



**XXXII. OTDK
2015**

Kémia és Vegyipar Szekció



Bakteriofágterápiás növényvédő szerek

Készítette:

Frank Tamara

Biomérnöki alapszak, 4. évfolyam

Témavezető:

Dr. Kovács Tamás

Enviroinvest Zrt., Vezérigazgató-helyettes

Konzulens:

Bélafiné dr. Bakó Katalin

Egyetemi tanár

Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet

Mérnöki kar

Pannon Egyetem

Veszprém

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Szakirodalmi áttekintés	2
2.1. Az almafélék tűzelhalásos betegsége	2
2.2. A diófa.....	3
2.2.1. A diófa betegségei	3
2.2.2. Xanthomonasos bakteriózis	4
2.3. Bakteriofágok.....	7
2.3.1. A fágfertőzés lefolyása	8
2.3.2. Fágterápia	9
2.3.3. Korábban izolált Xanthomonas-ellenes fágok.....	10
3. Anyagok és módszerek.....	11
3.1. Tápközegek	11
3.2. Fágok izolálása.....	11
3.3. Fágtörzsek genetikai alapú elkülönítése.....	13
3.4. Fágok morfológiai jellemzése	14
3.5. Fágok gazdaspecifitás vizsgálata	15
3.6. A fágtörzs életciklus elemzése	15
3.7. Laboratóriumi alkalmazási kísérlet.....	15
4. Kapott eredmények és kiértékelésük.....	16
4.1. Fágok izolálása.....	16
4.2. Fágtörzsek genetikai alapú elkülönítése.....	19
4.3. Fágok morfológiai jellemzése	22
4.4. Fágok gazdaspecifitás vizsgálata	24
4.5. A fágtörzs életciklus elemzése	25
4.6. Laboratóriumi alkalmazási kísérlet.....	27
5. Összefoglalás.....	29
6. Hivatkozások, források.....	30
7. Köszönetnyilvánítás	32

1. Bevezetés

Egyes bakteriális növénybetegségek ellen jelenleg nem rendelkezünk hatékony vegyszeres vagy biológiai védekezési eljárással. A gyümölcsfákban a különböző baktériumok hatalmas károkat képesek okozni, ami jelentős termés kiesés jelent a gazdáknak. Kiemelt figyelmet érdemel az almafélék tűzelhalásos betegsége, melyet az *Erwinia amylovora* baktérium, valamint a diófák baktériumos levél- és gyümölcsfoltossága, melyet a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktérium okoz.

A gyümölcsfák kémiai antibiotikummal való kezelését az Európai Unió 2008-ban betiltotta (889/2008/EK rendelet). Ellenállóbb fák ültetésén kívül nemigen maradt más megoldás a gyümölcsfák betegségei ellen.

A probléma megoldására új alternatívának tűnik a fágterápia, melynek lényege, hogy a kórokozó baktériumot a rá specifikus bakteriofággal fertőzik meg. Egy hazai cég (az Enviroinvest Zrt.) fejlesztésének köszönhetően, az *E. amylovora* ellen 2012-ben Magyarországon forgalomba került az ERWIPHAGE márkanévű fágterápiás növényvédő szer. Használatával a rózsafélék tűzelhalásos betegsége jelentősen csökkenthető.

Az Enviroinvest Zrt. kutatásainak a célja, hogy hatékony fágterápiás szert állítson elő a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktérium ellen. Dolgozatomban ennek a kutatási munkának a részfeladatait végeztem el, illetve áttekintést nyújtok a már említett, forgalomban lévő fágterápiás növényvédő szer alkalmazásának tapasztalatairól.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Az almafélék tűzelhalásos betegsége

A tűzelhalás betegséget először 1780-ban dokumentálták az Egyesült Államokban. Észak-Amerikában a betegség őshonosnak számított. A kórokozó Európában 1955-ben jelent meg Angliában. Ezt követően a betegség gyorsan terjedt a keleti országok felé, majd eljutott Afrikába, Ázsiába és Ausztráliába is. Magyarországon a tűzelhalás betegségét 1995-ben észlelték. A betegség ma már az egész országban előfordul (Hevesi, 2009).

Az *Erwinia amylovora* egy Gram negatív baktérium. A rózsafélék családjába tartozó növények, mint például a birs, az alma, a körte, számos dísznövény és vadonélő növényfaj (galagonya) tűzelhalásos megbetegedését okozza. A baktérium tavasszal, a virágzás ideje alatt fertőz. Elsősorban a virágon belül szaporodik, és innen terjed tovább a többi növényi szövetbe, ahol baktériumos üregeket hoz létre. A fertőzés terjedését a nedvesség elősegíti, így esős, párás időben gyorsabban terjed. A baktérium csak aktív, növekedésben lévő növényt támad meg, az elhalt szövetekben azonban még akár két év múlva is aktívvá válhat.

A betegséget sokáig a sztreptomycin nevű antibiotikummal kezelték, de a hosszantartó kezelés hatására a kórokozó baktériumtörzseknél kialakult a sztreptomycin-rezisztencia. A közelmúltig e betegségnek nem volt hatékony ellenszere. Az Enviroinvest Zrt. munkatársai célul tűzték ki, hogy e betegség ellen fágterápiás növényvédő szert fejlesszenek ki.

A fejlesztés alatt a cég kutatói 39 bakteriofág törzset teszteltek laboratóriumi körülmények között, majd két törzset választottak ki terepi kísérletre. A permetezőszer a két fág törzsön kívül UV-védő adalékanyagot (fumársavat) és alginátot is tartalmazott (utóbbi a fágok kitapadását segíti elő). A kísérlet során 66 almafát kezeltek e biológiai növényvédő szerrel és 70 almafát hagytak kezeletlenül, kontrollnak.

Szignifikáns különbség volt kimutatható a betegség megjelenését illetően a kezelt és a kezeletlen fák között. Az eredmények megerősítették, hogy a bakteriofágkezelés hatékony megoldást jelent a tűzelhalás és más bakteriális növényi betegségek ellen. Az *E. amylovora* ellen 2012-ben Magyarországon forgalomba került az ERWIPHAGE márkanévű fágterápiás növényvédő szer. Azóta négy alkalommal végzett a hatóság szabadföldi kísérletet, melyek bizonyították a készítmény hatásosságát. Ezeket az eredményeket az Enviroinvest Zrt. kutatói rövidesen publikálják. Az ERWIPHAGE sikeres alkalmazása során nyert tapasztalatok

alapján az Enviorinvest Zrt. megkezdte több növényvédelmi célú fágterápiás készítmény fejlesztését, melyek közül a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*-ellenes növényvédő szer fejlesztésében vettem részt.

2.2. A diófa

A diófa jellemző élőhelye Európa és Ázsia. A világ többi részére, Amerikába, Ausztráliába és Afrikába az ember vitte el. A diófa nagyelterjedésű élőhelyén kialakult sok különböző dió típus. A nagyobb tájegységek diótípusait összefoglalóan rasszoknak nevezik, melyekből a két legfontosabb a közép-ázsiai és a kárpáti. Utóbbi kiterjedési területéhez tartozik Magyarország is. Hazánkban csak egyféle dió terem, a *Juglans regia*, melyet mi magyarok „közönséges dió”-nak nevezünk. Diófák az ország összes megyéjében találhatók. Országunkban több nagy dióültetvény is található, köztük a legnagyobb kiterjedésű Lengyeltótiiban. Magyarország diófainak jelentős része azonban házi, kerti faként magánszemélyek kertjeiben áll.

A diófa jellemzően magányosan áll, nagy teret foglal el. Hatalmas lombkoronával és kiterjedt gyökérzettel rendelkezik, így igen nagy a fény- és tápanyagigénye.

A diófa alatti földterület többnyire kopár. Ennek oka, a diófa juglon termelése, mely fontos szerepet tölt be a diófa természetes védekezési mechanizmusában. A juglon sokféle élőlényre mérgező hatású kémiai vegyület. Gyűrűs, erősen reaktív molekula, mely az élőlények polipeptid láncaihoz kapcsolódva gátolja azok természetes életműködést (Orosz, 2005).

2.2.1. A diófa betegségei

A diófák természetes védekezési mechanizmusai ellenére is a diósok rengeteg kártevőnek és betegségnek vannak kitéve. Ám ezek túlnyomó többsége nem a diófára specifikus, így ritka az olyan betegség, amely a diófát el is pusztítja.

Egy dió ültetvényben a legkisebb kárt az emlősök és madarak okozzák, mint például a mókus, mezei pocok, varjú és a szajkó. Nagyobb problémát jelentenek a virágos élősködők, melyek a diófán élve szívják ki a vizet és a szerves anyagokat a fa ágaiából, illetve a különböző ízeltlábúak, mint a molyok, lepkék és tetvek.

A legnagyobb kárt egy dióban a mikroorganizmusok képesek okozni. Bár a diófák juglon termelésével természetes úton igyekeznek védeni magukat kártevőktől, mégis sokféle betegséggel találkozhatunk egy dióban.

