles-spektrumú bioaktivitással rendelkező komponenseket képesek előállítani és ezáltal forrását képezhetik újfajta, biológiai eredetű hatóanyagoknak és növényvédő szereknek.

5. Tézisek

1. tézis: Az EMA CFCM oldatot agardiffúziós tesztben vizsgálva bizonyítottam, hogy a *X. budapestensis* sejtmentes fermentlevére eltérően reagálhatnak ugyanazon fajhoz tartozó különböző kórokozó törzsek.

A *P. fluorescens* B1969 és a *P. corrugata* B1637 törzsek rezisztensnek mutatkoztak EMA CFCM ellen, míg a *P. fluorescens* B1665 érzékeny. Hasonlóképpen *R. solanacearum* 879 rezisztens, míg az R1240 törzs szenzitív fenotípus.

2. tézis: Az EMA CFCM oldatokból ioncserélő gyantán adszorbeált, majd több lépéses metanolos extrakcióval és rotációs vákuum-desztillációval dúsított biopreparátum minta vizes oldatáról bizonyítottam, hogy *Erwinia amylovora* Ea1 növénypatogén törzzsel szemben minimális gátló koncentrációja 8 µg/ml, minimális baktericid koncentrációja 16 µg/ml.

Az EMA CFCM oldatokból előállított biopreparátum minta vizes oldatát a CLSI szabvány makrodilúciós módszere alapján vizsgáltam *E. amylovora* Ea1 növénypatogén törzzsel szemben. Megállapítottam, hogy nincs jelentős különbség a hatékony MIC és MBC értékek között, így a kiváltott hatás inkább baktericid, mint bakteriosztatikus.

3. tézis: Mesterségesen *E. amylovora* Ea1 kórokozóval fertőzött alma virágzatokon bizonyítottam, hogy a 62-200 µg/ml koncentráció-tartományban alkalmazva az EMA biopreparátumot a preventív kezelés képes csökkenteni az életképes *E. amylovora* sejtek számát és a tűzelhalás betegség kialakulásának mértékét, emellett nem okoz károsodást a virágszerveken.

Az adott körülmények között preventív kezelésnek alávetett és előzőleg mesterségesen *E. amylovora* Ea1 törzzsel fertőzött Watson Jonathan alma virágokon 62 µg/ml és annál nagyobb EMA hatóanyag dózisok esetében szignifikánsan csökkent a fertőzési indexhez tartozó gyakoriság a negatív kontrollhoz (desztillált vízzel kezelve) viszonyítva, és szignifikánsan nem különbözik a pozitív kontrollhoz képest (nem fertőzött Ea1 törzzsel).

4. tézis: Mikroszaporított burgonya növényeken fertőzési kísérletben bizonyítottam, hogy az adott körülmények között 6×10^7 CFU/ml *R. solanacearum* sejtszám-koncentráció szükséges a baktériumos barna rothadás betegség kialakulásához.

A leírt eljárás olyan laboratóriumban végezhető reprodukálható módszer alapjául szolgálhat, amely alkalmas a *R. solanacearum* fertőzéssel szemben mutatott ellenálló képesség vizsgálatára különböző burgonya fajták esetén, valamint a betegség kialakulásának megelőzését célzó növényvédő szerek tesztelése is elvégezhető.

5. tézis: Növénykísérletekben bizonyítottam az EMA CFCM oldat erős fitotoxikus hatását, amely alapján felhasználhatósága növényvédelmi célokra erősen korlátozott.

A fitotoxikus hatás mikroszaporított Balatoni rózsfa fajtájú burgonya növények gyökérzónáján keresztül felszívódva 3 napos kezelés után csak a tömény sejtmentes fermentlé esetében mutatkozott meg, azonban 18 napos kezelés után már a 10 (V/V)% alsó tesztelt koncentráció is egyértelműen kimutatható károsodást idézett elő. Alma virágzatok permetezéssel történő kezelése szintén erős szövetkárosodást idézett elő hígítatlan EMA CFCM oldatot alkalmazva. A CFCM oldat további tisztítása, az antimikrobiális hatású anyagcseretermékek dúsítása szükséges lépés.

6. Saját publikációk

Idegen nyelvű publikáció

1. Vozik, D., Madarász, J., Csanádi, Zs., Fodor, A., Dublec, K., Bélafi-Bakó, K.: Study on analysis of antibiotic compounds from entomopathogenic bacteria by FT-IR, *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, Veszprém, Vol. 40 (2) pp. 83-86. (2012)
2. Vozik, D., Bélafi-Bakó, K., Hevesi, M., Böszörményi, E., Fodor, A.: Effectiveness of a Peptide-rich Fraction from *Xenorhabdus budapestensis* Culture against Fire Blight Disease on Apple Blossoms, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, Vol. 43 (2) pp. 547-553. (2015)
3. Vozik, D., Bélafi-Bakó, K., Hevesi, M., Böszörményi, E., Polgár, Zs., Fodor, A.: Effectiveness of antimicrobial compounds produced by entomopathogenic nematode symbiotic bacteria to control pests and bacterial plant diseases, *International Organization For Biological Control-West Palaearctic Regional Section Bulletin*, Vol. 113 pp. 17-21. (2016)
4. Csanádi, Zs., Vozik, D., Molnár, A., Bélafi-Bakó, K., Dublec, K., Fodor, A.: Antibacterial activity of two entomopathogenic bacteria on some plant and animal pathogens, *Georgikon For Agriculture: A Multidisciplinary Journal In Agricultural Sciences*, Vol. 16 (1) pp. 53-58. (2013)
5. Tóth, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., Vozik, D., Bakonyi, P.: Degradation of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thioautotrophicus* in continuous biotrickling reactor fed with synthetic gas mixture, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 105 pp. 185-191. (2015)

