

**A Szeged környéki csípőszúnyog-együttes
mennyiségi és minőségi változásai az 1999. évben, és
szúnyoglárva-gyérítésre alkalmas *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti)
alapú biológiai készítmény előállítása, koncentrációja és toxicitás-vizsgálata**



Doktori értekezés

Készítette:

Szepesszentgyörgyi Ádám

Ökológia ágazatú biológus

Témavezetők:

Dr. Mécs Imre

Osztályvezető tudományos főmunkatárs, ny. egyetemi docens

Dr. Bárány Sándor

A kémia tudományok doktora, egyetemi tanár

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány
Biotechnológia Intézete

Szeged, 2004.

TARTALOMJEGYZÉK:

1	<u>BEVEZETÉS</u>	5
2	<u>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</u>	7
2.1	<u>A csípőszúnyogok (Diptera, Culicidae) jellemzése és ökológiája</u>	7
2.2	<u>A szúnyogártalom ellen használt kémiai védekezési módok</u>	8
2.3	<u>A biológiai védekezési módok, <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) inszekticid készítmények, hatásmechanizmusuk és toxicitásuk</u>	9
2.4	<u>A fermentlé koncentrációja vízdékony-polimerekkel</u>	13
3	<u>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	15
3.1	<u>A csípőszúnyogok (Insecta, Diptera, Culicidae) általános jellemzése</u>	15
3.1.1	<u>A Szeged környéki csípőszúnyog együttes</u>	15
3.1.1.1	<u>A gyűjtött csípőszúnyogok morfológiai és ökológiai jellemzése</u>	16
3.1.1.2	<u>A gyűjtött csípőszúnyog nemek imágói</u>	16
3.1.1.3	<u>A gyűjtött csípőszúnyogfajok imágói</u>	18
3.1.2	<u>A mintavételi helyek tenyésztővizei</u>	23
3.1.3	<u>A csípőszúnyogok gyűjtése (humán csapdázás)</u>	25
3.1.4	<u>A hetente végzett kémiai szúnyoggyérítés</u>	26
3.2	<u><i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> kutatások</u>	26
3.2.1	<u><i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (Bti)</u>	26
3.2.1.1	<u>Az alkalmazott inkubációs eljárás</u>	26
3.2.1.2	<u>Az élő sejtszám meghatározás hígítás és szélesztés módszerrel</u>	27
3.2.1.3	<u>A spóratartalom meghatározása</u>	28
3.2.2	<u>A natív fermentlé előállítás</u>	29
3.2.2.1	<u>Tápanyagok Bti-tenyésztéséhez</u>	29
	<u>3.2.2.1.1 Szintetikus tápanyagok</u>	
	<u>3.2.2.1.2 Egykomponensű tápanyagok</u>	
3.2.2.2	<u>A fermentáció további tanulmányozása</u>	34
	<u>3.2.2.2.1 A felhasznált aminosavak meghatározása</u>	
	<u>3.2.2.2.2 Az optimális tápanyag összetétel meghatározása</u>	34
	<u>3.2.2.2.3 A optimális tápanyag szaporodási dinamikája és a Bti-spóráképződése</u>	34
	<u>3.2.2.2.4 A optimális tápanyag pH-értékváltozása a fermentáció során</u>	37
3.2.3	<u>Az optimális tápanyag ülepítése vízdékony-polimerekkel</u>	35
3.2.3.1	<u>Alkalmazott vízdékony-polimerek töltésének meghatározása</u>	36
3.2.3.2	<u>A flokkuláció tanulmányozása</u>	36
	<u>3.2.3.2.1 Az optimális tápanyag flokkulációjának kinetikája</u>	
	<u>3.2.3.2.2 A méréshez szükséges Bti-szuszpenzió koncentrációjának meghatározása</u>	37
	<u>3.2.3.2.3 A leghatékonyabb kationos és anionos polimerek kiválasztása</u>	37
	<u>3.2.3.2.4 A Bti-szuszpenzió koncentrációjának hatása</u>	
	<u>3.2.3.2.5 A polimeroldat adagolási módjának hatása</u>	
	<u>3.2.3.2.6 A polimeroldat koncentrációjának hatása</u>	
3.2.3.3	<u>A tömény optimális tápanyag ülepítése</u>	38
3.2.4	<u>A hordozók jellemzése</u>	39
3.2.4.1	<u>A részecskék víztartalmának meghatározása</u>	40
3.2.4.2	<u>Hordozókhoz kötött Bti-készítmények előállítása</u>	40
3.2.4.3	<u>A hordozókhoz kötött készítményekből a Bti-spórák izolálása</u>	40
3.3	<u>Bti-toxicitás meghatározására használt teszt</u>	41
3.3.1	<u>Az <i>Aedes vexans</i> csípőszúnyog-lárvák toxicitásának meghatározása</u>	43
3.3.1.1	<u>Bti-szuszpenziók</u>	43
3.3.1.2	<u>Bti-flokkulátumok</u>	43
3.3.1.3	<u>Hordozókhoz kötött Bti-készítmények</u>	43
3.3.1.4	<u>Különböző fejlődési stádiumú lárvák</u>	43
3.3.2	<u>A <i>Daphnia magna</i> Straus egyedek toxicitásának meghatározása</u>	43

4	<u>EREDMÉNYEK</u>	45
4.1	<u>A csípőszúnyogok megjelenésének tanulmányozása</u>	45
4.1.1	<u>A Szeged környéki csípőszúnyog együttes tanulmányozása</u>	46
4.1.2	<u>Éves változás a csípőszúnyog együttes összetételében</u>	46
4.2	<u>Saját Bti-készítmények előállításának eredményei</u>	48
4.2.1	<u>Tápoldatok tanulmányozása</u>	49
4.2.1.1	<u>Szintetikus tápoldatok</u>	49
4.2.1.2	<u>Egykomponensű tápoldatok</u>	51
4.2.2	<u>Az optimális tápoldat kiválasztása és a fermentáció további tanulmányozása</u>	52
4.2.2.1	<u>A Bti-fermentációja és spóráképzése során felhasznált aminosavak</u>	53
4.2.2.2	<u>A fermentálé összecukortartalom meghatározása</u>	54
4.2.2.3	<u>A szaporodási dinamika és a spóráképződés a fermentáció során</u>	55
4.2.2.4	<u>A pH-értékváltozás a fermentáció során</u>	55
4.2.3	<u>Vízoldékony-polimerekkel történő flokkuláció tanulmányozása</u>	56
4.2.3.1	<u>Alkalmazott vízoldékony-polimerek töltésének meghatározása</u>	56
4.2.3.2	<u>A flokkuláció kinetikája</u>	57
4.2.3.3	<u>A Bti-szuszpenzió koncentrációjának a hatása</u>	59
4.2.3.4	<u>A polimeroldat adagolási módjának a hatása</u>	61
4.2.3.5	<u>A polimeroldat koncentrációjának hatása</u>	62
4.2.3.6	<u>Tömény Bti-szuszpenzió ülepítése</u>	63
4.2.4	<u>Hordozók tanulmányozása</u>	65
4.2.4.1	<u>Hordozók folyadék megkötő képessége</u>	65
4.2.4.2	<u>Hordozókhoz kötött készítményekből a Bti-spórák kioldódása</u>	66
4.3	<u>Bti-készítmények laboratóriumi biológiai toxicitás-tesztje</u>	67
4.3.1	<u>Szintetikus tápoldatokban fermentált spórák Bti-készítmények</u>	68
4.3.2	<u>Egykomponensű tápoldatokban fermentált spórák Bti-készítmények</u>	69
4.3.3	<u>Vízoldékony-polimerekkel ülepített spórák Bti-készítmények</u>	70
4.3.4	<u>Hordozókhoz kötött spórák Bti-készítmények</u>	71
4.3.5	<u>Különböző stádiumú Aedes vexans szúnyoglárva toxicitásának meghatározása</u>	72
4.3.6	<u>A Daphnia magna Straus egyedek toxicitásának meghatározása</u>	73
5	<u>ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉS</u>	75
5.1	<u>A szegedi csípőszúnyog együttes</u>	75
5.2	<u>A Bti-baktériumok fermentációja</u>	76
5.3	<u>A Bti-szuszpenzió koncentrációja</u>	79
5.4	<u>Hordozókhoz kötött Bti-készítmények</u>	83
5.5	<u>Bti-toxicitás meghatározására használt teszt</u>	83
6	<u>ÖSSZEFOGLALÁS</u>	87
7	<u>IRODALOMJEGYZÉK</u>	90
	<u>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</u>	97
8	<u>TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK:</u>	98
9	<u>SUMMARY</u>	99

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> de Berjak 1978
EC50 (EC100)	A tesztállatok 50% (100 %) –os mobilitásgátlását kiváltó anyag mennyisége
ÉK	égetett kovaföld frakció
ÉKT_{20Bti}-H	égetett kovaföld szemcsék pórusaiban adszorbeált T _{20Bti} -szuszpenzió
FH	folyami homok frakció
FHT_{20Bti}-H	folyami homok szemcsék felületére adszorbeált T _{20Bti} -szuszpenzió
G⁻ (Gram-negatív)	a baktériumsejt szerkezetének belső felszínét egyrétegű peptidoglikán alkotja. (A peptidoglikán szerkezete N-acetil-glukózamin és N-acetil-muraminsav alternáló molekulákból felépülő poliszacharid-láncokból és ezeket összekötő peptidláncokból áll.) A festék megkötő képessége jellegzetes (genciána ibolya és jóddal történő festés után a festék alkohollal kimosható a baktériumból).
G⁺ (Gram-pozitív)	a baktériumsejt szerkezetének belső felszínét alkotó peptidoglikán akár 40 rétegű is lehet. (A peptidoglikán szerkezete N-acetil-glukózamin és N-acetil-muraminsav alternáló molekulákból felépülő poliszacharid-láncokból és ezeket összekötő peptidláncokból áll.) A festék megkötő képessége sajátos (genciána ibolya és jóddal történő festés után a festék alkohollal nem mosható ki a baktériumból).
HL	húsleves tápoldat
Natív Bti-szuszpenzió	természetes, nem hígított és nem koncentrált Bti-szuszpenzió
HL-A	húsleves-agar lemez
Negatív kontroll-I	A biológiai teszt során kontrollként használt kezeletlen tenyésztővíz
Negatív kontroll-II	A biológiai teszt során kontrollként használt baktériummentes tápoldattal kezelt tenyésztővíz (Negatív kontroll-I + Negatív kontroll-II = Negatív kontroll)
Pepton	a fehérjék részleges lebontásakor keletkező peptidkeverék
Pozitív kontroll	A biológiai teszt során viszonyításként használt ismert toxicitású kereskedelmi készítmény VECTOBAC 12 AS
SZK	szárított kovaföld frakció
SZKT_{20Bti}-H	szárított kovaföld szemcsék pórusaiban adszorbeált T _{20Bti} -szuszpenzió

T₂₀	csontlé tápoldat, flokkulációs-, hordozóhoz kötött kísérletek tápoldata
T_{20Bti}	T ₂₀ -tápoldatban fermentált Bti-szuszenzió
Z	zeolit ásványi frakció
ZT_{20Bti}-H	zeolit ásványi szemcsék pórusaiban abszorbeált T _{20Bti} -szuszenzió

1 BEVEZETÉS

A fejlődéstörténetben a szúnyogok 93 millió évvel ezelőtt jelentek meg. Jelenleg több mint 2500 fajuk él a Földön, ebből Magyarországon 45 faj előfordulását ismerjük. A szúnyog az ember kellemetlen rovarellensége, mivel a nőstény egyedeknek vértáplálékra van szükségük peteképzésükhöz nélkülözhetetlen fehérjeszükségletük kielégítésére. Vannak azonban állatok, madarak, kételtűek és hüllők vérét kedvelő fajok. A szúnyogok az ember veszélyes kórokozóit terjesztők is lehetnek, mivel vérszívásuk mellett fontos betegségterjesztő vektor-rovarok is.