A dió gyűrűsfoltossága egy vírus által okozott betegség, mely a fa elkerülhetetlen halálát okozza. A betegség Magyarország egész területén megtalálható. A vírust fonálférgek terjesztik, de az ember a különböző metsző szerszámokkal is hamar továbbadhatja. A vírus lappangási ideje 8 hónap is lehet. A betegség többnyire a fiatal csemetéken jelenik meg, melyeket el is pusztít. Szerencsére az idősebb fákat sokkal ritkábban fertőz, így nem szükséges a 10-30 éves fákat kivágni, ami sokkal nagyobb kárt jelentene.

Az *Erwinia brenneria* baktérium a diófa kérgét és az alatta lévő faanyagot támadja. Először keskeny repedés jelentkezik a fák kérgén, amiből piros-barna folyadék folyik. Később a repedés hosszanti irányba és keresztbe is szélesedik. A baktériumot az eső, a szél és rovarok terjesztik. Ez a betegség Magyarországon még nem terjedt el, bár több helyen (pl. Lengyeltótiiban is) már megjelent.

A gnomóniás levélfoltosság okozója a *Gnomonia leptostyla* gombafaj. A betegség az egész világon előfordul és a magyar diósokban is nagy károkat okoz. A gnomónia leginkább a lehullott leveleken és a lehullott vagy a fán maradt diókopáncsokon, terméskocsányokon telel át. Tavaszig szaprofita életmódot folytat, vagyis a lomb és a burok anyagain él, azokat bontja el. Tavasszal már egy kevés csapadék hatására is elszórja a spóráit, melyek a légárammal utazva fertőzik meg ismét a diófákat.

A Gnomóniás levélfoltosság a *Xanthomonas* baktériumos fertőzéstől a levélen jelentkező sötétbarna, sokszög alakú foltokról különböztethető meg. A foltok szegélye barna, közepe világosabb barna, közepük később kiszürkül. A diófa hajtásán jelentkező fertőzés ovális, barna szegélyű foltokban látható. A foltok kissé besüppednek.

2.2.2. Xanthomonasos bakteriózis

A baktériumos levél- és gyümölcsfoltosság a dió egyik leggyakoribb betegsége, mely hatalmas károkat okoz a diófákban. A kár mértéke erősen időjárás-függő. A baktérium nedves, esős időben jobban fertőz, így a köd pára, harmat, sőt még a locsolók is elősegítik a fertőzést. A száraz, szeles idő csökkenti a fertőzésveszélyt. A baktérium leginkább a friss, zöld részeit támadja a fának, mint a rügyek, levelek, virágok és a zölddiók.

A betegség már kora tavasszal megjelenik. A friss, fiatal leveleken kis vöröses-barna foltok jelennek meg, többnyire a levélszéleken, vagy az erek melletti részekben **(1. ábra)**. A kis foltok folyamatosan növekszenek, összeolvadnak, majd végül összefüggő, sötét alakzatot hoznak létre. Komoly fertőzés esetén a levelek elhalnak és lehullnak. Az ágakon és a fiatal hajtásokon a baktérium kissé sötétebb foltokat okoz. A fertőzés kora tavasztól nyárig tart. A korai fertőzés okozza a gyümölcsök leesését, a későbbi fertőzés a dió összezsugorodását és elszíneződését **(2. ábra)**.



1. ábra: A fertőzés első jelei a levél erek mellett



2. ábra: Az elszíneződött gyümölcsök

A baktérium a fa minden részében képes áttelelni, így a téli fagy sem szünteti meg a betegséget. A növények fertőzött része akár 3 éven át is képes továbbterjeszteni a kórokozókat. A baktérium a növényi szövetekbe a gázcserenyílásokon illetve a növényen lévő sérüléseken keresztül jut be (Orosz, 2005).

A *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* egy Gram negatív, flagellummal rendelkező, pálcika alakú baktérium, amely sárga színanyagot (xantált) termel. Növényi kórokozó, kizárólag a növények megfertőzésére képes, az emberre ártalmatlan. Szaprofita, vagyis heterotróf életmódot folytat, de nem képes elpusztítani a táplálékul szolgáló szervezetet. Mérete átlagosan $0,2-0,5 \times 1,2-2,0 \mu\text{m}$. YPGA táptalajon, 28°C -on tenyésztve sárga, kör alakú telepeket alkot, melyek kissé kiemelkednek (**3. ábra**).



3. ábra: A *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktérium telepek YPGA táptalajon

2.3. Bakteriofágok

A bakteriofágok a baktériumok intracelluláris parazitái. A bakteriális vírusok nagyon sokféle különböző formában és méretben fordulnak elő. Tipikusan egy külső, fehérjékből álló kapszid burokból és az abban elhelyezkedő nukleinsavból állnak. Örökítő anyagukat tekintve is nagy változatosságot mutatnak. Nukleinsavuk lehet DNS és RNS, egyes szálú vagy kettős szálú, cirkuláris vagy lineáris szerkezetű. A fágok haploid genommal rendelkeznek. Nukleinsavuk nem kapcsolódik hisztonszerű fehérjékhez, feltekeredve a vírusok feji részében helyezkedik el. A legtöbb fág henger alakú, üreges farokkal rendelkezik, ami feji részhez kapcsolódik.

Változatos felépítésük miatt a bakteriofágokat nehéz rendszerezni. Az irodalomban megjelenő fágok mintegy 96%-át a kettős szálú, lineáris DNS-sel és farokkal rendelkező bakteriofágok adják, melyeket a Caudovirales rendbe sorolnak. A farok szerkezete, morfológiája alapján további 3 nagy családba tartozhatnak (Fauquet, 2005).

- Myoviridae: burok nélküli, kontraktilis farok
- Siphoviridae: burok nélküli, hosszú, nem kontraktilis farok
- Podoviridae: burok nélküli, rövid nem kontraktilis farok

2.3.1. A fágfertőzés lefolyása

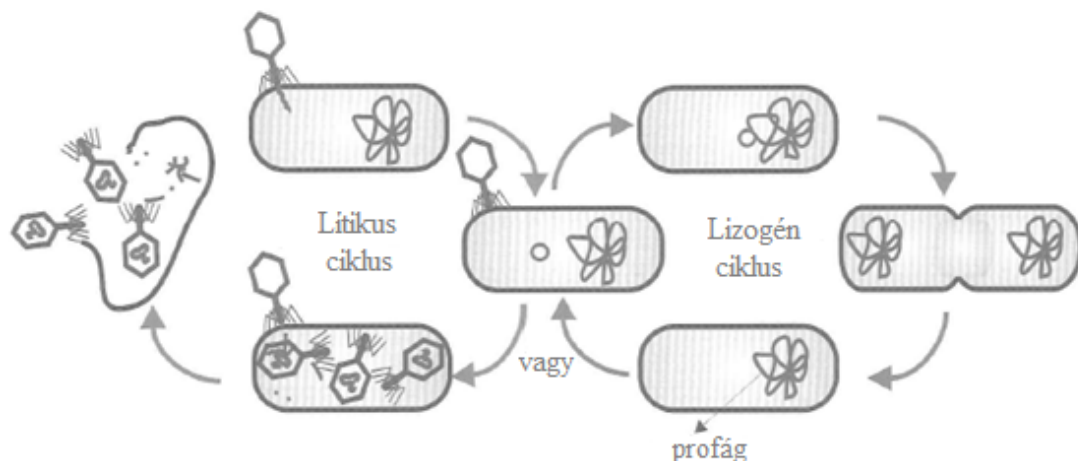
A bakteriofágok gazdaspecifikusak, így általában csak egy baktériumfaj megfertőzésére képesek. A fertőzés első lépése, hogy a kapszid burkuk felszínén található receptorfelismerő fehérjék segítségével felismerik a gazdasejtet. Ezután a sejt felszínén található proteinek, oligoszacharidok és lipidek segítségével megtörténik az irreverzibilis megtapadás, vagyis az adszorpció.

A vírusfertőzés második lépéseként be kell juttatni az örökítő anyagot a fertőzött sejt citoplazmájába. A vírusok morfológiai diverzitásából következik, hogy ez a folyamat sokféle módon mehet végbe. Például a bakteriofágok, a farkuk segítségével átszúrják a külső sejtmembránt, majd saját enzimeik segítségével emésztik a sejtfalat. Ezután a farkuk belsejében található csövön keresztül bejuttatják a DNS-t a gazdasejtbe. Ez a folyamat ATP igényes, és viszonylag gyorsan lezajlik.

Harmadik lépés a DNS szintézis és az új vírusok összeállítása. Ez két féle úton mehet végbe. Az egyik lehetőség, hogy a gazdasejtbe juttatott DNS közvetlenül a bejutás után megkezdje a replikácót. A másik módja az örökítő anyag másolásának, hogy a citoplazmába jutott DNS beépül a gazdasejt genomjába és ott profág formájában a bakteriális genommal együtt replikálódik. Bármelyik úton is zajlik a virális DNS felsokszorozása, a folyamathoz szükséges géneket a vírus genomja kódolja, de az enzimeket és nukleotidokat maga a gazdasejt termeli.