Magyar nyelvű publikáció

1. Vozik, D., Böszörményi E., Fodor A., Bélafiné Bakó, K., Hevesi, M.: *Xenorhabdus budapestensis* entomopatogén baktérium sejtkultúrából nyert tisztított frakció hatásossága tűzelhalás ellen, *Georgikon for Agriculture*, 19:(1) pp. 46-51. (2015)

2. Vozik, D., Bélafiné Bakó, K., Hevesi, M., Fodor, A., Polgár, Zs.: A *Ralstonia solanacearum* elleni védelem lehetőségei és a *Xenorhabdus* baktériumok antimikrobiális produktumai, *Georgikon for Agriculture*, 19:(1) pp. 91-95. (2014)
3. Vozik, D., Tatai, A., Csanádi, Zs., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A.: Entomopatogén nematoda-szimbionta baktériumok által termelt antimikrobiális hatású anyagok vizsgálata növénypatogén baktériumokkal szemben, *Műszaki Kémiai Napok 2013 Konferencia Kiadvány*, Veszprém, 2013. pp. 97-102.
4. Vozik, D., Tatai, A., Csanádi, Zs., Lövitusz, É., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A.: Entomopatogén baktériumok által termelt antimikrobiális hatású anyagok vizsgálata növénypatogén mikroorganizmusokkal szemben, *Acta Agraria Debreceniensis*, (53) pp. 26-30. (2013)
5. Vozik, D., Tatai, A., Csanádi, Zs., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A.: Entomopatogén nematoda / baktérium szimbiotikus rendszerek, *Membrántechnika és Ipari Biotechnológia*, 3:(2) pp. 18-24. (2012)
6. Vozik, D., Csanádi, Zs., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A.: Biológiai növényvédelem - Entomopatogén nematoda / baktérium szimbiotikus rendszerek, *Műszaki Kémiai Napok 2012 Konferencia Kiadvány*, Veszprém, 2012. pp. 339-343.
7. Böszörményi, E., Fodor, A., Hogan, J., Olasz, F., Noureldeen, A.H., Racskó, J., McMormick, J., Vozik, D., Zsugovics, N., Barcs, I., Dublec, K.: Multi-drog rezisztens Gram-negatív patogének elleni védekezés lehetősége *Xenorhabdus* antimikrobiális peptidek felhasználásával: in vitro kísérletek eredményei, *Georgikon for Agriculture*, 19:(1) pp. 84-90. (2014)
8. Böszörményi, E., Vozik, D., Hevesi, M., McGwire, B., Hogan, J., Barcs, I., Dublec, K., Fodor, A.: Entomopatogén nematoda-szimbionta baktériumok antimikrobiális peptidjeinek hatása antibiotikummal szemben polirezisztens és multirezisztens patogén baktériumokra, *Georgikon for Agriculture*, 16:(1) pp. 85-90. (2013)
9. Csanádi, Zs., Vozik, D., Fodor, A., Bélafiné Bakó, K.: Biológiai növényvédelemben alkalmazható rovarkártevő fonálféreg/baktérium szimbiotikus komplexek, *Műszaki Kémiai Napok 2013 Konferencia Kiadvány*, Veszprém, 2013. pp. 45-49.
10. Csanádi, Zs., Vozik, D., Gubicza, K., Findrik Blazevic, Z., Bélafiné Bakó, K.: Szilárdgáz fázisú enzimkatalitikus reakciók, *Műszaki Kémiai Napok 2011 Konferencia Kiadvány*, Veszprém, 2011. pp. 266-270.
11. Böszörményi, E., Barcs, I., Domján, G., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A., Makrai, L., Vozik, D.: A *Xenorhabdus budapestensis* entomopatogén baktérium sejtmentes

- fermentlevének és tisztítottfehérje-frakciójának antimikrobiális hatása néhány zoonoticus baktériumra, *Orvosi Hetilap*, 156:(44) pp. 1782-1786. (2015)
12. Böszörményi, E., Barcs, I., Kristóf, K., Csimá, Z., Domján, Gy., Bélafiné Bakó, K., Vozik, D.: *Xenorhabdus budapestensis* által termelt fabelavin hatású fehérje fungicid hatásának a mérése néhány klinikai mintából származó *Candida* fajtán, *Egészségtudomány*, 59:(4) pp. 114-115. (2015)
 13. Dobó, V., Böszörményi, E., Barcs, I., Vozik, D., Makrai, L., Fodor, A.: *Xenorhabdus budapestensis* antimikrobiális hatású fehérjéjének tesztelése, néhány ételfertőzést és ételmérgezést okozó baktériumon, *Egészségtudomány*, 59:(2) pp. 83-84. (2015)
 14. Váradi, I., Böszörményi, E., Barcs, I., Vozik, D., Makrai, L., Fodor, A.: *Xenorhabdus budapestensis* antimikrobiális hatású fehérjéjének tesztelése néhány zoonózist okozó baktériumon, *Egészségtudomány*, 59:(2) pp. 103-104. (2015)
 15. Böszörményi, E., Barcs, I., Molnár, A., Fodor, A., Dublec, K., Vozik, D., Bélafiné Bakó, K.: Entomopatogén nematoda-szimbionta baktériumok antibakteriális aktivitású anyagainak potenciális felhasználási lehetőségei az élelmiszerbiztonságban és az állat higiénében, *Egészségtudomány*, 56:(4) pp. 66-67. (2012)