A csípőszúnyogok tömeges megjelenésének legfontosabb tényezői a +10°C feletti hőmérséklet és a lárvák közegeként nélkülözhetetlen, áramlásmentes víz. A szúnyogegyüttes összetétele a szúnyogszezon folyamán változik, a nedves időszak *Aedes* genus fajaihoz csatlakoznak a később megjelenő száraz időszakot jobban toleráló *Culex* genusú fajok. A csípőszúnyogok hirtelen fellépő, tömeges megjelenését szúnyogártalomnak nevezzük. Természetes ellenségeik nem képesek az egyedszámukat szabályozni, ezért szükséges mesterséges módszerekkel védekezni a szúnyogok ellen.

A védekezés egyik jelentős szakaszának tekinthetjük az inszekticidek megjelenését, melyek alkalmazása az 1940-es évek elején kezdődött el. Térhódításukkal kialakult a vegyi szúnyoggyérítés. Alkalmazásuk hátránya, hogy széles spektrumúak, ezért az ökológiai rendszereket is jelentős mértékben károsítják.

A csípőszúnyogok elleni védekezésnek ma már sokféle eredményes módszere létezik. A környezettudatosság előtérbe kerülésével kifejlődött az igény a környezetvédelem és természetvédelem részéről olyan új, eltérő szemléleten alapuló gyérítési technológiák iránt, amelyek a környezet (és természet) kímélésével a szúnyogegyüttest elviselhető szintre csökkentik. A biológiai készítményekkel (*Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* de Berjak 1978, *Bacillus sphaericus* Meyer és Neide 1904) történő szúnyoglárva gyérítés lehetőséget ad számunkra a hatékony

védekezés megtételére környezetünk veszélyeztetése nélkül, ezért a spórás Bti-alapú készítményekkel történő szúnyoglárvá-tenyészőhely permetezése a biológiai szúnyoggyérítés egyik fő irányvonala napjainkban. A legtöbb tenyészőhely növénytakaróval fedett, ezért a repülőgépről kijuttatott permet nem jut el a tenyészővíz felszínére. Ennek kiküszöbölésére a Bti-spórákat szükséges nagyobb tömegű hordozóhoz rögzíteni, melynek segítségével a spóra eljut a tenyészővízbe, s ott kifejti a csípőszúnyog lárvák ellen szelektíven ható, toxikus hatását.

Az ipari méretekben történő előállítás folyamán azonban kívánatos koncentrálni a spórás Bti-fermentátumot, hogy alkalmazás során ne kelljen sok vizet szállítani. A mikrobiológiai szuszpenziók ülepítésének egyik lehetséges módja a Bti-szuszpenzió vízoldékony-polimerekkel történő aggregálása (flokkuláltatása) és ülepítése.

A biológiai készítmény repülőgép segítségével permetezhető a legegyszerűbben a szúnyoglárvák tenyészővizébe. A legtöbb tenyészővíz azonban a kora tavaszi állapotokat kivéve növénytakaróval fedett (pl. ártéri erdők...), és emiatt a kiszórt permet nem jut el a vízfelületre. Egyik lehetséges megoldás az indifferens hordozóhoz rögzíteni a Bti-spórákat. A nagyobb tömegű hordozók segítségével a készítmény könnyebben eljut a tenyészővízbe, hogy ott kifejtsen lárvicid hatását.

Szükséges meghatározni az előállított készítmény szúnyoglárvák ellen kifejtett Bti-toxicitása mellett a vízminőség változását is, csak így lehet kijelenteni egy készítményről, hogy ártalmatlan az ökoszisztémára. A vízben oldott anyagok, szuszpenziók és diszperziók vízminőséget károsító hatásának a meghatározását nemzetközi szabványban leírt *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) egyedek mobilitásgátlásának a meghatározásával vizsgálják.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A csípőszúnyogok (Diptera, Culicidae) jellemzése és ökológiája

Magyarországon sok kutató tanulmányozta már a csípőszúnyogok előfordulását (*Mihályi és munkatársai, 1953; Mihályi, 1954; Zoltai, 1957; Tóth, 1977; Branka, 1984; Kertész, 1987*). Tanulmányozták mások is a Tisza-völgyben megfigyelhető szúnyogegyüttest, de nem hasonlították össze a zavartalan folyó menti árterek és a zavart életterű városok jellemző szúnyogegyüttesét. A korábbi felmérések a Tisza-völgyben domináns fajnak az *Aedes vexans* (41,17%), *Culex modestus* (26,68%) és *Aedes rossicus* (19,06%) fajokat találták (*Tóth, 1977; Branka, 1984*).

Vannak szúnyogfajok, melyek megjelenésükhöz csak megfelelő hőmérsékleti értéket és vízborítottságot igényelnek (pl. *Aedes vexans, Culex pipiens* stb.), más fajok (pl. *Aedes cantans, Aedes caspius, Aedes dorsalis, Aedes rossicus* stb.) megjelenéséhez speciális igények is szükségesek. Ezek a speciális igények (pl. sótűrés, fény-árnyék viszonyok, síkság-hegyvidék stb.) hozzájárulnak az eltérő faji összetétel kialakulásához (*Mihályi és Gulyás, 1963*).

Az *Aedes* genus egyedei a csapadékos időszakok után jelennek meg. A természetes szúnyogegyüttes egyedszámát befolyásolják a Tisza árhullámai és az aktuális csapadék. A kora tavaszi nedves évszakban hasonló szúnyogegyüttes alakul ki a Tisza folyó völgyében és a folyó menti városokban (*Tóth, 1977; Branka, 1984*). A Tisza-völgyben megmaradnak dominánsnak a néhány nemzedékes ártéri szúnyogfajok egyedei. A szárazabb évszakot (nyár) követően az évi néhány nemzedékes fajok szúnyogegyütteséhez csatlakoznak az évente sok nemzedékkel megjelenő fajok egyedei. A *Culex* genus egyedszáma kiemelkedően magas a csapadék nélküli időszakokban (*Zoltai, 1957; Kertész, 1987*). Ezek a fajok könnyebben megtalálják a házak, nyaralók, szeméttelpek környékén az egyedfejlődésükhöz nélkülözhetetlen vizet. A *Culex* genus képviselői a vízfelszínre rakják le összeragasztott petetutajaikat (*Zoltai és Szabó, 1968*).

A csípőszúnyogok és különösen az ártéri szúnyogok nem állandó egyedszámmal vannak jelen az ökoszisztémában. Kedvező feltételek esetén, rövid idő alatt tömeges elszaporodásukkal kell számolni. Ez úgy lehetséges, hogy a nőtények nagyon magas számú petét raknak le. Sokkal több utódot produkálnak, mint ami a fajfenntartáshoz szükséges (*r-stratégia*). Ezzel szemben a természetes ellenségeik (halak, madarak, denevérek...) egyedszáma állandó, kevés utódot hoznak létre (*k-stratégia*) (*Heinrich és Hergt, 1994*). Egy ragadozó különösen akkor

hatékony, ha fejlődési stratégiáját a zsákmány-élőlényéhez igazította (az élelciklusok szinkronizáltak), vagy magas pusztítási aránnyal rendelkezik. Kevés kivétellel a csípőszúnyogok ellenségei nem csupán a szúnyogokra vannak utalva, mint táplálékra (polifágok) (*Becker és Magin, 1986*).

2.2 A szúnyogártalom ellen használt kémiai védekezési módok

A szúnyoglárvák gyérítésére kezdetben petróleumot és párizsi-zöldet (rézacetát-metaarzenit) alkalmaztak, majd a II. Világháború után forradalmi változást hozott az idegméregként ható inszekticidek felfedezése és alkalmazása (*Bánsági és munkatársai, 1962*). Az imágók elleni vegyszeres védekezéshez növényi eredetű mérgeket használtak, majd a vegyipar robbanásszerű fejlődése az 1960-as évektől a rovarölő szerek óriási és folyamatosan bővülő választékát kínálta. Az imágók gyérítésére DDT- és HCH-tartalmú szereket (*Zoltai, 1957*), majd foszforsavésztert és piretroid tartalmú rovarmérgeket használtak (*Shephard, 1951*). Ezek a szerek jó eredménnyel és azonnal hatottak, de drágák voltak. Később kiderült, hogy nem bomlanak le, hanem felhalmozódnak az élőlényekben. A későbbiekben idegméregként ható inszekticideket alkalmaztak (*Bánsági és munkatársai, 1962*).

Napjainkban az ökoszisztéma megóvása érdekében a kezeléseket fényre bomló (fotolabil) vegyületekkel (K-OTHRIN 10 ULV, MOSQUITOX 1 ULV) végzik. Ezek hatóanyaga a deltametrin, ami a szintetikus piretroid hatóanyagcsoportba tartozik.

A csak csípéseikkel kellemetlenkedő szúnyogok ellen a szabadtéri, a maláriaszúnyogok ellen a zárt térben történő kezelés a célravezető. Az imágók kémiai módszerrel történő kezelésénél nagyon körültekintően kell eljárni, ugyanis ezek a vegyszerek sok más vízi és szárazföldi állatfajra is veszélyt jelentenek. Lehetőleg mindig a tömeges kifejlődés miatt bekövetkező szúnyogcsapás megelőzésre kell törekednünk, mert a szúnyoglárvák elpusztítása eredményesebb és egyszerűbb, mint a már széttrajzott szúnyogtömegek gyérítése (*Mihályi és Gulyás, 1963*).