Azokat a vírusokat melyek nukleinsava beépül a gazdasejt genomjába lizogén vírusoknak hívjuk. A sejt egészen addig a lizogén ciklusban marad és szaporodik, - vagyis az örökítő anyaga másolódik a profággal együtt - amíg a beépült profág bizonyos hatásokra (pl. a gazdasejt SOS válaszát kiváltó hatások) aktiválódik. Ekkor a sejt belép a lítikus ciklusba. A vírusok másik csoportja a lítikus vírusok, melyek szaporodásánál nincs lizogén ciklus. A kétféle életciklust a **4. ábra** mutatja be (Sabour and Griffith, 2010).

A DNS másolás után, következik az új vírusok fehérjéinek előállítása, ami szintén a sejt citoplazmájában történik. Mind a kapszid, mind a core fehérjék előállításához a vírus DNS-e kódolja a megfelelő aminosav sorrendet, de a gazdasejt biztosítja az aminosavakat.



4. ábra: A vírusok életsiklusai

A fertőzés negyedik, egyben befejező mozzanata az új vírusok kijutása a baktérium sejtéből. Az új fágreszecskek sejtéből való kiszabadulását a holin és endolizin fehérjék szinergikus akciója segíti elő. A holin fehérjék kis csatornákat képeznek a sejtmembránban, melyek révén - a murein bontó aktivitással rendelkező - endolizin enzimek elérnek a sejtfallal murein rétegét és elbontják azt. Ennek hatására csökken a sejtfallal szilárdsága, és a belső és külső tér ozmotikus nyomás különbsége a sejt líziséhez vezet. A kiszabadulás után a fágok újabb gazdasejtet képesek megfertőzni.

2.3.2. Fágterápia

A fágterápia baktériumok specifikus elpusztítása fágokkal. Fágterápiára lítikus bakteriofágokat lehet hatékonyan alkalmazni, és ha biztosítjuk a megfelelő körülményeket, a fágterápiának rengeteg előnye van az antibiotikus kezelésekkel szemben.

A bakteriofágok erősen gazdaspecifikusak, így csak a megcélzott baktériumokat pusztítják el. A többi jelen lévő (ártalmatlan vagy esetleg hasznos) baktériumot nem képesek megfertőzni.

Rendkívül hasznos tulajdonságuk, hogy a bakteriofágok a fertőzött területen koncentrálnak, mivel szaporodásukhoz szükség van a gazdaszervezetre, így éppen ott szaporodnak leginkább, ahol a legtöbb kórokozó található. Így a koncentrációjuk egészen addig növekszik, amíg a betegséget okozó baktériumok jelen vannak. Ezzel szemben az antibiotikumok koncentrációja folyamatosan csökken az idő előre haladásával, illetve a természetes metabolizmussal eltávoznak a szervezetből.

A fágterápiás készítmények fejlesztése sokkal kevesebb időt vesz igénybe, valamint a kutatás, fejlesztés költsége is jóval alacsonyabb, mint a hagyományos antibiotikumoké.

Az antibiotikumok alkalmazása szelekciós nyomást gyakorol a gazdabaktériumokra. A sejt így próbál alkalmazkodni, az új kedvezőtlen körülményekhez. A túlzott antibiotikum használat következtében a baktériumtörzs teljesen rezisztensé válhat az adott kémia vegyületre. Ezzel szemben a bakteriofágok együtt fejlődnek tovább a baktériumokkal: Egy baktériumban megjelenő mutáció hatására a jelenlévő fágpopulációban is olyan változások mennek végbe, melyek révén az új (mutált) baktériumok megfertőzésére képes vírusok túlsúlyba kerülnek a populációban, így a gazdaszervezet és az őt fertőzni képes bakteriofágok folyamatos kölcsönhatásban állnak egymással.

Talán a legfontosabb előnye a fágterápiának az antibiotikumokkal szemben, hogy nincs kimutatható mellékhatása.

A legtöbb fágterápiás készítmény nem egy fágtörzset tartalmaz, hanem több törzs keverékét, úgynevezett fágkoktélokot. A növényvédelmen kívül a fágterápia a humán, illetve állati gyógyászatban is alkalmazható. Sokan, a jövő zöld gyógyászatának egyik ágának tartják.

2.3.2. Korábban izolált *Xanthomonas*-ellenes fágok

Sandra Romero-Suarez, Brian Jordan és Jack A. Heinemann munkájából kiderül, hogy *Xanthomonas*-ellenes bakteriofágokat már korábban is izoláltak, Új-Zéland déli szigetén. Több, különböző dióültetvényből vettek összesen 326 talaj és növényi mintát (rügyek, levéllyél, levelek és gyümölcsök).

A mintákból összesen 26 különböző fágot izoláltak. Vizsgálták a fágok gazdaspecifitását, a plakkok és vírusrészecskék morfológiáját. Megfigyelték, hogy milyen mértékben tolerálják a különböző tárolási hőmérsékleteket, mennyi ideig maradnak stabilak. Az izolált fágok genomját restrikciós endonukleázokkal emésztették. Filogenetikai vizsgálatnak vetették alá őket.

A kísérleti eredményekből kiderült, hogy a fágok kettősszálú DNS-sel rendelkeznek. A burok és farok méretei alapján a Podoviridae és Siphoviridae családba sorolhatóak. A Siphoviridae család tagjait csak a rizoszférából sikerült izolálni. Az izolált fágok közül 16

tartozott ebbe a családba. Podoviridae családba tartozó fágokat sikerült izolálni mind a filloszférából, mind a rizoszférából.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Tápközegek

A kísérletek során módosított Luria Bertani (LB) tápoldatot és táptalajt használtunk föl.

1 liter tápoldat tartalmaz:

- 5 g pepton (Fluka)
- 3g élesztőkivonat (Fluka Analytical)
- 5g NaCl (Aldrich)

1 liter táptalaj tartalmaz továbbá 15 g agart (VWR Prolabo) is.

A tápközegek pH-ját NaOH-dal (Szkarabeusz Laboratóriumi, Vegyipari és Kereskedelmi Kft.) $7 \pm 0,2$ -re állítottuk, majd autoklávban sterilizáltuk. A táptalajokat Petri csészékbe öntöttük ki.

3.2. Fágok izolálása

A mintavételezés helye Lengyeltóti, a Juglans Hungária Kft. telephelye volt. A bakteriofágok izolálásához talajmintákat vettünk a fertőzött fák törzsétől mért, fél méteres sugarú körön belülről, a talaj felső 20 cm-éből.

A hozott talajmintákat homogenizáltam, majd mindkét mintából 40 ± 5 grammot kimértem és hozzá adtam 50 ml tápoldatot. A lombikokat 24 órára, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os rázó termosztátba (Sanyo) helyeztem, 160 rpm-es fordulatszámra.

A minták pontos tömege:

- A minta: 44 g
- B minta: 39,5 g

A talajmintákat steril gézlapon leszűrtem, hogy a nagyobb szennyeződésektől megszabaduljak, majd 2600 g-n, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 40 percig centrifugáltam. A felülúszókat $0,2\text{ }\mu\text{m}$ pórus átmérőjű steril szűrőn szűrtem át.

Overnight kultúrát készítettem. A -80 °C-ra fagyasztott 18 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktériumtörzset felolvasztottam, majd minden törzsből 400 µl-t hozzáadtam 5-5 ml tápoldathoz. A 18 kémcsövet éjszakára, 28 °C-on, 160 rpm-es fordulatszámon orbitális rázótermosztátban rázattam. A 18 baktériumtörzset 6 csoportra osztottam az **1. táblázat** szerint.

1. táblázat: A baktériumtörzsek csoportosítása

sorszám	baktérium törzsek száma		
1.	1324	1326	1327
2.	234	235	1153
3.	1107	1112	1258
4.	1049	1105	1317
5.	1159	1181	18808
6.	1154	1169	1318

6 kémcsőbe összemértem 7 ml tápoldatot, 20 µl 1M-es MgCl₂ x 6 H₂O-t és 3 ml „A” mintát. Másik 6 kémcsőbe összemértem 7 ml tápoldatot, 20 µl 1M-es MgCl₂ x 6 H₂O-t és 3 ml „B” mintát. A 6 logaritmusos növekedési fázisban lévő baktérium csoportot mind az „A”, mind a „B” mintához hozzámértem. Minden felnövesztett baktériumtörzsből 70 µl-t vettem ki. A 12 kémcsövet 24 órára 28 °C-ra 160 rpm-re rázótermosztátba helyeztem.

A 18 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* törzsből 400 µl-t 5-5 ml tápoldatba mértem és éjszakára, 28 °C-ra termosztátba helyeztem, közben 160 rpm-es fordulatszámon rázattam orbitális rázóban. A logaritmusos fejlődési fázisban lévő baktériumtörzsekből, módosított LB táptalajra baktériumgyepet készítettem. 3 óra elteltével minden baktériumgyepre 3 x 20 µl „A” és 3 x 20 µl „B” mintát cseppentettem fel, és 3 napig 28 °C-on inkubáltam.

Passzálás

Hígítási sort készítettem a mintákból 10⁷-es hígításig, majd a 10² - 10⁷ hígításokból 20 µl-t felcseppentettem a fág számára legoptimálisabb baktériumgyepekre. Másnapra megjelentek a feltisztult plakkok.