Idegen nyelvű poszterek

1. Vozik, D., Bélafi-Bakó, K., Hevesi, M., Böszörményi, E., Polgár, Zs., Fodor, A.: Effectiveness of antimicrobial compounds produced by entomopathogenic nematode symbiotic bacteria to control pests and bacterial plant diseases, *15th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group "Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests"*, June 7-11, 2015, Riga, Lettország, Programme and Abstract Book p. 98.
2. Vozik, D., Tatai, A., Csanádi, Zs., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A.: Antibacterial activity of two entomopathogenic bacteria on some plant and animal pathogens, *The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS)*, July 20-25, 2013, Lipcse, Németország, Book of Abstracts p. 245.
3. Vozik, D., Tatai, A., Bélafiné Bakó, K., Molnár, A., Fodor, A., Csanádi, Zs., Dublec, K.: Antimicrobial compounds of entomopathogenic nematode-symbiotic bacteria as potential tools to combat polyresistance, *International Symposium on Protozoal infections in poultry*, July 6-7, 2012, Bécs, Ausztria, Book of Abstracts p. 52.

Magyar nyelvű előadások

1. Vozik, D., Böszörményi, E., Fodor, A., Bélafiné Bakó, K., Hevesi, M.: *Xenorhabdus budapestensis* entomopatogén baktérium sejtkultúrából nyert tisztított frakció hatásossága tűzelhalás ellen, *XXV. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum*, Keszthely, 2015.
2. Vozik, D., Lövitusz, É., Böszörményi, E., Fodor, A., Bélafiné Bakó, K., Hevesi, M.: *Xenorhabdus budapestensis* által termelt antimikrobiális hatású anyagok hasznosítása a növényvédelemben, *PhD hallgatók anyagtudományi napja XIV.* Pannon Egyetem, Veszprém, 2014.
3. Vozik, D., Lövitusz, É., Bélafi-Bakó, K., Hevesi, M., Polgár, Zs., Fodor, A.: Utilization of antimicrobial compounds of entomopathogenic nematode-symbiotic bacteria against *Ralstonia solanacearum* in plant protection, *I. Innováció a Természettudományban – Doktorandusz Konferencia*, Szeged, 2014.
4. Vozik, D., Bélafiné Bakó, K., Hevesi, M., Fodor, A., Polgár, Zs.: A *Ralstonia solanacearum* elleni védelem lehetőségei és a *Xenorhabdus* baktériumok antimikrobiális produktumai, *XXIV. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum*, Keszthely, 2014.
5. Vozik, D., Tatai, A., Csanádi, Zs., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A.: Entomopatogén nematoda-szimbionta baktériumok által termelt antimikrobiális hatású anyagok vizsgálata növénypatogén baktériumokkal szemben, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2013.
6. Vozik, D., Tatai, A., Csanádi, Zs., Lövitusz, É., Bélafiné Bakó, K., Fodor, A.: Entomopatogén baktériumok által termelt antimikrobiális hatású anyagok vizsgálata növénypatogén mikroorganizmusokkal szemben, *XVIII. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum*, Debrecen, 2013.
7. Csanádi, Zs., Vozik, D., Molnár, A., Bélafiné Bakó, K., Dubleczy, K., Fodor, A.: Entomopatogén baktériumok antibakteriális hatásának vizsgálata növény- és állatpatogén mikroorganizmusokon, *XXIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum*, Keszthely, 2013.