2.3 **A biológiai védekezési módok, *Bacillus thuringiensis* (Bt) inszekticid készítmények, hatásmechanizmusuk és toxicitásuk**

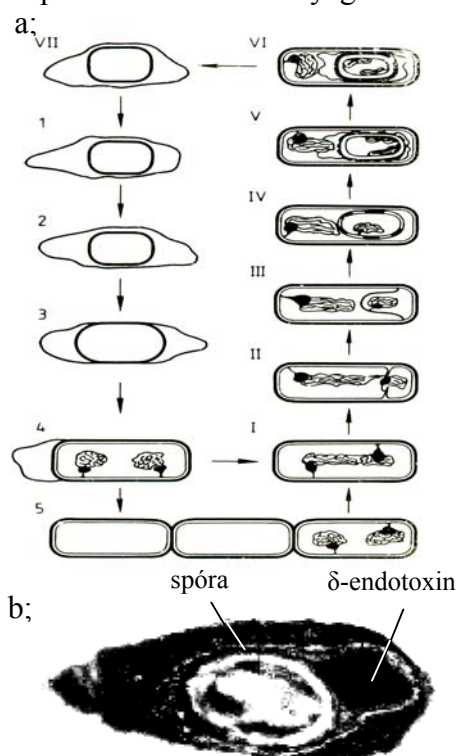
1976-ban Yoel Margalit egy elpusztult csípőszúnyog lárvából izolálta a *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* baktériumot Izraelben, s ezzel kezdetét vette a biológiai szúnyoggyérítés kutatása (Margalit és Dean, 1985).

A Bacillaceae családon belül a *Bacillus* nembe tartoznak az aerob, spórás és pálcá alakú *Bacillus thuringiensis* baktériumok. Többségük kozmopolita, és kemoorganotróf talajlakó. Hőtüres szempontjából mezofilek (opt. hőm: 28-45 °C), az alacsonyabb hőmérséklet kedvez a spóráképződésnek. Tenyésztésükhöz szükséges a fizikai és kémiai paraméterek optimálishoz közeli értéke (Szmirnov és munkatársai, 1986; Chilcott és Ellar, 1988).

A *Bacillus thuringiensis* baktérium változatainak számottevő a gyakorlati jelentősége. A biológiai szúnyoggyérítésnél illetve a biológiai növényvédelemben alkalmazzák ezeket a baktériumokat (Ward és Ellar, 1988). A növényvédelemben sokhelyütt csak a baktériumspóra toxinját kódoló génszakaszokat juttatják génszöveti úton a növények genomjába (Klier és Rapoport, 1987; Thanabalu és munkatársai, 1992; Pramatha, 2000). A biológiai eredetű inszekticidek nagyon szelektívek. A *Bacillus thuringiensis* egy szűk csoportba tartozik (Bacillus cereus csoport) tartozik a közeli rokonságban levő *Bacillus* fajok között. Ebbe a kisebb csoportba tartozik a *Bacillus cereus* Frankland és Frankland 1887 faja, amely az ételmérgezések egyik okozója lehet; valamint a *Bacillus anthracis* Cohn 1872 faj is, amely a kórokozója a lépfenének, egyéb veszélyes állati betegségeknek és rosszindulatú keléseknek. Ez a három baktériumfaj olyan mértékben hasonlít egymásra, hogy egy faj változatainak feltételezik őket (Bennett és Harmon, 1990; Drobniewski, 1994). Ha a *Bacillus cereus* fajt együtt tenyésztik *Bacillus thuringiensis* baktériumokkal, a Bt genetikai anyagának egy szakasza, vagy egésze transzformálódik a *B. cereus* sejtekbe. Így a *B. cereus* fogja előállítani a toxikus kristályszerű fehérje komplexet (Drobniewski, 1994). A genetikai anyag transzformációja a *B. anthracis* és a Bt baktériumok között is megtörtént már (Martin és Baum, 1994). Az ismertett ok miatt előfordulhat annak a veszélye, hogy a nem megfelelően ellenőrzött üzemi méretű tenyészetben szándékunktól eltérően nem a csípőszúnyog lárvák ellen, hanem az emberre és állatra egyaránt veszélyes biológiai fegyvert állítunk elő és alkalmazunk széles körben.

A *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 baktériumot először 1901-ben izolálta Japánban Ischiwata egy fertőzött selyemhernyóból, majd 1911-ben ismét kitenyésztették fertőzött datolyamolyból (*Cadra figulilella*) és a faj a *Bacillus*

thuringiensis nevet kapta. (Lambert és Peferoen, 1992). Azóta a *Bacillus thuringiensis* fajnak legalább 34 alfaját (szerotípus, változat) és több mint 800 törzsét ismerjük (de Barjac és Frachon, 1990). 1958-ig nem kerültek kereskedelmi forgalomba a *Bacillus thuringiensis* alapú termékek (Jenkins, 1992). 1989-re a biopesticid piac 90-95%-os részét tették ki ezek a termékek (Feitelson és munkatársai, 1992). Az Egyesült Államokban a *Bacillus thuringiensis* alapú termékek öt fajt foglaltak magukba. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* de Berjak és Lemille 1964 és *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*, amelyeket molylepkék és lepkék (Lepidoptera, Crambidae) hernyói ellen használtak; *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* de Berjak 1978, amely csípőszúnyog (Culicinae) és púposzúnyog (Simuliidae) lárváit pusztította el; *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, amely a viaszmosoly hernyóit fertőzte meg; *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, amely széles spektrumú rovarölőszerek hatóanyaga volt, de többnyire a burgonyabogár lárvák (Coleoptera, Chrysomelidae) ellen használták (Farm Chemicals Handbook, 1992; Entwistle és munkatársai, 1993). Leggyakoribb kereskedelmi márkanevek a Dipel, Foray, Thuricide (mind *Bt* *kurstaki* hatóanyag-tartalommal), Vectobac, Mosquito Attack (mind *Bt* *israelensis* hatóanyag-tartalommal), és M-Trak (mind *Bt* ssp. *tenebrionis* hatóanyag-tartalommal) (Farm Chemicals Handbook, 1992).



Kedvezőtlen körülmények között a *Bacillus thuringiensis* vegetatív sejtek spórákká alakulnak. A spóra alak a baktériumok életciklusának egyfajta szunnyadó állapota, amely segítségével a baktérium szervezete vár a kedvezőbb életkörülményekre. A *Bacillus thuringiensis* különbözik a többi baktériumsejttől, mert a spóráképződés 5.stádiumában (1. ábra) az exospóriumon belül képződik egy fehérjetermészetű, kristályszerű komplex (δ -endotoxin). Ez a parasporális részecske a *Bacillus thuringiensis* toxikus alkotóeleme (Szmirnov és munkatársai, 1986).

1. **ábra:** (a) A spórázó sejt fejlődési ciklusának sémája (Szmirnov és munkatársai, 1986) (I.-VI. = a spóráképződés szakaszai; VII. = a nyugalomba jutott spóra kriptobiotikus állapotban; 1.-5. = a spórából kialakuló osztódó sejt fejlődési szakaszai) (b) elektromikroszkópos felvétel a *Bti*-baktériumsejtben képződő spóráról és a mellette elhelyezkedő δ -endotoxinról (Gill és munkatársai, 1992)

A *Bacillus thuringiensis* fehérjetermészetű komplexek entomopatogén proteázok elegyei (méretük: 4,7-11,8 nm, molekula tömegük: 120-140 000 Dalton). A δ -endotoxin fehérjetermészetű molekulák 18 féle aminosavat tartalmaznak szerotípustól függetlenül. Az aminosavaknak többsége glutamin és aszparaginsav (Szmirnov és munkatársai, 1986).

A sporuláció folyamatában fokozódik a Ca^{2+} -ionok felvétele, melyek a spóra falát alkotó dihidropikolinsavval komplexet képeznek, s így többek között a hőrezisztenciáért felelnek. Szintetikus tápoldatban a sejtosztódás lassúbb, az aerob baktériumok kevesebb spórát képeznek (vagy csak megfelelő komponensek hozzáadásával). A glikolízis szubsztrátjainak tápoldatba vitele gátolja a spóráképződést, míg a Ca^{2+} ; Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} -ionok jelenléte serkenti a sporulációt. A fémkoncentráció növekedése gátolja a baktériumok szaporodását. A spóráképződés gyorsabb az adszorbeált sejtekben, mint a szabad sejtes tápoldatban (Szmirnov és munkatársai, 1986).

A *Bacillus thuringiensis* spórájának elfogyasztása után a protein-kristály feloldódik a rovarlárvák alkalikus bélcsatornájában (Zaritsky és munkatársai, 1986). Ezután a lárva emésztő enzimei szétbontják a kristály szerkezetét és aktiválják a *Bacillus thuringiensis*-nek az inszekticid komponensét, amit δ -endotoxinnak hívnak. A középbél hámsejtjeinek felszínén speciális glikoproteinek találhatók, mint receptorok, melyekhez egészen célzottan kapcsolódnak az egyes fehérjekomponensek. A δ -endotoxin hatására a középbél hámsejtjeinek membránján pórusok nyílnak, melyeken keresztül kiáramlik a citoplazma és felborul a bélhámsejtek ionháztartása. Az ionkoncentráció eltolódása következtében fokozottan víz áramlik be a bélsejtek citoplazmájába (ozmózis). A bélsejtek megdagadnak és szétduzzannak. Erre a béltartalom a bélhámsejtek között keletkező lyukakon át betör a szúnyoglárva testüregébe, és elkeveredik a testfolyadékkal, ezt követően a szúnyoglárva a felvett protoxin mennyiségétől függően néhány perc, vagy óra alatt elpusztulnak. A rovarlárva táplálkozása hamarosan leáll és az éhezés a lárva pusztulásához vezet. A spórák kicsírázása a bélhámsejtek tönkremenetele után történik (Klowden és munkatársai, 1983; Gill és munkatársai, 1992). Az alkalikus bélmiliő ($\text{pH} \approx 10$) aktiválja a δ -endotoxint (Gill és munkatársai, 1992; Entwistle és munkatársai, 1993). A lárvák életkora fontos faktora még a toxicitásnak, a fiatalabb stádiumú lárvák érzékenyebbek, mint az idősebbek (Federici, 1995).

A mikrobiológiai toxicitás tanulmányozásánál nézik a patogenitást (betegség okozásának lehetősége) és az infektivitást (szervezetben belüli szaporodás lehetősége). A *Bacillus thuringiensis* felfedezése óta vizsgálják a lehetséges veszélyeit a biológiai szervezetekre a hagyományos peszticidekkel szemben (Ware, 1983). A több mint 800 *Bacillus thuringiensis* faj változat bizonyíthatja a különböző toxicitást a rovarokkal, rágcsálókkal és az emberiséggel szemben. Ez a tény bonyolulttá tesz minden objektivitást a *Bacillus thuringiensis* toxikusságáról. Az alábbiakban a *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* de Berjak 1978 baktériumra vonatkozó toxicitás tanulmányokat tekintjük át (Shakoori és munkatársai, 1999).