Minden mintához tartozó egyedülálló, elkülönült plakkból steril fogpiszkáló hegyével leszedtem 3 párhuzamos mintát és 200 µl fiziológiás sóoldatban feloldottam, homogenizáltam, majd hígítási sort készítettem, 10⁴-es hígításig. A hígítási sor minden

tagjából 20 µl-t felcseppentettem az adott baktériumgyepre. 24 óra múlva megjelentek a plakkok.

A mintákról újra leszedtem egy-egy különálló plakkot, feloldottam fiziológiás sóoldatban, hígítási sort készítettem 10^5 -es hígításig. A hígítási sor minden tagjából 20 µl-t felcseppentettem az adott baktériumtelepre.

20 ml fiziológiás sóoldathoz 40 µl 1M $MgCl_2 \times 6 H_2O$ -t adtam és a leszedett plakkokat ebben oldottam fel. Hígítási sort készítettem 10^4 -es hígításig, majd felcseppentettem 20 µl-t az adott baktériumgyepre. Másnapra megjelentek a feltisztult plakkok.

A plakkokból egyet-egyet 200 µl fiziológiás sóoldatban feloldottam. 50 ml tápoldathoz 100 µl 1M $MgCl_2 \times 6 H_2O$ -t, valamint 500 µl logaritmikus növekedési fázisú baktérium kultúrát. A kapott szuszpenziót 24 órát 28 °C-on 160 rpm-en rázattam.

A 24 óra leteltével a mintákat átöntöttem Falcon-csőbe és 2600 g-n 4 °C-on 30 percig centrifugáltam. A felülúszót steril, 0,2 µm-es szűrőn átszűrtem.

A szűrlet feléből, minden mintából hígítási sort készítettem 10^7 –es hígításig, majd a 10^4 – 10^7 –es hígításokat dió táptalajra 20 µl-t felcseppentettem és 24 órát 28 °C-on inkubáltam.

A szűrlet másik felét 15500 rpm-mel 4 °C-on 60 percig centrifugáltam. A felülúszót leöntöttem, a maradék folyadékot kicsepegtettem. A Falcon-cső aljában maradt összetömörödött bakteriofág foltot 1 ml molekuláris biológiai tisztaságú, steril desztillált vízzel többször leöblítettem. Az így kapott 1 ml fág oldatot 3 részre osztottam:

- 50 µl-ből hígítási sort készítettem és meghatároztam a titert
- 450 µl-t elküldtünk elektronmikroszkópiás vizsgálatra
- 500 µl-ből DNS-t izoláltam

3.3. Fágtörzsek genetikai alapú elkülönítése

A DNS izolálása High Pure Viral Nucleic Acid Purification Kit (Roche) segítségével történt, a gyártó utasításai alapján. Az izolált DNS mennyiségét és minőségét gélelektroforézissel ellenőriztem. A kapott DNS-t 0,7 %-os agaróz gélen megfuttattam és GelRed (Biotium) segítségével festettem.

Gél:

- 0,35 g (0,7%) / 0,5 g (1%) agaróz (Invitrogen)
- 50 ml TBE puffer

1000 ml TBE puffer tartalmaz:

- 10,8 g Tris (Sigma-aldrich)
- 5,5 g Bórsav (Spektrum 3D)
- 4 ml, 0,5M EDTA (Scharlan)

Az izolált DNS-t restrikciós endonukleázokkal emésztettem.

A felhasznált enzimek:

- FastDigest PstI (Fermentas)
- FastDigest EcoRI (Fermentas)
- FastDigest Csp6 (Fermentas)

A reakciókat a gyártó által ajánlott protokoll szerint végeztük. Az emésztéseknél 1 µg fág DNS-t használtunk. A csöveket 37 °C-on, 10 percig inkubáltuk. Az emésztett fragmentek egymástól való elválasztásához 1%-os agaróz gélét készítettünk. A fragmenteket közvetlenül a gélhez adott GelRed (Biotium) festékkal vizualizáltuk.

Az izolált fág DNS-ét összevettem az Enviroinvest Zrt. által korábban izolált Xanthomonas-ellenes fágok DNS-ével, melyhez az előzőek mellett a FastDigest HindIII (Fermentas) enzimet használtam.

3.4. Fágok morfológiai jellemzése

A fágok morfológiai jellemzése elektronmikroszkópiás vizsgálattal történt. A átlagosan 10^{10} -es titerű fág szuszpenziókat 16000 g-n 1 órán át 4 ° C-on centrifugáltuk. A centrifuga cső aljában összetömörödött fág-üledéket steril desztillált vízben újra feloldottuk, majd ebből a szuszpenzióból 10 µl-t felcseppentettünk egy 200 x 200-as nikkal rácsos lemezre, és 5 percig állni hagytuk. A fágokat 3%-os nátrium-foszfo-volframáttal festettük meg.

Az általam izolált fágok szuszpenzióit a Pécsi Tudományegyetemen, egy JEM-1200EX II készülékkel vizsgálták, 80 kV feszültséggel, 30000-250000-szeres nagyításon.

3.5. Fágok gazdaspecifitás vizsgálata

18 db logaritmikus fejlődési fázisban lévő *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktérium törzsből baktériumgyepet készítettem, majd a fágmintából (10^8 - 10^9 PFU/ml) 20 μ l-t a gyepre cseppentettem. A kísérletbe a *X. arboricola* pv. *juglandis* törzseken kívül három *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* törzset és egy *Erwinia amylovora* törzset vontam be. A vizsgálatot 3 párhuzamosban végeztük. 24 órás, 28 °C-os inkubáció után vizsgáltuk, hogy megjelentek-e plakkok.

3.6. A fágtörzs életciklus elemzése

A fágtörzs életciklus elemzésnél a baktérium/fág arányt úgy állítottuk be, hogy 10 baktériumra jusson 1 fág, azaz a MOI = 0,1 legyen. Tehát a fágmintát kihígítottam annyira, hogy a koncentrációja 10^7 PFU/ml legyen. A logaritmikus fejlődési fázisban lévő baktérium koncentrációját pedig 10^8 PFU/ml-nek becsültük. 3 párhuzamost készítettem. 8 ml tápoldathoz hozzáadtam 16 μ l 1M $MgCl_2 \times 6 H_2O$ -t, 1 ml baktérium szuszpenziót és 1 ml fág szuszpenziót. Az összemért oldatokból mintát vettem a fágok titer vizsgálata és a baktérium élősejtszám meghatározás céljából. A 3 kémcsövet 10 percre 28 °C-os termosztátba helyeztem, hogy a fágok adszorbeálódni tudjanak a baktérium sejtekhez. Ezután 10000-szeresre hígítottam az oldatokat és újból mintát vettem belőlük. A mintákból meghatároztam a baktériumok élő sejtszámát és a fágok titerét. A lombikokat 28 °C-ra 160 rpm-re rázótermosztátba helyeztem és 10 percenként mintát vettem. A mintákból meghatároztam a fágok titerét. A mérés során az 1105-ös *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* törzset használtam.

3.7. Laboratóriumi alkalmazási kísérlet

Ebben a kísérletben azt szeretnénk volna meghatározni, hogy a fágok milyen hatással vannak a baktériumok növekedési görbéjére. A reakció elegyeket úgy mértem össze, hogy 1 baktériumra 1 fág jusson, azaz a MOI = 1 legyen. A kontollokat és a mintákat a következőképpen mértem össze:

- Negatív kontroll (sem baktériumot, sem fágot nem tartalmaz): 1200 µl MgCl₂-os tápoldat + 600 µl tápoldat
- Pozitív kontroll (csak baktériumot tartalmaz): 1200 µl MgCl₂-os tápoldat + 500 µl baktérium szuszpenzió + 100 µl tápoldat
- Minták (fágot és baktériumot tartalmaz): 1200 µl MgCl₂-os tápoldat + 500 µl baktérium szuszpenzió + 100 µl fágoldat

A kontrollokat és a mintákat 96 lyukú mikrotiter plate-re vittem fel 6 párhuzamosban. A plate inkubálását 28 °C-on, közepes rázatással végeztük Multi-Mode Reader (BioTek, Synergy HT) segítségével. A készülék az optikai denzitást 42 órán keresztül 15 percenként mérte 600 nm-en.

4. Kapott eredmények és kiértékelésük

4.1. Fágok izolálása

A kísérlet munkám első lépése a bakteriofágok izolálása volt. A 72 órás inkubálás után a baktériumgyepeken megjelentek a különböző mértékben feltisztult plakkok (**5. ábra**). A plakkok tisztaságát a következőképpen osztályoztam:

- + + + : szép, feltisztult plakk
- + + : homályos plakk
- + : halvány, homályos plakk

A feltisztult plakkokat adó mintákról feltételeztem, hogy lítikus fágokat tartalmaznak, így ezekkel a mintákkal dolgoztam tovább. Az összesített eredményeket a **2. táblázat** mutatja be.