7. Irodalomjegyzék

2000. évi XXXV. törvény 2000. évi XXXV. törvény a növényvédelemről,
http://www.kvvm.hu/szakmai/hulladekgazd/jogszabalyok/2000_XXXV_tv.htm
- 7/2001. FVM rendelet 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet a növényegészségügyi feladatok végrehajtásának
részletes szabályairól,
http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0100007.FVM
- 89/2004. FVM rendelet 89/2004. (V. 15.) FVM rendelet a növényvédő szerek forgalomba hozatalának és
felhasználásának engedélyezéséről, valamint a növényvédő szerek
csomagolásáról, jelöléséről, tárolásáról és szállításáról,
http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0400089.FVM
- Aeschlimann, J. P., 1995 Aeschlimann, J. P.: Lessons from the post-release investigations in classical
biological control: The case of *Microctonus aethiopoides* introduced into
Australia and New Zeland for the biological control of *Sitona disciodeus*. In:
Biological Control: Benefits and Risks. eds: Hokkanen, H. M. T. and Lynch, J.
M. Cambridge University Press, Cambridge, 1995, 75-83.
- Akhurst, R. J., 1982 Akhurst, R.J.: Antibiotic activity of *Xenorhabdus* ssp., bacteria symbiotically
associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae
and Steinernematidae, *Journal of General Microbiology*, 128, 1982, 3061–3065.
- Akhurst, R. J., 1988 Akhurst, R.J., Boemare, N.E.: A numerical taxonomic study of the genus
Xenorhabdus (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X.*
nematophilus to species. *Journal of General Microbiology*, 134, 1988, 1835-
1845.
- Ausubel, F. M., 1999 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith,
J.A., Struhl, K.: Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition. A
compendium of methods from current protocols in molecular biology, John Wiley
& Sons, New York, USA, 1999.
- Baell, J., 2014 Baell, J., Walters, M.A.: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature*, 513,
2014, 481-483.
- Balaton rózsza <http://www.burgonyakutatas.hu/burgonyafajtak/balatonirozsza/>
- Balogh, S., 1991 Balogh, S.: A biológiai növényvédelem lehetőségei és helyzete Magyarországon,
Növényvédelem, 27, 1991, 196-201.
- Barbercheck, M. E., 2004 Barbercheck, M. E.: Entomopathogenic nematodes in biological control. Penn
State University Extension Fact Sheet, 2004.
<http://www.ento.psu.edu/extension/factsheets/nematode.htm>
- Barth, A., 2000 Barth, A.: The infrared absorption of amino acid side chains, *Progress in*
Biophysics & Molecular Biology, 74, 2000, 141-173.

- Baxter, M. L., 1998 Baxter, M.L., Ley, P.D., Garey, J.R., Leo, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T, Thomas, W.K.: Molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda, *Nature*, 392, 1998, 71-75.
- Beer, S. V., 1976 Beer, S.V., Opgenorth, D.C.: *Erwinia amylovora* on fire blight canker surfaces and blossoms in relation to disease occurrence. *Phytopathology*, 66, 1976, 317-322.
- Bergman, A., 2013 State of the Science of Endocrin Disrupting Chemicals 2012 / edited by Åke Bergman, Jerrold J. Heindel, Susan Jobling, Karen A. Kidd and R. Thomas Zoeller. United Nations Environment Programme and the World Health Organization, 2013.
- Bertrand, P. F., 1978 Bertrand, P.F., Gottwald, T.R.: Evaluating fungicides for pear disease control. In: Zehr EI (Ed). Methods for evaluating plant fungicides, nematocides and bactericides, St. Paul, Minnesota, USA, 1978, 179-181.
- Bode, H. B., 2009 Bode, H.B.: Entomopathogenic bacteria as sources of secondary metabolites, *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 2009, 224-230.
- Boemare, N. E., 1993 Boemare, N.E., Akhurst, R.J., Mourant, R.G.: DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a Proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 1993, 249-255.
- Boemare, N. E., 1997 Boemare, N.E., Givaudan, A., Brehelin, M., Laumond, C.: Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. In: Nematode symbiosis, vol. 22, no. 1/2. International Science Services, Zeist, The Netherlands, 1997, 21-45.
- Böszörményi, E., 2009 Böszörményi, E., Érsek, T., Fodor, A., Földes, L.Sz., Hevesi, M., Hogan, J.S., Katona, Z., Klein, M.G., Kormány, A., Pekár, Sz., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., Taylor, R.A.J.: Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*, *Journal of Applied Microbiology*, 107, 2009, 746-759.
- Böszörményi, E., 2010 Böszörményi, E.: Rovarpatógén baktériumok antibiotikum termelésének és szimbiotikus partner-specifitásának gnotobiológiai analízise, Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, 2010.
- Budai, Cs., 2006 Budai, Cs.: Helyzetkép a hazai üvegházi biológiai növényvédelemről, *Növényvédelem*, 42, 2006, 439-446.
- Carson, R., 1962 Carson, R.: Silent Spring. Houghton Mifflin, 1962.
- Champoiseau, P. G., 2009 Champoiseau, P.G., Jones, J.B., Allen, C.: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties, *Plant Health Progress*, 2009, doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.

- Ciche, T., 2007 Ciche, T.: The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*, 2007, In: Hodgkin, J., Anderson, P. (Eds), WormBook, The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.135.1.
- Clough, S., 1997 Clough, S., Flavier, A., Schell, M., Denny, T.: Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* during exponential growth, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1997, 844–50.
- CLSI, 2011 CLSI.: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-First Informational Supplement, CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- CLSI, 2012 CLSI.: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- Coutinho, T. A., 2005 Coutinho, T.A.: Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum* species complex, APS press, St. Paul, Minnesota, USA, 2005, 29-38.
- Darvas, B., 1998 Darvas, B., Polgár, L.A.: Novel type insecticides: specificity and effects on non-target organisms. In: Insecticides with Novel Modes of Action, Mechanism and Application. eds.: Ishaaya, I. and Degheele, D., Berlin, Springer-Verlag, 1998, 188-259.
- DeBach, P., 1964 DeBach, P. (ed.): Biological Control of Insect Pests and Weeds. pp. 460. Chapman & Hall, London, 1964.
- Drace, K., 2008 Drace, K., Darby, C.: The hmsHFRS Operon of *Xenorhabdus nematophila* Is Required for Biofilm Attachment to *Caenorhabditis elegans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (14), 2008, 4509-4515.
- Duchaud, E., 2003 Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., Dassa, E., Deroose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Medigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A., Kunst, F.: The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol.*, 21 (11), 2003, 1307-1313.
- Dutky, S. R., 1959 Dutky, S.R.: Insect microbiology. *Advanced Applied Microbiology*, 1, 1959, 175-200.
- e-nema <http://www.e-nema.de/products/>
- Edgecomb, D.W., 2006 Edgecomb, D.W., Manker, D.: *Bacillus subtilis* strain QST 713, bacterial disease control in fruit, vegetable and ornamental production. Proceedings of the 1st International symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, 408, 2006, 167-169.
- Edman, P., 1950 Edman, P., Hogfeldt, E., Sillen, L.G., Kinell, P.O.: Method for determination of the amino acid sequence in peptides, *Acta Chemica Scandinavica*, 4, 1950, 283-293.