Korábbi tanulmányok (Siegel és munkatársai, 1988) kimutatták, hogy a Bti-baktérium az adagolás helyétől függően toxikus az emlősökre is. De csak abban az esetben halálos rájuk, ha a Bti-baktériumot közvetlen az agyba, vagy a hasüregbe juttatják. Patkányokon végzett kísérletek esetében 79%-os a mortalitást mértek, mikor a Bti-baktériumokat közvetlen az agyba juttatták. Egyéb állatoknál is általános rosszkedvet, levertséget figyeltek meg. Például az egerekbe injektált Bti-szuszpenzió a levertség elterjedését okozta (Siegel és Shaddock, 1990). A Bti-baktérium emlősökön izgatja a szemet és a bőrt. Inaktivált és virulens Bti-spórákat fecskendezve az egerek bőre alá, a kezelést követően tályog keletkezett (Siegel és munkatársai, 1988). Külső kezelésnél a nyulak szemét is irritálta a Bti-baktérium szuszpenzió (Samples és Buettner, 1983; Siegel és Shaddock, 1990). A Bti-spórából izolált δ -endotoxint intravénásan oltva egerekbe, a baktérium gyors paralyisist okozott, majd 12 órán belül elpusztultak a megfigyelt egyedek. Ugyanilyen dózist injektálva szoptatás alatt álló egerek bőre alá, a halál 2-3 órán belül beállt. A δ -endotoxin károsította még a patkányokat, egereket, birkákat, lovakat és a vörös véresejteket is (Thomas és Ellar, 1983; Bennett és Harmon, 1990). Kevés dokumentált megfigyelés történt a Bti-baktérium emberekre gyakorolt hatásáról. Ide tartozik, mikor egy kutató véletlenül a saját bőre alá injektált Bti-baktérium és egy másik baktérium faj keverékét. Ezt követően toxikus reakciótól és nyirokrendszeri zavaroktól szenvedett (Ware, 1983). Ezt a két baktériumot együttesen fecskendezve rágcsálókba, azok elpusztultak, mialatt a baktérium fajokat külön-külön alkalmazva csak gyenge gyulladást okoztak (Siegel és Shaddock, 1990).

A biológiai szennygyógyítási technológia egy lényeges kémiai vonatkozásával is foglalkoztam. Az egyszerűbb és gazdaságosabb alkalmazhatóság érdekében a szennygyógyításnál alkalmazott spórás Bti-szuszpenzió koncentrációja volt a célom. A sejt-szuszpenziók koncentrációja mind vegyszer nélküli (szeperáció, szűrés, ultra-és mikroszűrés), mind vegyszerek alkalmazásával párosult (koaguláció, flokkuláció, flotálás, kromatográfia) módszereket használnak (*Eriksson és Hardin, 1987; Arnold és munkatársai, 1992; Fler és Scheutjens, 1993*). Az előbbi módszerek előnye az, hogy biztosítják a natív oldat, ill. sejtanyag tisztaságát. Ugyanakkor e módszerek hatékonysága rohamosan csökken a kolloidrészecskék/sejtek méreteinek csökkenésével, mert nehézségek merülnek fel a szűrésnél, centrifugálásnál, stb. (*Fler és munkatársai, 1993*). A komponenseket alkalmazó eljárások előnye a nagymértékű sűrítés, az aránylag kis költség és az egyszerű technológiai megvalósítás (*Bárány és Teszlenko, 1990*). Ezek az előnyök természetesen csak hatékony vegyszerekkel valósíthatók meg. A mikroorganizmus-szuszpenzió sűrítésének sok problémája megoldható nagy molekulatömegű anionos és kationos polielektrolitok alkalmazásával, figyelembe véve ezen anyagok jelentős flokkuláló (aggregáló) hatását, felhasználásuk gazdaságosságát és a biokolloidokra kifejtett nem-toxikus hatását. A flokkuláció alkalmazható sejtsuszpenziók sűrítésére önálló módszerként, vagy pedig a hagyományos eljárások - szűrés, flotáció, centrifugálás stb. - hatékonyságának növelésére (*Eriksson és Hardin, 1987; Bárány és Teszlenko, 1990; 1992*).

A flokkuláció időbeli lefolyását és hatékonyságát számos tényező befolyásolja, úgymint a polimer szerkezete, oldatban felvett méretei, a makromolekula-szegmensek és a részecskefelület közötti kötési energia, az alkalmazott polimeroldat töménysége és a diszperzióval való elegyítés módja, a polimer molekulatömege, töltésselőjele és töltéssűrűsége (polielektrolitok esetében), az oldat elektrolit-tartalma, a szilárd fázis koncentrációja stb. A polimerekkel való flokkuláltatás még szerves (életlen) diszperziók esetében is egy igen bonyolult, sok paramétertől függő folyamat (*Shaw, 1986; Bárány, 2000*). A mikroorganizmus szuszpenziók flokkuláltatásának általános törvényszerűségei és mechanizmusa nagyjából megfelelnek a szerves diszperziókra érvényes törvényszerűséseknek (*Bárány és Teszlenko, 1990; Fler és Scheutjens, 1993*). Ugyanakkor a mikroorganizmus szuszpenziók flokkuláltatása egy sokkal bonyolultabb folyamat, mint a szerves részecskékből álló szuszpenzióké. A szerves szuszpenziókkal ellentétben a sejt - flokkuláns kölcsönhatásokat nagymértékben befolyásolják a

sejtek életműködése során keletkező sejtmetabolizmus termékek, a környező oldat komponensei, valamint a sejtfal állandóan változó felépítése, architektúrája (*Eriksson és Hardin, 1987; Bárány, 1988; Bárány és munkatársai, 1991*). Irodalmi adatok szerint a mikroorganizmusok leghatásosabb flokkuláló szerei a kationos polielektrolitok (*Eriksson és Hardin, 1987; Bárány, 1988; Bárány és Teszlenko, 1990; Bárány és Teszlenko, 1992*), ezért a saját kutatásomban is ezeknek szenteltem a legnagyobb figyelmet.

Munkám során célul a következőket tűztem ki:

- a szúnyogártalom mértékének és térbeliségének felmérését Szegeden;
- egy minden szempontból optimális spórás Bti-készítmény előállítását, a Bti-mikrobák felszaporítására, spóráztatására és toxintermelésére is megfelelő tápoldat kidolgozását;
- az aránylag „híg” fermentátumból a Bti-spórák koncentrálnálását;
- hordozóhoz kötött Bti-spóra tartalmú készítmény előállítását és
- a tápoldatban tenyésztett Bti-spórák, valamint a belőlük előállított Bti-készítmények toxicitásának meghatározását biológiai teszttel.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A csípőszúnyogok (Insecta, Diptera, Culicidae) általános jellemzése

A hím és a nőtény szúnyog egyaránt növények nedveit szívogatja saját létszükségletük fedezésére, azonban a nőtény egyedeknek vértáplálékra van szükségük petéik fehérjeszükségleteinek kielégítésére (*Mihályi és Gulyás, 1963; Becker és Magin, 1986*).

A szúnyogok egyedfejlődése során a peteállapotot négy lárvállapot, majd pár napos bábállapot követi. Ezek a folyamatok a vízben zajlanak le és hőmérséklettől függően 2-4 hétig tartanak. A szúnyoglárva a szerves anyagokkal terhelt, áramlásmentes és sekély vizekben élnek, mivel a levegőt a felszínről szerzik (kivéve: *Taeniorhynchus richiardii* faj), ezért a levegővételhez nyugodt vízfelszín szükséges. A teljes átalakulást követően a bábbőrből előbújik a repülő életmódot folytató imágó.

3.1.1 A Szeged környéki csípőszúnyog együttes

A helyi ökológiai tényezők hatására eltérő szúnyogegyüttes jellemző a hegyvidékek, alföldek, rétek, erdők, árterek...stb. térségeire. A szúnyogok egyedfejlődéséhez a legfontosabb tényezők az áramlásmentes sekély víz és a hőmérséklet. Vannak nemek, melyek fejlődésükhöz egyéb körülményeket is igényelnek (páratartalom, tenyészővíz sótartalma, tenyészővíz szerves anyag tartalma, tenyészővíz pH-értéke, megvilágítás, optimális fény-árnyék viszonyok...stb.). Megfigyeltem Szegeden a csípőszúnyogok egyedfejlődéséhez nélkülözhetetlen tényezők szerepét (hőmérséklet, víz) a szúnyogártalom kialakulásában (*Mihályi és Gulyás, 1963; Becker és Magin, 1986*). A napi hőmérséklet és csapadék adatokat az Országos Meteorológiai Szolgálattól (OMSZ), a Tisza vízállás adatait az Alsó-Tisza Vidéki Vízügyi Igazgatóságtól (ATIVIZIG) kaptam.

Tanulmányoztam az 1999. évi szegedi szúnyogártalom kialakulásának és folyamatának körülményeit. Szeged szúnyogegyüttesének az összetételét és változását kísértem figyelemmel. A számlálást követő napon kémiai szúnyoggyérítő kezelés történt, mely biztosította a szúnyogegyüttes adott időszakra jellemző összetételét és néhány napra elviselhetővé tette a mennyiségüket.

3.1.1.1 A gyűjtött csípőszúnyogok morfológiai és ökológiai jellemzése

A morfológiai bélyegek alapján történő határozásnál egyes határozó bélyegek egyértelműen jellemzőek az adott fajra, de mivel az imágók faj specifikus bélyegei az életük során többnyire lekopnak, ezért több ismertető jegy azonosítása szükséges az azonosításhoz. A határozás során elsősorban a morfológiai bélyegek voltak a döntőek, de az adott faj előfordulásának ökológiai valószínűségét is ellenőriztem (Mihályi és Gulyás, 1963; Becker és Magin, 1986).

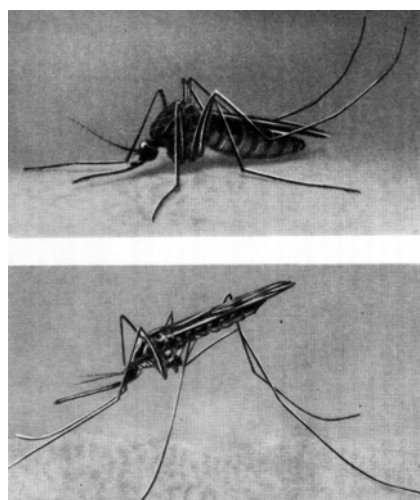
3.1.1.2 A gyűjtött csípőszúnyog nemek imágói (Mihályi és Gulyás, 1963; Becker és Magin, 1986)



2. ábra: *Aedes vexans* Meig. nőstény és hímjének feje (Mihályi és Gulyás, 1963)



3. ábra: *Culex pipiens* L. nőstény és hímjének feje (Mihályi és Gulyás, 1963)



4. ábra: A *Culex pipiens* L. (fent) és az *Anopheles maculipennis* Meig. (lent) jellegzetes testtartásáról könnyen megkülönböztethető (Mihályi és Gulyás, 1963)

Aedes genus:

Potrohuk vége a két lekerekített faroktoldalék miatt kihegyezettnek látszik. Ha nem kihegyezett, akkor színe fekete, a potrohszelvények oldalán hófehér, háromszögletű foltok vannak. Szárnypikkelyei keskeny, lándzsa alakúak (2. ábra).