2. táblázat: Az izolálás eredményei

Baktériumtörzs	Minta	plakk tisztaság	fág típusa	további vizsgálat
1049	4A, 4B	++	lizogén	nem
1105	4A, 4B	+++	lítikus	igen
1155	5A, 5B	++	lizogén	nem
1181	5A, 5B	++	lizogén	nem
1258	3A, 3B	+	lizogén	nem
1317	4A, 4B	+++	lítikus	igen
1324	1A, 1B	++	lizogén	nem
1326	1A, 1B	+++	lítikus	igen
1327	1A, 1B	++	lizogén	nem
18808	5A, 5B	+++	lítikus	igen



5. ábra: A különböző mértékben feltisztult plakkok

Passzálás

48 óra elteltével a baktériumgyepeken kialakultak a bakteriofág plakkok és a nagyobb hígításoknál különálló, kis foltok jöttek létre. Az 18808-as baktériumgyepen nagyon kicsi és rosszul látható foltok alakultak ki.

A második passzálás után az 18808-as baktériumgyepen egyáltalán nem alakultak ki plakkok, ezért az 5A és 5B mintával nem foglalkoztam tovább.

A harmadik passzálás után sok mintából nem lett plakk, úgy gondoltuk, hogy a bakteriofágoknak szükségük lett volna $MgCl_2$ -ra, ezért nem tudtak szaporodni. Így az első

passzálás eredményéről újabb mintákat vettem (1 nagy 2 kicsi plakk) és megpróbáltam újra passzálni őket MgCl_2 jelenlétében.

Amely mintáknál a második passzálás után jó eredményt kaptam, a szokásos módon újra leszedtem a plakkokat és a hígítási sor elemeiből 20 μl -t felcseppentettem az adott baktériumgyepekre. A többi mintát is harmadszor is passzáltam (**3. táblázat**).

3. táblázat: A három passzálás után maradt mintáim

Baktériumgyep	Minta száma	Fág neve
1326	1A	$\Phi 20$
1326	1B	$\Phi 21$
1317	4A kicsi	$\Phi 22$
1317	4A nagy	$\Phi 23$
1317	4B	$\Phi 24$
1105	4A kicsi	$\Phi 25$
1105	4A nagy	$\Phi 26$
1105	4B	$\Phi 27$

A passzálások után maradt mintákból a titer meghatározás eredményét **4. táblázat** mutatja be.

4. táblázat: Passzálások után a szűrletek titere

baktériumgyep száma	Minta száma	becsült koncentráció (PFU/ml)
1326	$\Phi 20$	9,25E+09
1326	$\Phi 21$	5,00E+09
1317	$\Phi 22$	4,00E+09
1317	$\Phi 23$	5,50E+09
1317	$\Phi 24$	5,25E+09
1105	$\Phi 25$	3,00E+09
1105	$\Phi 26$	4,50E+09
1105	$\Phi 27$	2,00E+09

DNS izoláláshoz a fágokat centrifugálással ülepítettük, majd a csapadékot tized annyi steril desztillált vízben vettük fel. A centrifugálás után a minták titerét az **5. táblázat** mutatja be.

5. táblázat: Passzálások után a centrifugált, tömörített fágoldatok titere

baktériumgyep száma	minta száma	becsült koncentráció (PFU/ml)
1326	Φ20	9,50E+09
1326	Φ21	5,50E+10
1317	Φ22	7,50E+10
1317	Φ23	1,25E+11
1317	Φ24	1,50E+11
1105	Φ25	8,00E+10
1105	Φ26	1,80E+10
1105	Φ27	7,00E+10

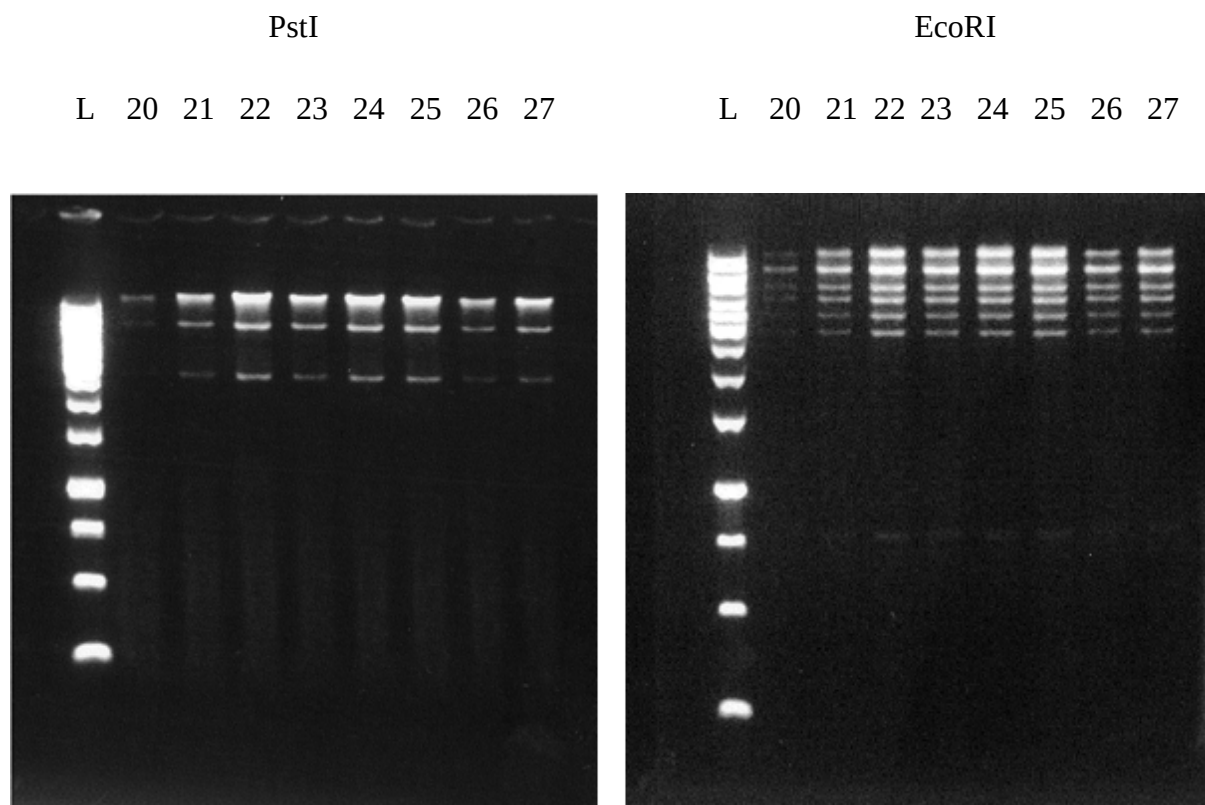
Az eredményekből látható, hogy összesen 8 plakkból tudtunk magas titerrel fágot fenntartani a három passzálás után.

4.2. Fágtörzsek genetikai alapú elkülönítése

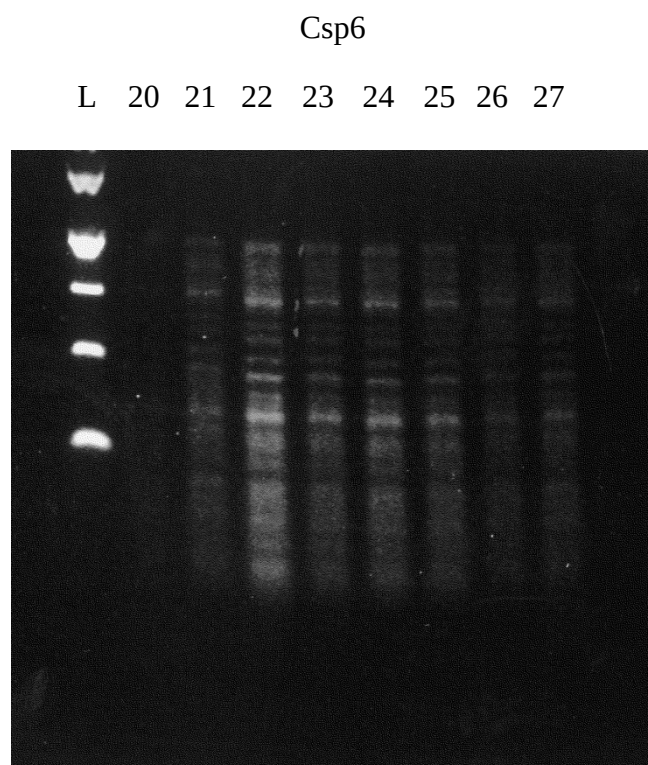
A következőkben ismertetendő kísérletek célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy az előzőekben izolált fágok egy törzshöz tartoznak-e, vagyis genetikai alapon elkülönítsük a fágizolátumokat egymástól. A genetikai alapú elkülönítéseket RFLP-vel végeztük.

Az ábrák jelölése:

- L: létra
- Számok: a fágtörzsek számát jelentik.