- Ehlers, R. U., 1990 Ehlers, R.U., Stoessel, S., Wyss, U.: The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Revue Nematol.*, 13, 1990, 417-424.
- Ehlers, R. U., 2001 Ehlers, R.U.: Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (5-6), 2001, 623-633.
- Elphinstone, J.G., 2005 Elphinstone J.G.: The current bacterial wilt situation: a global overview, In: Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (Eds.), *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 2005, 9-28.
- Elkins, R.B., 2005 Elkins, R.B., Ingels, C.A., Lindow, S.E.: Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 introduced into unopened pear flowers, *Acta Horticulturae*, 671, 2005, 585-594.
- Enviroinvest <http://biotechnologia.enviroinvest.hu/>
- Fodor, A., 1990 Fodor, A., Vecseri, G., Farkas, T.: *C. elegans* as a model for studying entomopathogenic nematodes, In: Gaugler, A., Kaya, H. (Eds), *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, USA, 1990, 285-300.
- Fodor, A., 2008 Fodor, A., Forst, S., Haynes, L., Hevesi, M., Hogan, J., Klein, M.G., Mathe-Fodor, A., Stackebrandt, E., Szentirmai, A., Sztaricskai, F.: New perspectives of *Xenorhabdus* antibiotics research, In IOBC/ WPRS Bulletin: Insect Pathogens Insect Parasitic Nematodes, Edited by Ehlers, R.U., Enkerli, J., Glazer, I., Lopez-Ferber, M., Tkaczuk, C. IOBC/WPRS, 2008, 157-164.
- Fodor, A., 2010 Fodor, A., Fodor, A.M., Forst, S., Hogan, J.S., Klein, M.G., Lengyel, K., Saringer, G., Stackebrandt, E., Taylor, R.A.J., Lehoczký, E.: Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and nonrelated bacteria in vivo, *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2, 2010, 36-46.
- Fodor, A., 2011 Fodor, A.: Ahol a biológiai és kémiai mezőgazdasági védekezés találkozik: Entomopatogén nematoda / baktérium szimbiotikus rendszerek, prezentáció, Pannon Egyetem, Veszprém, 2011.11.24.
- Fodor, A., 2012 Fodor, A., Varga, I., Hevesi, M., Máthé-Fodor, A., Racsó, J., Hogan, J.A.: Novel Anti-Microbial Peptides of *Xenorhabdus* Origin Against Multidrug Resistant Plant Pathogens, In: Bobbarala, V. (Ed.): *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology - A Search for Antibacterial Agents*, 9, 2012, 147-196.
- Fuchs, S. W., 2012 Fuchs, S.W., Sachs, C.C., Kegler, C., Nollmann, F.I., Karas, M., Bode, H.B.: Neutral loss fragmentation pattern based screening for arginine-rich natural products in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, *Anal Chem*, 84 (16), 2012, 6948-6955.

- Fuchs, S. W., 2014 Fuchs, S.W., Grundmann, F., Kurz, M., Kaiser, M., Bode, H.B.: Fabclavines: Bioactive Peptide-Polyketide-Polyamino Hybrids from *Xenorhabdus*, *Chembiochem*, 15, 2014, 512-516.
- Furgani, G., 2008 Furgani, G., Böszörményi, E., Fodor, A., Máthé -Fodor, A., Forst, S., Hogan, J.S., Katona, Z., Klein, M.G., Stackebrandt, E., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., Wolf, S.L.: *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 2008, 745-758.
- Gualtieri, M., 2009 Gualtieri, M., Aumelas, A., Thaler, J-O.: Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*, *The Journal of Antibiotics*, 62, 2009, 295-302.
- Gualtieri, M., 2014 Gualtieri, M., Ogier, J-C., Pagès, S., Givaudan, A., Gaudriault, S.: Draft genome sequence and annotation of the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus szentirmaii* strain DSM16338. *Genome Announcements*, 2 (2): e00190-14. doi:10.1128/genomeA.00190-14.
- Goodman, R. N., 1991 Goodman, R.N., Király, Z., Wood, K.R.: A beteg növény biokémiája és élettana. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1991, 154.
- Griffin, C. T., 2000 Griffin, C.T., O'Callaghan, K.M., Dix, I.: A self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes?, *Parasitology*, 122 (2), 2000, 181-186.
- Hancock, R. E. W., 2001 Hancock, R.E.W.: Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 2001, 156-164.
- Hastings, P., 2004 Hastings, P., Rosenberg, S.M., Slack, A.: Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance, *Trends in Microbiology*, 12, 2004, 401-404.
- Hayward, A.C., 1991 Hayward, H.C.: Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, *Annual Review of Phytopathology*, 29, 1991, 65-87.
- Hayward, A.C., 1994 Hayward, A.C., Hartman, G.L.: Bacterial wilt the disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum*, Wallingford, UK, CAB International In Association with AVRDC, 1994.
- He, K., 2014 He, K., Yang, S.Y., Li, H., Wang, H., Li, Z.L.: Effects of calcium carbonate on the survival of *Ralstonia solanacearum* in soil and control of tobacco bacterial wilt, *European Journal of Plant Pathology*, 140, 2014, 665–675.
- Hernandez-Ledesma, B., 2004 Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I.: Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion, *Journal of Chromatography A*, 1049, 2004, 107-114.
- Herraiz, T., 1997 Herraiz, T.: Sample preparation and reversed phase-high performance liquid chromatography analysis of food-derived peptides, *Analytica Chimica Acta*, 352, 1997, 119-139.