Ősszel a nőstények egyesével rakják le petéiket az ártér talajára, vagy fűszálakra. A peték tavasszal az áradás visszavonulása után maradt pocsolyákban alakulnak lárvákká. Az imágó akár 18 km-t is repül egy nap. A felnőtt egyedek szürkületkor és hajnalban aktívak.

Culex genus:

Lábuk végén a karmok alatt erős nagyítással pihetoll-szerű tapadókorongok láthatók. Potrohuk vége lekerekített (3. ábra). Éjjel is aktív és az épületekbe is bemegy. A megtermékenyített nőstény imágó telet át és nyáron a nőstények petéiket a vízfelszínre rakják le petetutaj formában, amely kb.300 petét tartalmaz (5x2-3 mm). 1-500 méterre távolodik el a tenyészővizétől. A nyár folyamán több generáció fejlődik ki, mint a természetes vízjárástól függő szaporodású fajok esetében.

Theobaldia genus:

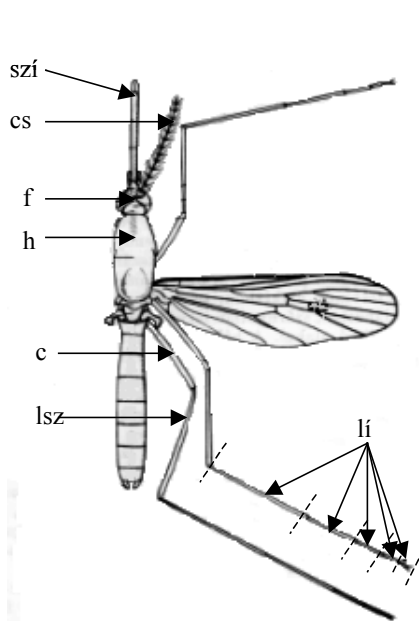
Nagy testméret jellemző erre a nemre. A nemet torának elülső légzőnyílása előtti kis háromszögben levő spiraculáris sörték jellemzik.

A megtermékenyített nőstény imágó telet át és nyáron a nőstények petéiket a vízfelszínre rakják le petetutaj formában. Az imágók ritkán mennek be a lakásokba és télen is csípésaktívak.

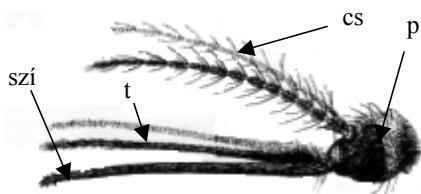
Anopheles genus:

Lábaik feltűnően hosszúak és vékonyak. Ültükben a szívóka, fej, tor és potroh nagyjában egy vonalba esik. A falon ülve a szúnyogok potrohukat a faltól hegyesszögben eltartják (4. ábra). A megtermékenyített nőstény imágó telet át. Nyáron a nőstények petéiket a vízfelszínre rakják le hálózatos formában. A nőstény imágó sötétedéskor szív a leggyakrabban vért. Ezek a szúnyogok jobban kedvelik a melegvérű állatok (tehén, ló, sertés) vérének. A nőstény imágók előszeretettel tartózkodnak istállók falain. A lárvák nincsenek a nagyon szennyezett vízben. Az imágó a 1-4 km-t repül egy nap.

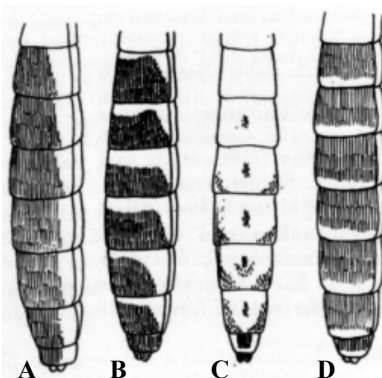
3.1.1.3 A gyűjtött csípőszúnyogfajok imágói (gyűjtött egyedek dominancia sorrendjében, Mihályi és Gulyás, 1963 alapján)



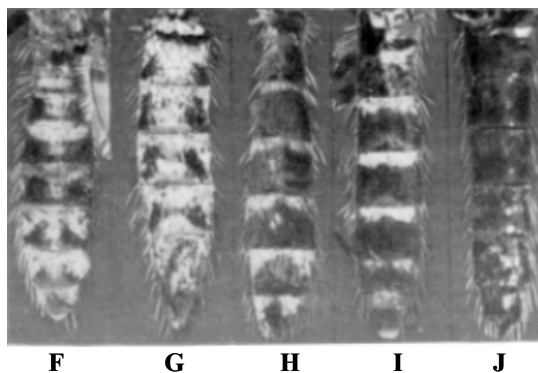
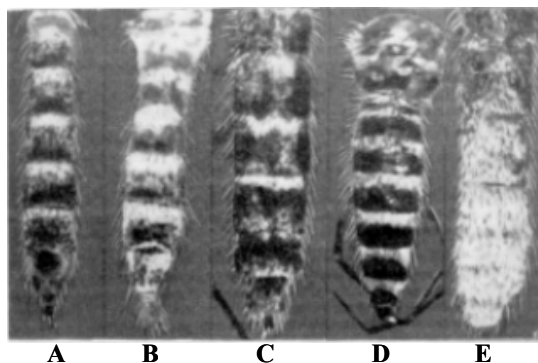
5. ábra: A csípőszúnyog testének részei (szí=szívóka, cs=csáp, f=fejtető, h=hát, c=comb, lsz=lábszár, lí= lábfejek) (Mihályi és Gulyás, 1963)



6. ábra: A csípőszúnyog feje (cs=csáp, p=pofo, szí=szívóka, t=tapogató) (Mihályi és Gulyás, 1963)



7. ábra: A gyűjtött Culex-fajok potroha (A: *C. modestus* Fic.; B: *C. pipiens molestus* Forsk. Felülről és C: alulról; D: *C. hortensis* Fic.) (Mihályi és Gulyás, 1963)



8. ábra: A gyűjtött Aedes-fajok potroha (A: *A. annulipes* Meig.; B: *A. excrucians* Walk.; C: *A. cantans* Meig.; D: *A. cataphylla* Dyar; E: *A. flavescens* Müll.; F: *A. caspius* Pall.; G: *A. dorsalis* Meig.; H: *A. sticticus* Meig.; I: *A. vexans* Meig.; J: *A. cinereus* Meig.) (Mihályi és Gulyás, 1963)

***Culex pipiens molestus* Forskal, 1775**

Barna hátán a pikkelyek csillogó aranybarnák. Szárnyereinek pikkelyei sötétek, az r_{2+3} ér nyele csak 1/6 része a villa hosszának. Lábai barnák, térdein kevésbé feltűnő fehér térdfoltok vannak. Hátsó lábának 1. lábfejeze hosszabb, mint a lábszár (5. ábra). Potrohszelvényei tövén széles piszkosfehér keresztcsíkok vannak (4. ábra, 6. ábra).

Május végétől – októberig található meg a szabadban. Télen is előfordul kis számban lakásokban, pincékben stb., mivel a megtermékenyített nőtény telet át. Más fajokkal szemben az embervért kedveli. Éjjel is aktív. Petéit bárhová lerakja, amikor megfelelő a víz hőmérséklete és oxigéntartalma (esővízes hordók, pocsolyák, autógumik, árkok, nádasok... stb.). Nemzedékeinek száma nem függ a természetes vízjárástól.

***Aedes vexans* Meigen, 1830**

Hátát barna pikkelyek borítják. A lábfejek feketék, nagyon keskeny pontszerű fehér tőgyűrűkkel. Szárnyereit fekete pikkelyek borítják. Fekete potrohának fehér keresztcsíkjai közepén elkeskenyednek, szélükön megszakadnak, nem kapcsolódnak hozzá az oldalfoltokhoz (4. ábra, 7. ábra).

A folyóink tavaszi áradását követően jelennek meg. Áprilistól október végéig minden élőhelyen megtalálható. (erdő, rét, napos víz, nádas... stb.) Kozmopolita faj. Legnagyobb jelentőségű ártéri szúnyogfaj. Vízből való táplálékától függően sok nemzedéke van évente.

***Culex modestus* Ficalbi, 1890**

Háta sötétbarna, ugyanilyen színű apró pikkelyek borítják. Szárnyereinek pikkelyei sötétbarnák. Lábai sötétek, hátsó lábának 1. lábfejeze rövidebb, mint a lábszár. Potroha felül egyszínű barna (4. ábra, 6. ábra).

Júniustól októberig repül szabadban az imágó. A napos vizeket választja tenyészőhelynek. Sok nemzedéke van egy szezonban.

***Aedes dorsalis* Meigen, 1830**

Szárnyerein sok az elszórt világos pikkely, az r_{2+3} éren csaknem kizárólag fehér pikkelyek vannak. A lábtőizek tövén is, csúcsán is vannak világos gyűrűk. Fekete potrohán fehér Potrohszelvényeinek tövi és csúcsi részén is vannak harántcsíkok, valamint található rajta fehér hosszanti csík is. Ez a harántcsíkoknál erőteljesen kiszélesedik, egyes példányoknál az utolsó három potrohszelvény csaknem teljesen fehér (4. ábra, 7. ábra).

Április elejétől szeptemberig repül. Az alföldi szikéseket, szikes legelőket kedveli. Lárvája sókedvelő. Lárvája nyílt, sekély napsütötte vizekben, időszakos pocsolyákban fejlődik. Évente 2-3 nemzedéke repül.

***Aëdes sticticus* Meigen, 1838**

A nőtény fejét fehér pikkelyek borítják. Hátát hosszanti csíkok jellemzik. Hátsó lábszárának elülső felszínét világosan csillogó pikkelyek borítják. Szárnyereit fedő pikkelyei sötétek. Potrohszelvényei feketék, a fehér keresztsáv helyett csak háromszögletű oldalfoltok szegélyezik. (4. ábra, 5. ábra, 7. ábra).

Áprilistól szeptemberig fordul elő az árhullámokat követően. Erdei szúnyogfaj, az árnyékos vizeket kedveli (ártéri erdők). Nemzedékeinek száma (2-5) függ az árhullámok számától és a természetes vízjárástól, mivel petéit fűszálakra, földre rakja le.

***Aëdes annulipes* Meigen, 1830**

A nőtény fejét fehér pikkelyek borítják. Hátát hosszanti csíkok jellemzik. Hátsó lábszárának elülső felszínét világosan csillogó pikkelyek borítják. Szárnyereit fedő pikkelyei sötétek, melyeket keskeny sávok szegélyeznek. Potrohszelvényein szórt világos pikkelyek találhatók, hátul nincs keresztsáv (4. ábra, 5. ábra, 7. ábra).