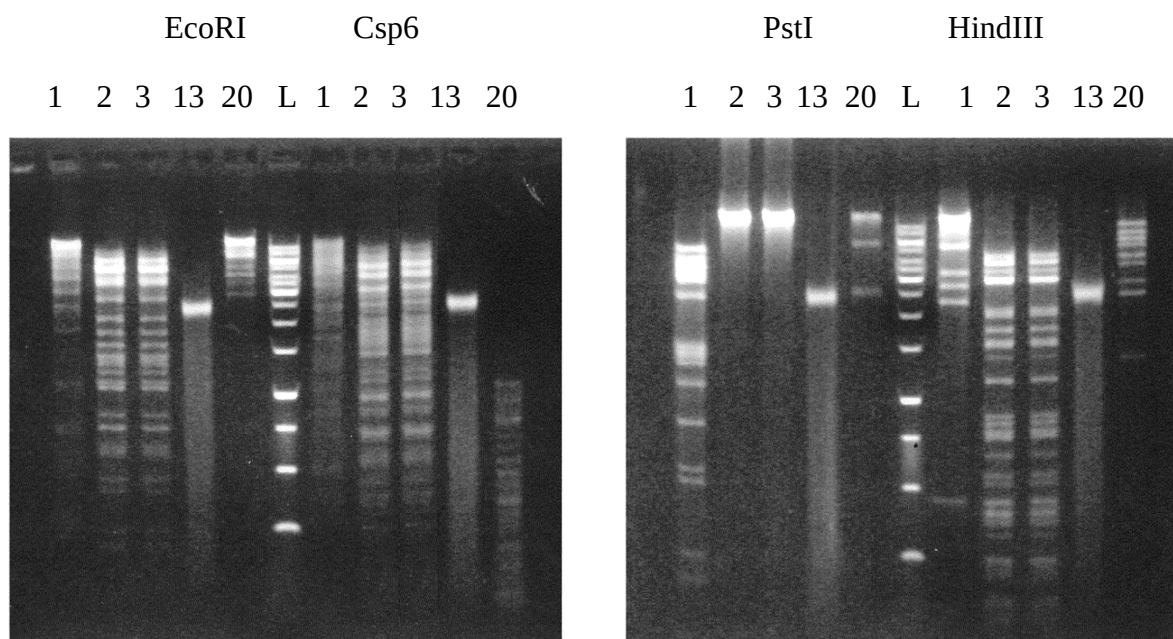
6. ábra: PstI illetve EcoRI enzimekkel való emésztés eredménye.



7. ábra: Csp6 enzimmel való emésztés eredménye.

A felvételeken látszik (**6. és 7. ábra**), hogy az általam izolált fágok egy törzshöz tartoznak, mivel mind a három enzimes hasítás eredménye azonos lett, mind a nyolc fág esetében. A fágot Φ XajH20-nak neveztük el.

Az izolált bakteriofág DNS-ét összehasonlítottam korábban izolált Xanthomonas-ellenes fágok (Φ XajH1, Φ XajH2, Φ XajH3, Φ XajH13) DNS-ével, hogy kiderüljön, sikerült-e új fágot izolálni.

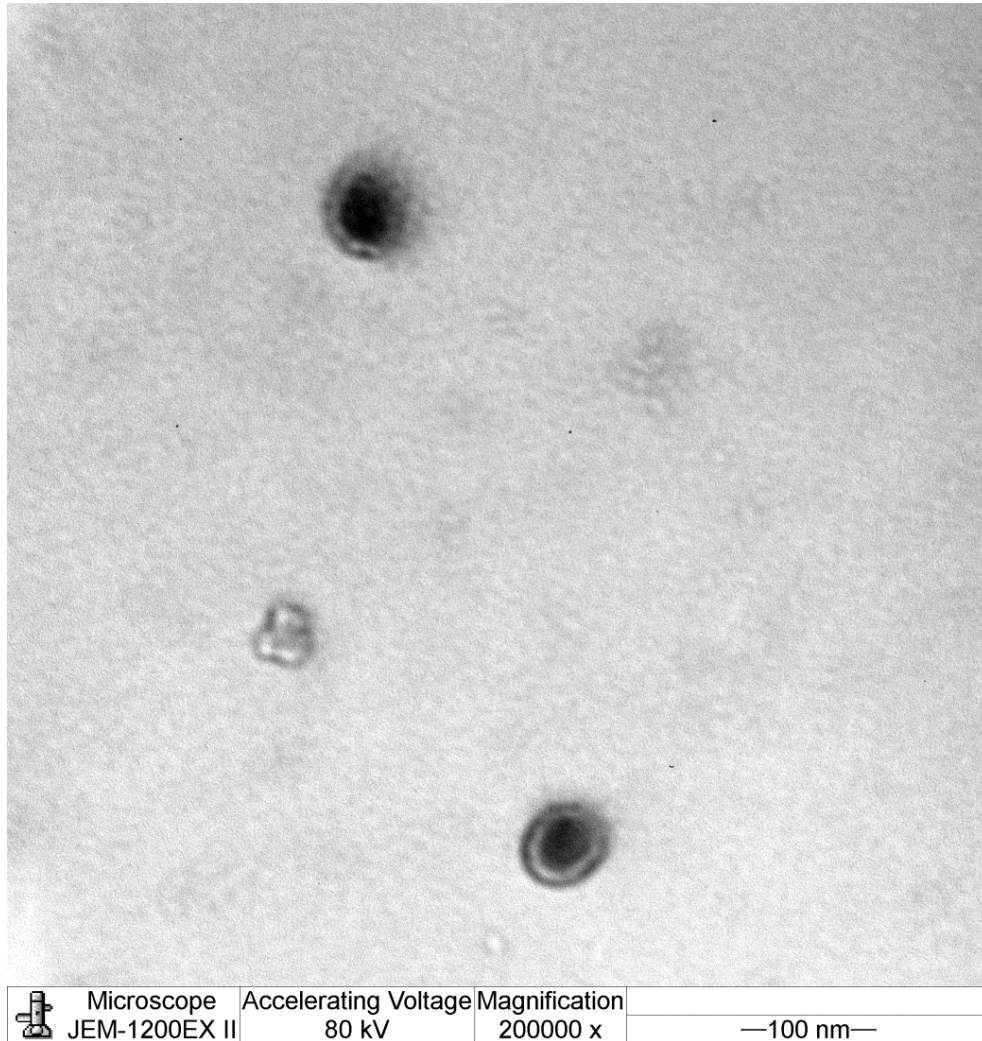


8. ábra: EcoRI, Csp6, PstI, és HindIII enzimekkel való emésztés eredménye.

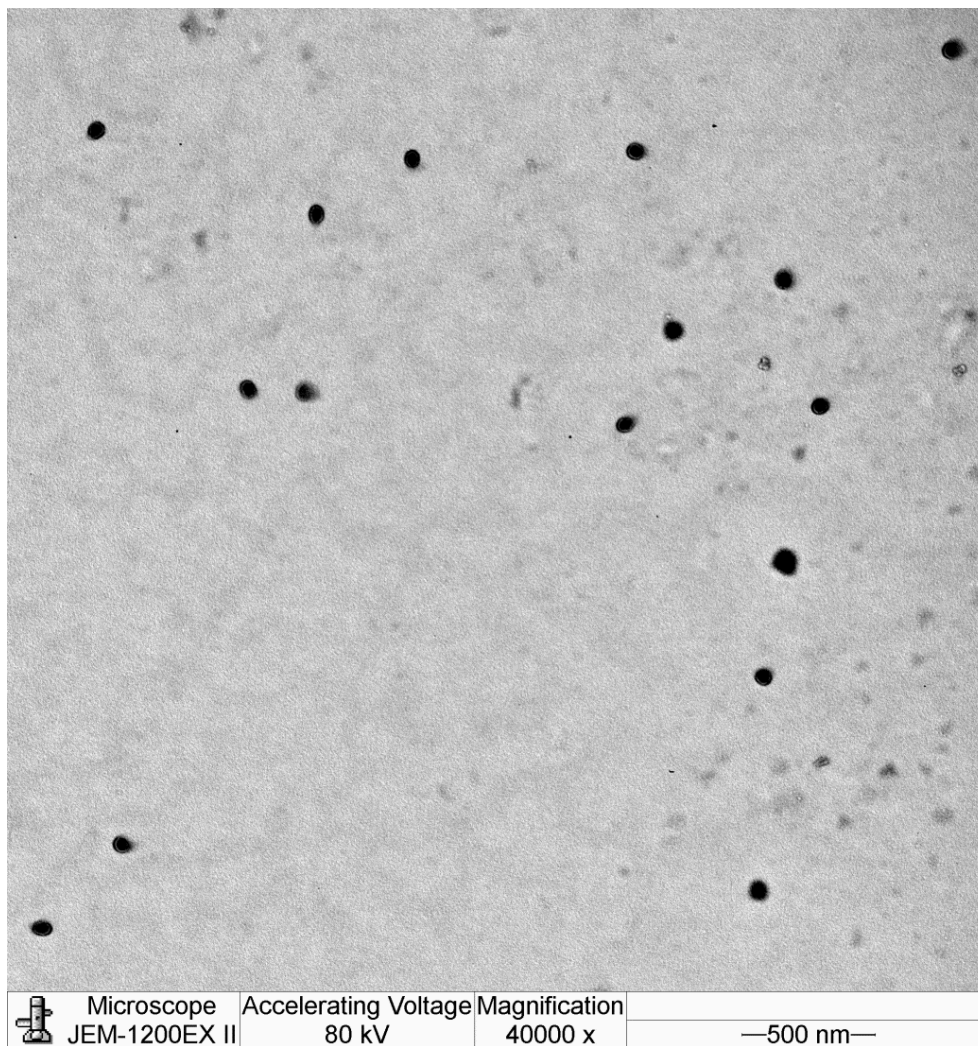
A **8. ábra** szerint az újonnan izolált fág nem egyezik meg a korábban izoláltakkal. Ezt négy különböző enzimátikus hasítás is bizonyítja. A felvételekből az is kiderül, hogy a Φ XajH2 és Φ XajH3 fágok egy törzsbe tartoznak.