- Hevesi, M., 1996 Hevesi, M.: A tűzelhalás megjelenése Magyarországon, *Növényvédelem*, 32, 1996, 225-228.
- Hevesi, M., 2006 Hevesi, M., Al-Arabi, K., Göndör, M., Papp, J., Honty, K., Kása, K., Tóth, M.: Development of ecofriendly strategies for the control of fire blight in Hungary. *Acta Horticulturae*, 704, 2006, 345-348.
- Hevesi, M., 2009 Hevesi M., Végh A., Tóth M.: A tűzelhalás múltja és jelene, *Agrofórum Extra*, 28, 2009, 90-91.
- Hu, K., 2000 Hu, K., Webster, J.M.: Antibiotics production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus - Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae, *FEMS Microbiology Letters*, 189, 2000, 219-223.
- Ji, D., 2004 Ji, D., Yi, Y., Kang, G.H., Choi, Y.H., Kim, P., Baek, N.I., Kim, Y.: Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 239, 2004, 241-248.
- Johnigk, S. A., 1999 Johnigk, S.A., Ehlers, R.U.: Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae), *Nematology*, 1, 1999, 251-260.
- Johnson, K. B., 1998 Johnson, K.B., Stockwell, V.O.: Management of Fire Blight: A Case Study in Microbial Ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 1998, 227-48.
- Kaya, H. K., 1993 Kaya, H.K., Gaugler, R.: Entomopathogenic Nematodes, *Annual Review in Entomology*, 38, 1993, 181-206.
- Keck, M., 1990 Keck, M., Chartier, R., Zislavsky, W., Paulin, J.P.: Sensitivity of *Erwinia amylovora* to high temperatures - possible use of heat treatment for plant propagation material, *Acta Horticulturae*, 273, 1990, 259-266.
- Lakatos, T., 2004 Lakatos, T.: Rovarpatogén fonálférgek, mint a biológiai növényvédelem eszközei, In: Inántszy, F., Lakatos, T. (Szerk.): Biológiai növényvédelem. A rovarpatogén fonálférgek gyakorlati alkalmazásának lehetőségei, Újfehértó, 2004, 49-50.
- Lang, K., 2008 Lang, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J., Imhoff, J.F.: Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*, *Journal of Natural Products*, 71, 2008, 1074-1077.
- László, Gy., 2009 László Gy.: Az almatermésűek tűzelhalása (*Erwinia amylovora*) elleni új védekezési lehetőség Magyarországon, *Növényvédelem*, 44 (3), 2009, 149-179.
- Leclerc, M. C., 1991 Leclerc, M.C., Boemare, N.E.: Plasmids and Phase Variation in *Xenorhabdus* spp., *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1991, 2598-2601.
- Lengyel, K., 2005 Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., Szállás, E., Schumann, P., Stackebrandt, E.: Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. Nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. Nov., *Xenorhabdus innexi* sp. Nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. Nov., *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 2005, 115-122.

- Lengyel, K., 2007 Lengyel, K.: Antibiotikum termelő rovarpatogén baktériumok azonosítása és jellemzése, Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, 2007.
- Li, J., 1995a Li, J., Chen, G., Webster, J.M., Czyzewska, E.: Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont, *Journal of Natural Products*, 58, 1995, 1081-1086.
- Li, J., 1995b Li, J., Chen, G., Wu, H., Webster, J.M.: Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1995, 4329-4333.
- Li, J., 1998 Li, J., Hu, K., Webster, J.M.: Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Chem Heterocycl Comp*, 34, 1998, 1331-1339.
- Li, Y., 2012 Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z.: Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application, *Peptides*, 37, 2012, 207-215.
- Lin, L., 2015 Lin, L., Nonejuie, P., Munguia, J., Hollands, A., Olson, J., Dam, Q., Kumaraswamy, M., Rivera, H. Jr., Corriden, R.F., Rohde, M., Hensler, M.E., Burkart, M.D., Pogliano, J., Sakoulas, G., Nizet, V.: Azithromycin Synergizes with Cationic Antimicrobial Peptides to Exert Bactericidal and Therapeutic Activity Against Highly Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Pathogens, *EBioMedicine*, 2, 2015, 690-698.
- Lindow, S. E., 1996 Lindow, S.E., McGourty, G., Elkins, R.: Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology*, 86 (8), 1996, 841-848.
- Lisansky, S. G., 1997 Lisansky, S. G., Quinlan, R. J. and Coombs, J.: Biopesticides: Markets, Technology, Registration & IPR Companies, 4th edition, CLP Scientific Information Services Limited, 1997, 578.
- Lloyd, C. J., 1969 Lloyd, C.J.: Studies on the cross-tolerance to DDT-related compounds of a pyrethrin-resistant strain of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae), *Journal of Stored Products Research*, 5, 4, 1969, 337-356.
- Lucskai, A., 2004 Lucskai, A., Tóth, T.: A hazai rovarpatogén fonálféreg törzsek taxonómiai vizsgálatának eredményei. In: Biológiai Növényvédelem. A rovarpatogén fonálféreg gyakorlati alkalmazásának lehetőségei, Újfehértó, 2004, 67-95.
- McGhee, G. C., 2000 McGhee, G.C., Jones, A.L.: Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2000, 4897-4907.
- Maróti, G., 2011 Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E., Mergaert, P.: Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals, *Research in Microbiology*, 162, 2011, 363-74.