Április végétől július végéig repül. Fájdalmas csípése jellemző. Erdei szúnyogfaj (ártéri erdők), de a napos vizeket kedveli a lárvája. Az imago az erdőszeleket, ligeteket preferálja. Egyetlen nemzedéke fejlődik ki évente.

***Theobaldia annulata* Schrank, 1776**

Háta sötétbarna, rajta ugyanolyan színű szőrpikkelyek, közepén két világos foltot alkotva. Szárnyfoltjai erőteljesek. Barna combjain a térd előtt fehér gyűrű van, ugyanilyen gyűrű látható az 1. lábfejek közepén. Az 1-4. lábfejek tövét is világos gyűrű díszíti. Potrohszelvényei tövén fehér harántgyűrű, a 2. szelvény közepén hosszanti fehér csík van (5. ábra).

Tavasztól késő őszig repül. Jelentéktelen szerepe van a szúnyogcsapás okozásában. Szabadban, házakban, erdőben, nádasban egyaránt előfordul. Lárva elsősorban a szennyezett vizeket kedveli.

***Aëdes cantans* Meigen, 1818**

Szárnyerein sötét és fehér pikkelyek találhatók keverten. A hátsó lábpár combjának elülső felszíne fehér, és végig fekete pikkelyekkel behintett. A lábfejek fehér tögyűrűi a hátsó lábpáron szélesek, a középsőn és az elsőn keskenyek. Potroha lemezeinek első szegélyén keskeny, fehér szegélycsík található, az utolsó három lemez hátsó szegélyén is (5. ábra, 8. ábra).

Április közepétől július végéig repül. Folyók ártéri erdeiből hiányzik ez a faj. Egyetlen nemzedéke fejlődik ki évente. Erdei szúnyogfaj, főleg a láperdőket kedveli. Lárva az árnyékos vizeket kedveli.

***Aëdes cinereus* Meigen, 1818**

Szívókája rövidebb, mint az elülső comb. Potroha felül egyszínű, sötét. Szemét nem szegélyezik fehér pikkelyek, háta rézvörös (5. ábra, 6. ábra, 8. ábra).

Áprilistól augusztus végéig repül. Nádasokban, ligetekben, bozótokban kellemetlenkedik. Nem jellemző a folyók árterületére és az alföldi szikesekre. Évente kétféle vagy több nemzedéke van.

***Aëdes rossicus* Dolbeskin, Gorickaja és Mitrofanova, 1930**

Szívókája rövidebb, mint az elülső comb. Potroha felül egyszínű, sötét. Szemét fehér pikkelyek szegélyezik, háta feketésbarna (5. ábra, 6. ábra, 8. ábra).

Áprilistól augusztusig repülnek egyedei. A Duna és Tisza folyók ártéri erdeiben található meg. Évente egy vagy több nemzedéke van.

***Aëdes caspius* Pallas, 1771**

Szívókája csak a csúcsrészen barna, felül szétszórt, alul összefüggő fehér pikkelyek borítják. Szárnyerein sötét és világos pikkelyek keverednek, az r_{2+3} sugárereken a sötét pikkelyek vannak többségben. A hátsó lábpár valamennyi lábfejeze mindkét végén világos gyűrűket visel, a többi lábon csak az 1. és 2. ízek. Potrohán széles harántcsíkok valamint többé-kevésbé fejlett hosszanti, világos csík díszíti (5. ábra, 6. ábra, 8. ábra).

Április végétől október elejéig repülnek egyedei. Az alföldi rétek, pusztaságok jellemző faja, házakba nem szívesen megy. Lárvája sötét, főleg az Alföld napsütötte, gyér növényzetű időszakos vizeiben fejlődik. Annyi nemzedéke van, ahányszor a tenyészhelye víz alá kerül.

***Aëdes rusticus* Rossi, 1790**

Szárnyának sugárereit fekete pikkelyek borítják, fehér pikkelyekkel szegélyezve. Lábfejezein nincsenek világos pikkelyek. Potrohát hosszanti világos sáv díszíti, a harántcsíkok vékonyak (5. ábra, 8. ábra).

Április közepétől június végéig repülnek az imágók. Kis szerepe van a tavaszi szúnyogcsapásban. Erdőkben és erdei tisztásokon található meg. Évente egyetlen nemzedéke van.

***Aëdes flavescens* Müller, 1764**

Fejét elől rézvörös, hátul sötétsárga és fekete pikkelyek borítják. Fekete hátát is rézvörös pikkelyek borítják. A szárny ereit többnyire világos pikkelyek fedik. Lábfejezeit széles, világos tögyűrűk díszítik. Potroha egyszínű agyagsárga (5. ábra, 6. ábra, 8. ábra).

Április elejétől augusztus közepéig találták meg a felnőtt egyedeit. Kora tavaszi faj. Sötét faj, napos rétek pocsolyáiban fordul elő az Alföldi-szikes területeken. Egy tavaszi és egy nyári nemzedéke van.

***Aedes excrucians* Walker, 1856**

Fejét világos pikkelyek borítják. A pofák fehér pikkelyei fekete foltot vesznek körül. A szívóka középső pikkelyei fehérek. Háta közepés széles aranybarna sáv található. A szárny főerein sok az elhintett világos pikkely. A hátsó combtő fele tiszta fehér. Az 1. potrohszelvényén csak fehér pikkelyek vannak. Potrohszelvényeit elől széles, hátul keskeny sárgásfehér harántsáv szegélyezi, a sötét részben sok szórt világos pikkely helyezkedik el (5. ábra, 6. ábra, 8. ábra).

Április közepétől július végéig repül. Kis szerepe van a tavaszi szúnyogcsapás okozásában. Lárvája a hideg vizeket kedveli. Nemzedékeinek száma évente egy, esetleg kettő.

***Culex hortensis* Ficalbi, 1899**

Szárnya r_{2+3} érének nyele $1/3$ olyan hosszú, mint a villája, a szárnyerek pikkelyei barnák. Hátsó lábszárának végén élénk fehér folt van. Potrohának harántgyűrűi a szelvények hátsó szegélyén vannak (5. ábra, 7. ábra).

Május elejétől október végéig repül. Napos vizes rét, nádas az élőhelye. Nappal faodvakba vagy barlangokba bújik. Nem kedveli az embervért.

***Anopheles messae* Falleroni, 1926**

A nőstény fejét kétoldalt barna, közepén fehér pikkelyek borítják. Szárnyának pikkelyei és lábai is sötétbarnák. Potroha sötétbarna, világos szőrzettel borítva (5. ábra, 7. ábra).

Májustól szeptember végéig repülnek egyedei. A meleg vizű alföldi mocsarak jellegzetes faja. Nem szereti a szennyezett vizet. A napsütötte, növényzettel benőtt sekély vizeket kedveli. Imágója csak a szabadban rajzik és párzik.

***Anopheles hyrcanus* Pallas, 1771**

Fehérrel tarkított színezetével egyedül áll az egyszínű, barna szárnyú hazai Anopheles nem szúnyogfajai között. Feje tetején fehér színű világos pikkelycsomó található. Fehér pikkelyek élénkítik a csápot és a tapogató ízének végét. Szárnyerein fehér és barna pikkelyekkel fedett szakaszok váltakoznak. A lábfejek csúcsain fehér gyűrűk vannak, a hátsó láb 4. íze teljesen fehér. Potroha barna, ugyanilyen színű csillogó szőrök fedik (5. ábra, 7. ábra).

Májustól szeptemberig repül. Szabadban, főleg nádasokban él. Az édesvizet kedveli, a víz sótartalmára érzékeny. Az embert ritkán támadja meg.

Meghatározatlan fajok:

A vizsgált imágók határozását nehezítette, hogy a humán csapdázással gyűjtött egyedek előéletük és a gyűjtés során kopottak lettek, határozó bélyegeik nem voltak felismerhetőek. Ezeket az egyedeket a szúnyogegyüttes mennyiségi meghatározásánál figyelembe vettem, de a minőségi meghatározásnál figyelmen kívül hagytam.

3.1.2 A mintavételi helyek tenyészővizei

Szeged egy tipikus alföldi város. Szúnyogok fejlődésére alkalmas vizeit szikes és nem szikes vizek. Jellemük geológiai adottságoktól és a környezeti szennyeződésektől függ. A zárójelbe tett számok a Szegedi vízfelszínek értékei. A szegedi felszíni vizek jellemző adatai az Alsó-Tisza Vidéki Környezetvédelmi Felügyelőségtől (ATIKÖFE) származnak.

szikes vizek: Nagy sótartalmú felszíni vizek. Nagy vezetőképesség (2000-4000 μ S/cm) és mérsékelt magas pH-érték (8,5-9,5) jellemző rájuk. Domináns kationjai közül a Na^+ (800-1200mg/l) és a Mg^{2+} (200-400mg/l) koncentrációban vannak jelen. Domináns anionjaik közül a SO_4^{2-} (300-600mg/l), a Cl^- (400-700mg/l) és a HCO_3^- (500-1000mg/l) koncentrációban vannak jelen (Felföldy, 1987).

nem szikes vizek: (tavak, holtmedrek, csatornák) Általában iszapréteg borítja a medrüket. Átlagos vezetőképesség (700-1300 μ S/cm) és mérsékelt lúgos pH-érték (7,6-8,5) jellemző rájuk. Domináns kationjai közül a Na^+ (30-80mg/l) és a Mg^{2+} (10-30mg/l) koncentrációban vannak jelen. Domináns anionjaik közül a SO_4^{2-} (20-60mg/l), a Cl^- (20-40mg/l) és a HCO_3^- (100-300mg/l) koncentrációban vannak jelen (Felföldy, 1987).

átmeneti szikesedő vizek: Eredetileg nem szikes vizek, de a környező mezőgazdasági tevékenység (pl. műtrágyázás), kommunális és ipari szennyezések valamint termálvizek szennyező hatása következtében sok vízben oldott só kerül a vízbe és megindul a szikesedés folyamata (Felföldy, 1987). Szeged város vizei többnyire szennyezettek vagy mérsékelt szennyezettek.

1; Dorozsma: Kertvárosi övezet magánházakkal. A közelben fekszik a Domaszéki-főcsatorna, néhány km hosszan érinti a területet, felülete 1ha, átlagos vízmélysége 1-1,5m. Nem szikes víztér, környező mezőgazdasági területek szennyezése (műtrágya) és kommunális szennyezés jellemző rá.

2; Dorozsma-Sziksós-tó: Üdülőterület, magánházakkal. Szúnyogos tenyészővize a helyi, agyagos-szikes, partmenti nádas tó. A tó felülete 21ha, átlagos vízmélysége 1,1m.

3; Gyálarét: Üdülőövezet magánházakkal. Természetes vize a szikesedő Gyálai-Holt-Tisza holt meder néhány eliszapolódott csatornája, melyek vizéből a környező mezőgazdasági területeket öntözik. A csatornák átlagos vízmélysége 1m, átlagos szélességük 4m összfelületük 1ha. Partjai mentén nádasok találhatók.