4.3. Fágok morfológiai jellemzése

A morfológiai jellemzés célja, hogy megállapítsuk a fág melyik családba tartozik. Az általam izolált bakteriofág elektronmikroszkópos képeit a **9. és 10. ábra** mutatja be.



9. ábra: A Φ XajH20 fágok elektronmikroszkópos képe 200000-szeres nagyításon



10. ábra: A Φ XajH20 fágok elektronmikroszkópos képe 40000-szeres nagyításon

A felvételekből látszik, hogy az általam izolált fágoknak nincs, vagy csak nagyon rövid farka van. Ebből arra lehet következtetni, hogy a Podoviridae családba tartozik.

4.4. Fágok gazdaspecifitás vizsgálata

A következő kísérlet alapján megállapítható, hogy az általam izolált fág milyen széles gazdaspecifitás tartománnyal rendelkezik. A 24 órás inkubáció után megjelentek a különböző mértékben feltisztult plakkok, melyek osztályozását az **6. táblázat** mutatja be.

6. táblázat: A különböző baktériumgyepeken kapott plakkok tisztasága

Baktériumgyep	Φ XajH20
ATCC 29780	-
XCC 327	-
XCC 345	-
XCC 680	+
XAJ 234	+
XAJ 235	+
XAJ 1049	+
XAJ 1105	+++
XAJ 1107	-
XAJ 1112	+
XAJ 1153	++
XAJ 1154	++
XAJ 1155	++
XAJ 1169	++
XAJ 1181	++
XAJ 1258	+++
XAJ 1317	+++
XAJ 1318	-
XAJ 1324	+++
XAJ 1326	+++
XAJ 1327	++
XAJ 18808	++

- +++: szép, feltisztult plakk
- ++: homályos plakk
- +: halvány, homályos plakk

Megjegyzés: A XAJ 234 és 235-ös baktériumgyepeken, nem egy összefüggő, hanem sok apró plakk alakult ki.

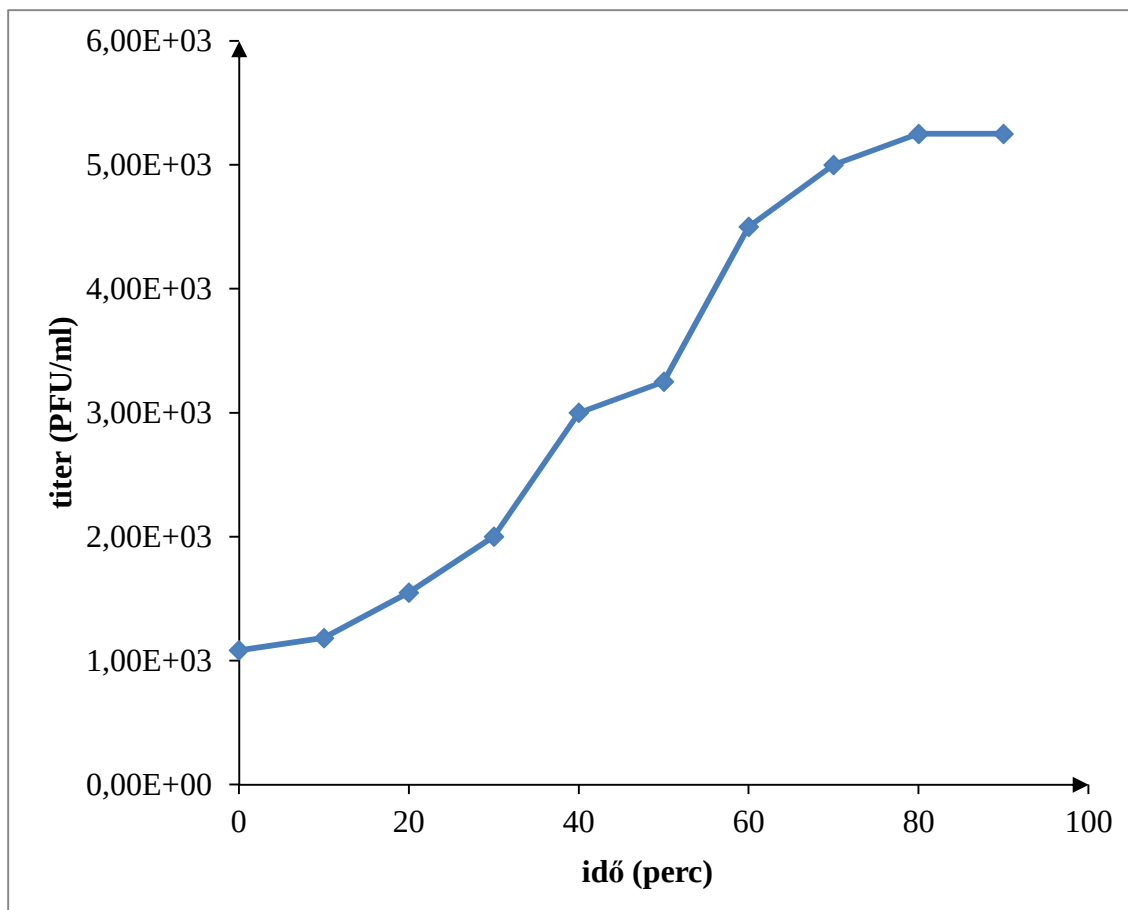
A kapott eredményekből látszik, hogy az általam izolált fág sok baktériumfajt képes megfertőzni, vagyis széles gazdaspecifitása van. A kapott eredmények azt is kimutatták, hogy a fágok nem képesek megfertőzni az *Erwinia amylovora* 29780 baktérium törzset, valamint a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 327 és 345 törzseket sem.

4.5. A fágtörzs élelciklus elemzése

Az élelciklus elemzés célja, hogy megállapítsuk, a fertőzött sejtekből az új bakteriofágok mennyi idő alatt és mekkora számban szabadulnak ki. Az élelciklus eredményeit a **7. táblázat** és a **11. ábra** mutatja be.

7. táblázat: A fágtörzs élelciklus elemzésének fág titerei

t (min)	titer (PFU/ml)
0	1,08E+03
10	1,18E+03
20	1,55E+03
30	2,00E+03
40	3,00E+03
50	3,25E+03
60	4,50E+03
70	5,00E+03
80	5,25E+03
90	5,25E+03