- Mello, E. J. R., 1970 Mello, E.J.R.: Constatacao de resistencia ao DDT e lidane em *Sitophilus oryzae* (L.) em milho , armazenado, na localidade de Capinópolis, Minas Gerais. In Reuniao Bras. Milho, Porto Alegre, Brazil, 1970, 131-134.
- McGaughey, W. H., 1992 McGaughey, W. H., Whalon, M. E.: Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258, 1992, 1451-1455.
- McInerney, B. V., 1991a McInerney, B.V., Gregson, R.P., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Lyons, G.R., Rhodes, S.H., Smith, D.R., Engelhardt, L.M., White, A.H.: Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity, *Journal of Natural Products*, 54, 1991, 774-784.
- McInerney, B. V., 1991b McInerney, B.V., Taylor, W.C., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Gregson, R.P.: Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity, *Journal of Natural Products*, 54, 1991, 785-795.
- Mukuka, J., 2010 Mukuka, J., Strauch, O., Hoppe, C., Ehlers, R.U.: Improvement of heat and desiccation tolerance in *Heterorhabditis bacteriophora* through cross-breeding of tolerant strains and successive genetic selection, *BioControl*, 55, 2010, 511-521.
- NCAIM <http://ncaim.etk.szie.hu:8089/NCAIM/frameset.jsp>
- NÉBIH, 2014 https://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/noveny_talajvedelmi_ig/kozerdeku_adatok/eseti_eng/eseti_eng_2014
- Németh, J., 1997 Németh, J.: Az almatermésűek baktériumos hajtásszáradása és elhalása (tűzelhalás). Kórokozó: *Erwinia amylovora*. Alapvető ismeretek a betegségről és az ellene való védekezés lehetőségéről: Szakmai információs anyag. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft, 1997.
- Németh, J., 2002 Németh, J.: A burgonya *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 okozta baktériumos hervadása és barna rothadása, 7. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum Előadások - Proceedings, 2002, 85-86.
- Özaktan, H., 2006 Özaktan, H., Bora, T.: Studies on biological control of fire blight with some antagonistic bacteria. *Acta Horticulturae*, 704, 2006, 337-339.
- Paul, W. J., 1981 Paul, W.J., Frautschv, S., Fenical, W., Nealson, K.H.: Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds for the insect symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* spp., *Journal of Chemical Ecology*, 7, 1981, 589-597.
- Pimentel, D., 1989 Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A.: Environmental and economic impacts of reducing U.S. agricultural pesticide use. In: Pimentel, D., (Ed), Handbook of Pest Management in Agriculture, Volume 4, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, 1989, 223-278.
- Polgár, A. L., 2008 Polgár, A. L.: Antagonista élő szervezetek – hasznos élő szervezetek. In: A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon (Darvas B, szerk.) MTA, NKI, Budapest, 2008, 67-77.