4; Hattyas (Klebsberg) városrész: Kertvárosi övezet magánházakkal. A közelben van a helyi szeméttelp és a Gyálai-Tisza holt meder Feketeparti szakasza, ami a belefolyó termálvíz miatt szikesedésre hajlamos, feliszapolódása előre haladott. Hossza 1,3km, átlagos szélessége 20m, átlagos vízmélysége 1,6m, teljes felülete 2,6ha. Partjai mentén nádasok találhatók.

5; Móraváros: Lakótelepek és magánházak is jellemzőek erre az átmeneti szikes területre. Természetes vizei a partmenti nádas Sancer bányatavak. Átlagos vízmélységük 2-4m, teljes felületük 11ha.

6; Kossuth L. sugárút: Lakótelepek jellemzik ezt a területet, természetes tavai a nem szikes, nádasos, erősen eliszapolódott Búvár-tó (3ha), a szikes Csemegi-tó (2ha) és a szikesedésre hajlamos Lencsés-tó (7-8ha).

7; Olajbányász tér: Lakótelepek jellemzőek erre a területre, természetes vizei nincsenek.

8; Dóm tér: A Belváros beépített területe, természetes vizei nincsenek.

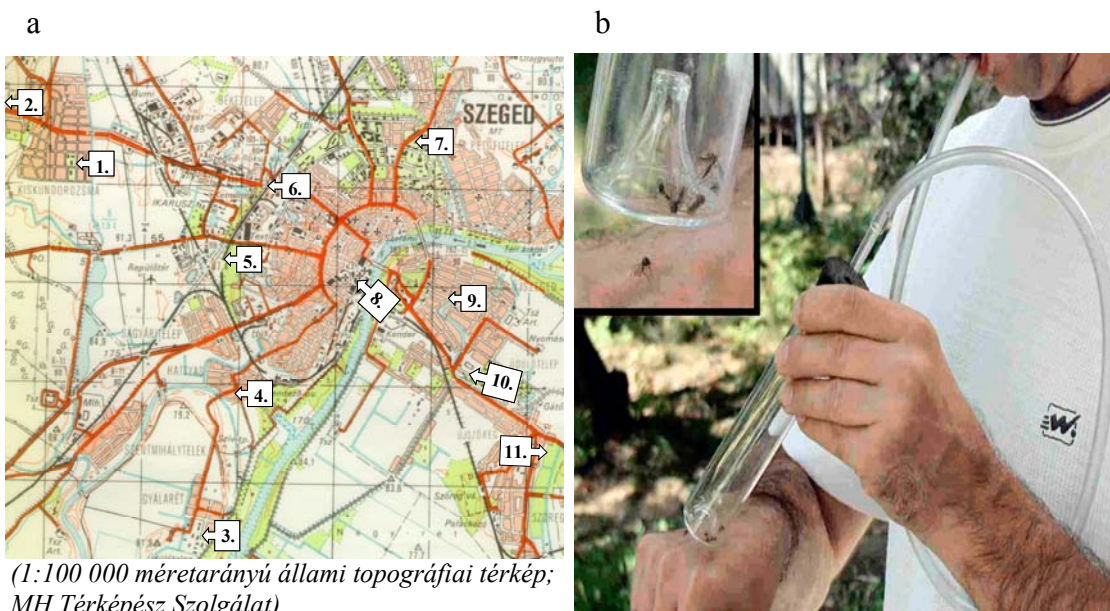
9; Újszeged, Víztorony tér: Lakótelepi-kertvárosi övezet a Tisza bal partján. Természetes vize az iszapos Holt-Maros holt meder. Hossza 4km, átlagos szélessége 25m, átlagos vízmélysége 1,5m, területe 10ha Feliszapolódása és benőtsége előrehaladott.

10; Kállay-liget: Ligetes, fás terület, kertvárosi övezet, természetes vize a Holt-Maros. Hossza 4km, átlagos szélessége 25m, átlagos vízmélysége 1,5m, területe 10ha. Feliszapolódása és benőtsége előrehaladott.

11; Szőreg: Kertvárosi terület, természetes vize a nem szikes, iszapos Szőreg-Deszki főcsatorna. Part menti nádas jellemzi e vízteret.

3.1.3 A csípőszúnyogok gyűjtése (humán csapdázás)

Szeged csípőszúnyog együttesének felmérése során 11db mintavételi pontot tanulmányoztam Szeged város különböző területein. A mintavételi pontok az eltérő életterek alapján lettek kijelölve (9/a. ábra).



9. ábra: A mintavevő helyek (a) és a mintavétel módja (b) Szegeden

A szúnyogok adatgyűjtését egy csapat tagjaként végeztem. A mérési pontokon a mintavétel egyidejűleg történt. A gyűjtést szippantócső segítségével végeztük. A vérszívás céljából letelepedett szúnyogokat a szippantócső tölcséres végével leborítottuk és a másik végére szerelt gumicsövön keresztül felszippantottuk a cső belsejébe (9/b. ábra). Mindig azonos mérőpontokon mértünk, a kezeléseket megelőző napon és a nap azonos időszakában 19:30 - 21:30 óra között. A mintavétel kezdetét a naplementéhez igazítottuk (naplementét követő 30 percen belül). A mintavétel idején húsz méteres körzetben belül nem tartózkodott más személy. A mérések alkalmával elfogott szúnyogok adatait (gyűjtés helye és ideje) feljegyeztük (Erdős, és munkatársai 2001). A szezon végeztével a szúnyogokat meghatároztam. A fő határozási bélyegek az imágók mérete, alakja, színezete és mintázata voltak (Mihályi és Gulyás, 1963).

A gyűjtés során használt kifejezések magyarázata:

domináns: a leggyakrabban előforduló faj, vagy a >25%-os gyakoriságú fajok.

szubdomináns: a 10-25%-os gyakoriságban előforduló fajok.

ritka: a < mint 10%-os gyakoriságban előforduló fajok.

3.1.4 A hetente végzett kémiai szúnyoggyérítés

A kémiai szúnyoggyérítést májustól szeptember végéig végezték heti rendszerességgel a Szegedi Kht. szakemberei. Légi úton repülőgépről permeteztek UNITOX 14 ULV-t 0,6 liter/ha (14% diklórfosz) koncentrációban, vagy K-OTHRIN 1 ULV-t 0,6 liter/ha (0,12 % deltametrin) koncentrációban (*Lee és munkatársai, 1996, Erdős, és munkatársai 2001*), a földön pedig melegköd képző géppel permeteztek UNITOX 100 SC-t (1000g diklórfosz/liter) 0.02 liter/ha dózisban. A ködképzéshez, 98liter gázolajhoz 2 liter UNITOX 100 SC-t adtak, majd az így elkészített oldatból 10-15 liter/ha juttattak ki. A kémiai szúnyoggyérítéseket mindkét módszerrel este, vagy hajnalban végezték az egyéb rovarok kímélése miatt (*Erdős, és munkatársai 2001*). A kémiai kezelések hatékonysága 92-100% volt (*Szító 1999, személyes információ*).

3.2 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* kutatások

A csípőszúnyogok elleni hatékony, biológiai védekezéshez nemcsak a csípőszúnyogok ökológiáját, hanem a mikrobiológiai ellenségeinek (*Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* de Barjac 1978) a paramétereit is szükséges ismernünk.

3.2.1 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti)

Az aerob *Bacillus* genus tagjai anyagcseréjük szempontjából kemoorganotrófok, ökológiájukra jellemző az endospórák jelenléte. Spóraképző tulajdonságuk révén sajátos helyet vívtak ki földünk baktériumvilágában (*Szmirnov és munkatársai, 1986*).

A *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* faj pálca alakú, aerob baktérium. (*de Barjac és Frachon, 1990*). Hossza 3-5µm, szélessége 0,5-0,8µm. A spóra 2-3µm hosszú és ovoid alakú. A Bti-baktériumot kísérleteimhez egy kereskedelmi termékből izoláltam (VECTOBAC 12 AS, Valent BioScience Co, Libertyville, IL, USA).

3.2.1.1 Az alkalmazott inkubációs eljárás

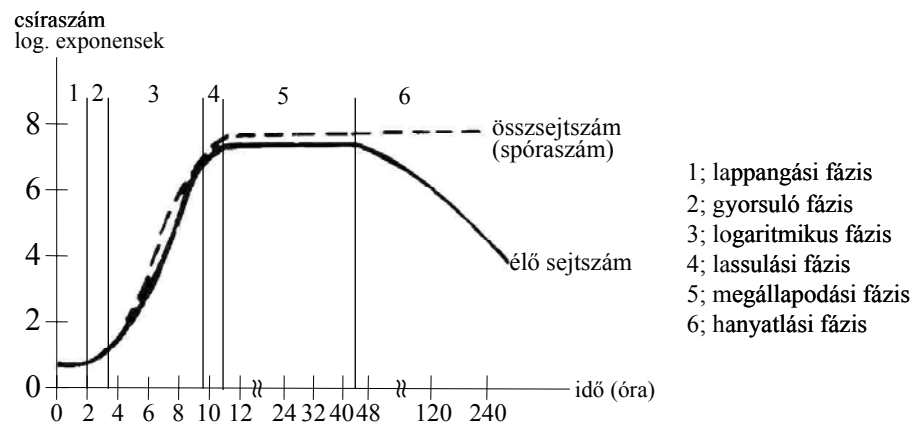
A tenyésztést a tápoldatok összeállítása, majd sterilizálása után Gyrotory rázótermosztátban végeztem (*Smith, 1982*). A fermentálás körülményeit az alábbi paraméterek szerint állítottam be: T=28 °C; rpm= 195/perc.

A fermentációt követően közvetett sejtszámlási módszerrel az élő csíraszámot határoztam meg hígítás és szélesztés módszerével, majd meghatároztam a szuszpenzióknak a spóratartalmát Schaeffer-Fulton-féle spórafestéssel. Valamennyi kísérlet esetében legalább három azonos körülményű (párhuzamos) kísérletet figyeltem meg, a spóraartalom értékek meghatározásához tíz látótér átlagát vettem figyelembe. A kapott eredmények alatt a párhuzamosok értékelésekor mért adatok átlagát értem (*Alföldi és Hegedűs, 1952*).

A tápoldatokat valamennyi kísérletsorozatban autoklávozással 115 °C –on, 35 percig sterilizáltam, majd a szobahőmérsékletűre hűlt tápoldatot oltottam be vegetatív Bti-inokulummal.