11. ábra: A fágok titerének változása az idő függvényében

Élősejtszám a kísérlet kezdetekor = $5,3 \times 10^3$

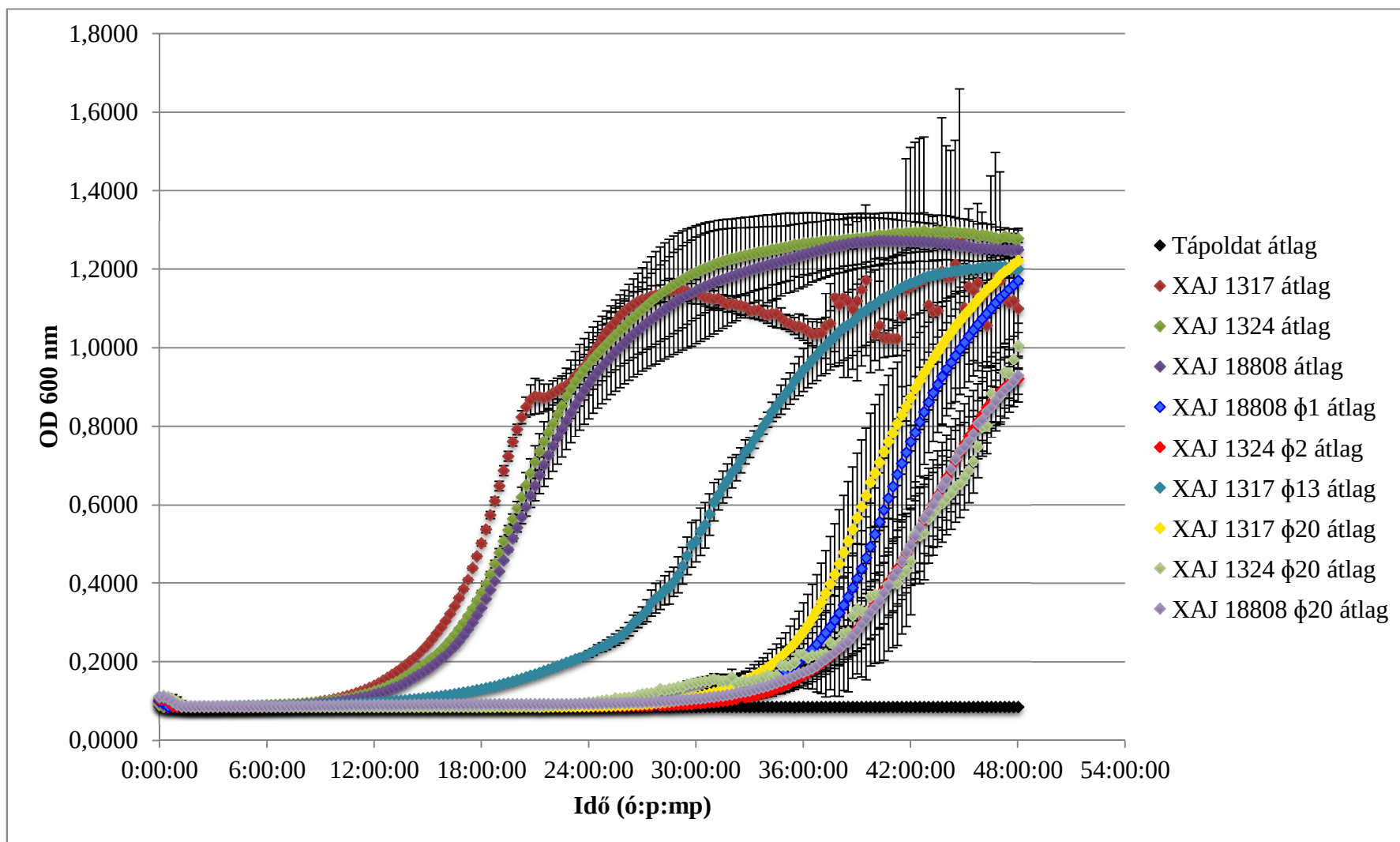
MOI a kísérlet kezdetekor = $1,08 \times 10^3 / 5,3 \times 10^3 = \underline{0,2}$

A mérési adatokból megszerkesztettem az egylépéses növekedési görbét (**11. ábra**). A görbe alapján látható, hogy a burst time kb. 40 perc, míg a burst size 15-nek adódott (figyelembe véve a 0,2 MOI értéket).

4.6. Laboratóriumi alkalmazási kísérlet

Ezen kísérlet során az vizsgáltam, hogy a fágok laboratóriumi körülmények között milyen mértékben képesek elnyújtani a baktériumok növekedésének lappangási szakaszát. A laboratóriumi alkalmazási kísérlet eredményei a **12. ábrán** láthatók. Az ábra adatai alapján megállapítható, hogy azokban a mintákban, amelyek csak baktériumot tartalmaztak, a baktériumok a 30. órára elérték a stacionáris fázist.

Azokban a mintákban, amelyek fágokat is tartalmaztak később indult be a baktériumok szaporodásának exponenciális fázisa. A legtöbb fág hatására csak a 33. órában indult meg a szaporodás. A ΦX_{ajH13} -as fág bizonyult a legkevésbé hatásosnak, mivel a növekedési görbe alapján csak körülbelül 6 órával hosszabbította meg a baktériumok szaporodásának lag fázisát. A görbék alapján általam izolált ΦX_{ajH20} fág igen hatásos.



12. ábra: A laboratóriumi alkalmazási kísérlet eredményei

5. Összefoglalás

A növényvédelemben nemrég kezdték el alkalmazni a bakteriofágterápiás növényvédő szereket, mint a bakteriális növénybetegségek hatásos ellenszerét. A világon eddig összesen két ilyen termék került piacra, közülük az egyik Magyarországon. A hazai fejlesztésű ERWIPHAGE, a rózsafélék tűzelhalásos megbetegedését okozó *Erwinia amylovora* baktérium hatásos ellenszere.

Az eddig elért eredményekből látszik, hogy a bakteriofágok alkalmazása eredményes a különböző bakteriális növénybetegségekkel szemben. Dolgozatomban a diófák baktériumos levél- és gyümölcsfoltosságával foglalkozom, melyet a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktérium okoz.

Sikeresen izoláltam olyan bakteriofágot, amely több *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* baktériumtörzs megfertőzésére képes. Az izolált fágot összehasonlítottam korábban izolált *Xanthomonas*-ellenes fágokkal és vizsgáltam, hogy milyen mértékben szorítják vissza a baktériumok szaporodását. Kiderült, hogy az általam izolált fág a leghatásosabbak között szerepel, valamint hogy széles gazdaspecifitással rendelkezik. Elmondható, hogy laboratóriumi körülmények között a *Xanthomonas*-ellenes fágok hatásosan alkalmazhatók a diófák baktériumos levél- és gyümölcsfoltossága ellen.

Vizsgálataim alapján a bakteriofágterápia hatékony megoldást nyújthat a diófák bakteriális betegsége elleni küzdelemben, mely betegség ellen jelenleg nem rendelkezünk hatásos ellenszerrel.

Összevetve az ERWIPHAGE alkalmazása során eddig nyert tapasztalatokkal a jelen munka során elért eredményeimet megállapítható, hogy a bakteriofágterápiának van létjogosultsága a bakteriális növényi kórokozók elleni harcban, azonban figyelembe kell venni azt is, hogy a szabadföldi alkalmazás során olyan hatásokkal, körülményekkel kell számolnunk, amelyek a laboratóriumi kísérleteket nem befolyásolták. Az UV-sugárzás, a kiszáradás veszélye, kimosódás vagy akár a baktériumok elérhetetlenné válása (pl. a növények belső szöveteibe való kerülésük által) olyan hatások, melyek nagymértékben csökkenteni tudják egy-egy fágterápiás növényvédő szer hatásosságát, és amelyek leküzdésére alkalmazásuk előtt, stratégiát kell kidolgozni, figyelembe véve az adott növény kultúra és kórokozó baktérium sajátosságait.

6. Hivatkozások, források

- Orosz Péter, *Könyv a dióról*, 2005
- Matthew K. Waldor, David I. Friedman, and Sankar L. Adhya, *Phages, Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*, American Society for Microbiology, 2005
- Doffkay Zsolt, Rákhely Gábor, *Fágterápia - Válasz az antibiotikumok hanyatlására*, Élet és tudomány, 2014/14
- Sandra Romero-Suarez, Brian Jordan, Jack A. Heinemann, *Isolation and characterization of bacteriophages infecting Xanthomonas arboricola pv. juglandis, the causal agent of walnut blight disease*, World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28:1917–1927
- A. Hajri, D. Meyer, F. Delort, J. Guillaume`s, C. Brin and C. Manceau, *Identification of a genetic lineage within Xanthomonas arboricola pv. juglandis as the causal agent of vertical oozing canker of Persian (English) walnut in France*, Plant Pathology, 2010, 59, 1014–10222010
- D. Burokiene and J. Pulawska, *Characterization of Xanthomonas arboricola pv. juglandis isolated from walnuts in lithuania*, Journal of Plant Pathology, 2012, 94, S1.23-S1.272012
- Edward N. Mulrean, Milton N. Schroth, *Bacterial blight on Persian walnuts*, California Agriculture, September-October, 1981
- M. Scortichini, U. Marchesi and P. Di Prospero, *Genetic Diversity of Xanthomonas arboricola pv. juglandis (synonyms: X. campestris pv. juglandis; X. juglandis pv. juglandis) Strains from Different Geographical Areas shown by Repetitive Polymerase Chain Reaction Genomic Fingerprinting*, Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 18 No 1 January/February 2007, Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Ciampino Aeroporto, Roma, Italy, Received September 14, 2000; accepted January 15, 2001
- Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, and J. Glenn Morris, Jr., *Bacteriophage Therapy, Antimicrob Agents Chemother.* Mar 2001, 45(3): 649–659.
- L.R. Verma and R.C. Sharma, *Diseases of Horticultural Crops –Fruits-*, 1999, ISBN 81-7387-095-0
- P. Narayanasamy, *Biological Management of Diseases of Crops*, Volume 1, Characteristics of Biological Control Agents, 2013

- Claude M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball, *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2005, ISBN 0-12-249951-4
- www.tuzelhalas.hu
- Dr. Hevesi Mária, Végh Anita, Dr. Tóth Magdolna: *A tűzelhalás múltja és jelene*, Agrofórum, 2009 január
- Parviz M. Sabour, Mansel W. Griffiths: *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*, ASM Press, 2010
- George N. Agrios, *Plant Pathology*, fifth edition, Academic Press, 2005
- <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=CELEX:32008R0889>
(2014.09.28.)

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségemre voltak abban, hogy ez a dolgozat megszülethessen. Témavezetőm, Dr. Kovács Tamás az Envitoinvest Zrt. vezérigazgató-helyettesének, Dömötör Dóra biológus kutatónak, valamint az Enviroinvest Zrt. valamennyi dolgozójának. Továbbá köszönöm Prof. Dr. Seress László, a Pécsi Tudományegyetem, Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium igazgatójának az elektronmikroszkópos képek készítését.