- de Ponti, O. M. B., 1980 de Ponti, O.M.B.: Contributions of Plant Breeding to Integrated Pest Control Illustrated on the Glasshouse Cucumber and its Pests *Tetranychus urticae* and *Trialeurodes vaporariorum*, *EPPO Bulletin*, 10, 1980, 357–363.
- Pusey, P. L., 1999 Pusey, P.L.: Water relations and infection by *Erwinia amylovora* based on crab apple blossom model, *Acta Horticulturae*, 489, 1999, 521-524.
- Reddy, K. V. R., 2004 Reddy, K.V.R., Yedery, R.D., Aranha, C.: Antimicrobial peptides: premises and promises, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 2004, 536-547.
- Saile, E., 1997 Saile, E., McGarvey, J., Schell, M., Denny, T.: Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*, *Phytopathology*, 87, 1997, 1264–1271.
- Seibold, A., 2004 Seibold, A., Fried, A., Kunz, S., Moltmann, E., Jelkmann, W.: Yeasts as antagonists against fire blight. *EPPO Bulletin*, 34, 2004, 389-390.
- Smith-Palmer, A., 1998 Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L.: Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens, *Letters in Applied Microbiology*, 26, 1998, 118-122.
- Sobiczewski, P., 1997 Sobiczewski, P., Deckers, T., Pulawska, J.: Fire Blight (*Erwinia amylovora*), Some Aspects of Epidemiology and Control. Research Institute of Pomology and Floriculture, Poland, 1997, 43-46.
- Stockwell, V. O., 2012 Stockwell, V.O., Duffy, B.: Use of antibiotics in plant agriculture, *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 31 (1), 2012, 199-210.
- Strauch, O., 1994 Strauch, O., Stoessel, S., Ehlers, R.U.: Culture conditions define autotrophic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*, *Fundamental and Applied Nematology*, 17, 1994, 575-582.
- Szállás, E., 1997 Szállás, E., Koch, C., Fodor, A., Burghart, J., Buss, O., Szentirmai, A., Nealson, K.H., Stackebrandt, E.: Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1997, 402-407.
- Thomas, G. M., 1979 Thomas, G.M., Poinar, G.O.: *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29, 1979, 352-360.
- Tóth, M., 2013 Tóth, M., Ficzek, G., Király, I., Honty, K., Hevesi, M.: Evaluation of old Carpathian apple cultivars as genetic resources of resistance to fire blight (*Erwinia amylovora*), *Trees*, 27, 2013, 597-605.
- Turnidge, J. D., 2003 Turnidge, J.D., Ferraro, M.J., Jorgensen, J.H.: Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society of Clinical Microbiology, Washington, USA, 1103.

- Vanneste, J. L., 1996 Vanneste, J.L.: Honey bees and epiphytic bacteria to control fire blight, a bacterial disease of apple and pear. *Biocontrol News and Information*, 17 (4), 1996, 67-78.
- Vanneste, J. L., 2006 Vanneste, J.L.: Biological control of fire blight: an overview of the work carried out in New Zealand. *Proceedings of the 1st International symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases*, 408, 2006, 224-227.
- Webster, J. M., 2002 Webster, J.M., Chen, G., Hun, K., Li, J.: Bacterial metabolites, In: Gaugler, R. (Ed.) *Entomopathogenic Nematology*, CABI Publishing, New York, 2002, 145-168.
- Werner, N. A., 2006 Werner, N.A., Aldwinckle, H.S.: Two years of research on biological control of fire blight in New York. *Proceedings of the 1st International symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases*, 408, 2006, 274-278.
- XenorhabduScope <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>
- Xiao, Y., 2012 Xiao, Y., Meng, F., Qiu, D., Yang, X.: Two novel antimicrobial peptides purified from the symbiotic bacteria *Xenorhabdus budapestensis* NMC-10, *Peptides*, 35, 2012, 253-260.
- Yamaguchi, I., 1996 Yamaguchi, I.: Pesticides of Microbial Origin and Applications of Molecular Biology. In: Copping, L.G. (ed.) *Crop Protection Agents from the Nature: Natural Products and Analogues*. SCI, Cambridge, 1996, 27-49.
- van der Zwet, T., 1979 van der Zwet, T., Keil, H.M.: Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. *Agriculture Handbook 510*. US Department of Agriculture, Washington DC, 1979, 200.
- van der Zwet, T., 1995 van der Zwet, T., Beer, S.V.: Fire Blight – Its Nature, Prevention and Control. A practical guide to integrated disease management. United States Department of Agriculture (USDA), *Agriculture Information Bulletin*, 631, 1995.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki elsősorban Bélafiné Dr. Bakó Katalin intézetigazgató egyetemi tanárnak és Dr. Fodor András kutató-professzornak szakmai és emberi tanácsaikért, lelkesítő támogatásukért, mellyel nagyban segítettek a kutatómunkában és a dolgozat elkészítésében. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Tóth Magdolna tanszékvezető egyetemi tanárnak és Dr. Polgár Zsolt-nak a kísérleti növényanyagok biztosításáért, valamint Dr. Takács András Péter intézetigazgató egyetemi docensnek, hogy a veszprémi Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet mellett a keszthelyi Növényvédelmi Intézetben is lehetőséget biztosítottak a kísérletek megvalósításához.

Köszönet illeti Dr. Csanádi Zsófia egyetemi adjunktust, Dr. Böszörményi Erzsébet egyetemi docenst és Tatai Anita növényorvost a kezdeti szakaszban nyújtott biztatásukért és a közös előadásokban, publikációkban megnyilvánult ösztönzésükért, mellyel motiváltak. Dr. Hevesi Mária Tanárnőnek hálásan köszönöm az alma virágos kísérletek tervezésében nyújtott önzetlen segítségét és kedvességét, Liszt Katának pedig a kivitelezésben betöltött támogató szerepét. Dr. Nemestóthy Nándor egyetemi docensnek a statisztikai értékelésben nyújtott segítségéért jár köszönet.

Szeretném megköszönni a Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet valamennyi munkatársának támogatását, amivel a disszertáció elkészüléséhez hozzájárultak. Külön köszönet illeti Lövitusz Évát, akinek a több évtizedes biotechnológiai tapasztalata és vidám természete elősegítette a kísérletek gyakorlati megvalósítását.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetemet fejezem ki családomnak, barátaimnak, akik az elmúlt években támogattak és pozitív gondolatokkal, inspirációval láttak el, segítve a disszertáció elkészítésében.