3.2.1.2 Az élő sejtszám meghatározás hígítás és szélesztés módszerrel

A közvetett sejtszámlási eljárás esetében nem a tényleges sejtszámot kapjuk, hanem azon élő sejtek számát határozzuk meg, amelyek különálló telepeket képesek létrehozni. Az élő sejtek száma fiatal tenyészetek esetében megegyezik az összes sejtszám értékével. A spórás baktériumok szuszpenzióiban a mikrobák a hanyatlási fázisban csak hirtelen bekövetkező sokk esetében pusztulnak el, egyébként spórákká alakulnak (10. ábra) (*Arnold és munkatársai, 1992*).



10. ábra: A baktériumok szaporodási dinamikája folyékony tápoldatban.

A meghatározni kívánt sejtszuszenzió 0,1ml mennyiségéből tízes alapú hígítási sort készítettem, majd a hígított szuszpenziókból 0,1ml –t húsleves-agar (HL-A) lemez felületén egyenletesen eloszlattam („szélesztettem”). Ezt követően beszárítottam a lemez felületét, így a híg Bti-szuszenzió különálló sejtjei a HL-A táplemez egy adott pontjához rögzülnek Ez az előfeltétele annak, hogy a belőlük kifejlődő telepek száma alapján a felvitt élőcsírák számát megadhassam. A

szélesztést követően a HL-A lemezeket 24 órára 37°C-os termosztátba helyeztem. A kedvező körülmények hatására a vegetatív sejtek és a spórák egyaránt telepeket képeznek, melyeket 24 óra inkubációs idő elteltét követően megszámloltam, majd a kapott értéket a hígítás arányában visszaszoroztam. A kapott eredményt a milliliterenkénti szuszpenzióban levő Bti-csírák számával fejeztük ki (*Alföldi és Hegedűs, 1952*).

A sejtszámláláshoz használt HL-A lemezek összetétele: (alapoldat ioncserélt víz) 3g/l beef extract; 10g/l pepton; 3g/l NaCl; 2g/l Na₂HPO₄*2H₂O; 25g/l agar poliszacharid (*Agar agar* tengeri algát tartalmaz). A HL-A lemezek olvadáspontja 90°C; dermedéspontja 50°C. A HL-A tápoldatot hőlég-sterilizátorban (Chertoclav) sterilizáltam, miközben folyékony állapotúvá vált. Fúvatott steril fülke alatt vékony (2mm) rétegben Petri csészékbe öntöttem, a száradás alatt a lemezek lehűltek és megdermedtek. Ezt követően a lemezeket 24 órára 37°C –os termosztátba helyeztem a sterilitás ellenőrzése miatt (*Alföldi és Hegedűs, 1952*).

3.2.1.3 A spóratartalom meghatározása

A baktériumok spórái egyszerű festéssel nem festődnek, ezért a festék bevitelét Schaeffer-Fulton -féle agresszív festéssel valósítottam meg. A tárgylemezre cseppentett szuszpenziót beszárítással rögzítettem, majd malachitzöld festékoldatot csepegtettem a tárgylemez felületére és alulról háromszor gőzölésig hevítettem. Közben az elpárolgott folyadékot a festékoldat állandó adagolásával pótoltam. Ezután harminc másodpercig alulról folyóvízzel mostam a preparátumot. Ezt követően a vegetatív baktérium alakok láthatóvá tételére hatvan másodpercig safraninos kontrasztfestést alkalmaztam, majd alulról csapvízzel mostam a preparátumot - a nem kötődő festékoldat eltávolítása miatt -, végül szárítottam a kész preparátumot. A malachit-zöld festékoldat a spórákat zöld színűre ~, míg a safranin festékoldat a vegetatív baktériumcsírákat piros színűre festette meg. Ezt követően 1000*-es nagyítású mikroszkóp alatt tanulmányoztam, a rögzített kenetre immerziós olajat csepegtetve. Egy minta kiértékelésénél tíz átlagos látótérben számloltam meg a spórákat és a vegetatív alakú Bti-sejteket, az eredmény kiszámításánál a tíz látótér számtani közepét vettem alapul. A spóraartalom értékének meghatározását a következőképpen értékeltem: $\text{spóraartalom (\%)} = 100 * (\text{látótér spóraszám} / \text{látótér összes csíraszám})$ (*Arnold és munkatársai, 1992*).

3.2.2 A natív fermentlé előállítása

Kutatási tervemben szerepelt többféle toxikus Bti-spóra készítmény előállítása és kiszterelése. Ehhez azonban szükséges volt előállítanom egy tápoldatot, melynek a kezelése egyszerű, benne jól szaporodik a Bti-mikroba, minél hatékonyabban és rövid idő alatt képez szúnyoglárvákra toxikus spórákat és mindenekfelett nagyüzemi alkalmazása olcsó. A feladatot nehezítette az a tény, hogy optimális körülmények esetén a jól szaporodó baktérium vegetatív alakja nehezen bírható spóráképzésre, kedvezőtlen körülmények esetén pedig a hatékony spóráképződés nem párosul a mikroba növekedésével.

3.2.2.1 Tápoldatok Bti-tenyésztéséhez

Minden tápoldatnak biztosítania kell az anyagcseréhez és a szaporodáshoz szükséges energiát adó anyagokat, a bioszintézishez szükséges szén és nitrogénforrást és a szükséges ionokat, beleértve a nyomelemeket is (*Horváth, 1980; Vácsi, 1988*). Ezek fontos szerepet játszanak a sejtek fermentációs folyamataiban és a spóráképzésben is. A szaporodás exponenciális fázisában és a sporuláció ideje alatt a bacillussejtek a Cu^{2+} -ionokat beépítik szervezetükbe. A legtöbb Cu^{2+} -ion a bacilusok érett spóráiban található. Az ionok beépülésének intenzitása a szaporodás folyamán változó mikroelem szükséglet függvénye (*Szmirmov és munkatársai, 1986*).

Kísérleteim során célom volt toxikus Bti-spórák tenyésztése olcsó és egyszerű tápközeg alkalmazásával. Tanulmányoztam szintetikus tápoldatokban és ipari eljárások során keletkező egykomponensű melléktermékekben a Bti-mikroba fermentálásának lehetőségét. Kontrollként valamennyi vizsgálat esetében húsleves (HL) tápoldatot használtam.

Kontroll (HL) tápoldat súlyszázalékos összetétele: (alapoldat ioncserélt víz) 3g/l beef extract; 10g/l pepton; 3g/l NaCl; 2g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH= 6,8 (*Alföldi és Hegedűs, 1952*).

Inoculum: A VECTOBAC 12 AS kereskedelmi termékből izolált mikrobát 24 óráig steril HL-tápoldatba fermentáltam, 37 °C –os inkubátorban. Az így inkubált színtenyészet a fermentáció „log” (logaritmikus) fázisában volt. (élő sejtszáma: $6-7 \cdot 10^7$ n/ml; spóratartalma: 0%)

3.2.2.1.1 Szintetikus tápoldatok

A T_1 - T_{10} szintetikus tápoldatok összeállításánál korábbi tapasztalatokra hagytam (Faloci és munkatársai, 1986; Guan és munkatársai, 1998). Szintetikus tápoldatokat állítottam össze a mikrobák tenyésztéshez szükséges anyagokból (I. táblázat) és tanulmányoztam a vegetatív Bti-baktériumok növekedését és spóratartalmát a 2.2.2. pontban meghatározott paraméterek mellett (Smith, 1982). Szakirodalomból szerzett spóráképzést elősegítő ismereteket alkalmazva, tettem a tanulmányozott tápoldatokhoz kétértékű kationokat is (Szmirnov és munkatársai, 1986). A Bti-fermentátum élő sejtszámát és a spóráképződés hatékonyságát 48, 96, 144 és 240 óra inkubációs idő után ellenőriztem. A kapott eredmények pontosságának megerősítése érdekében a kísérleteket legkevesebb három alkalommal megismételtem.

Szintetikus tápadataink összeállításához az alábbi komponenseket alkalmaztam:

Glukóz; izocukor; laktóz; szacharóz; glükóz:	<i>Szén- és energiaforrás</i>
Pepton; glutamin;	<i>Fehérje, aminosav, szén- és energiaforrás</i>
Élesztő kivonat;	<i>Fehérje, aminosav forrás, B vitamin, kofaktorok</i>
NH_4NO_3 :	<i>Nitrogénforrás</i>
K_2HPO_4 :	<i>Foszfát forrás, puffer</i>
NaCl ; KCl ; CaCl_2 ;	<i>Ozmotikus állapotok szabályozása; ionháztartás biztosítása;</i>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;	<i>Életfunkciókhoz és spóráképzéshez</i>
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;	<i>szükséges mikroelemek;</i>

A; kísérlet: A Bti-baktérium tenyésztésének hatékonyságát kezdetben a nélkülözhetetlen komponensek mellett különféle cukorfajtákat és peptont alkalmazva tanulmányoztam (I. táblázat) annak érdekében, hogy behatároljam, milyen típusú szénhidrátokat hasznosít életfolyamataihoz.

B; kísérlet: A spóráképzés fokozása érdekében az A; kísérletben használt anyagkomponensek közül a tápoldat pepton tartalmát minimalizáltam, ezzel kedvezőtlen körülményeket idézve elő.

C; kísérlet: A pepton tartalom minimalizálását követően a tápoldat cukor tartalmát is minimalizáltam, ezzel fokozva a kedvezőtlen körülményeket.

Külön sterilizáltam az A; a; B; C és D oldatokat, hogy az autoklávozás során ne csapják ki egymást a különböző komponensek. A tápoldatokat valamennyi kísérletsorozatban autoklávozással 115 °C –on, 35 percig sterilizáltam.

A oldat: (5g/l) pepton; (0,5g/l) K_2HPO_4 ; (2g/l) NH_4NO_3 ; (5g/l) NaCl;
(2g/l) élesztő kivonat;

a oldat: (0,5g/l) K_2HPO_4 ; (2g/l) NH_4NO_3 ; (5g/l) NaCl; (2g/l) élesztő kivonat;

B oldat: (3g/l) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; (0,5g/l) $MnSO_4 \cdot 4H_2O$; (0,5g/l) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$;

C oldat: (5g/l) $CaCl_2$;

D oldat: (150g/l) glükóz; vagy (150g/l) izocukor; vagy (30g/l) glutamin; vagy (150g/l) laktóz; vagy (150g/l) szacharóz;

I. táblázat: A szintetikus tápoldatok összetétele (2.2.3.1.1. kísérlet)

tápoldatok	Ionháztartás biztosítása; Spóráképzéshez szükséges mikroelemek			Ozmotikus állapotok szabályozása			Foszfor forrás, puffer	Nitrogén forrás	Szén- és energia forrás				Fehérje-, aminosav-, szén-, energia forrás B vitamin, kofaktorok		
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/l)	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (g/l)	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (g/l)	NaCl (g/l)	KCl (g/l)	$CaCl_2$ (g/l)	K_2HPO_4 (g/l)	NH_4NO_3 (g/l)	Glükóz (g/l)	Izocukor (g/l)	Laktóz (g/l)	Szacharóz (g/l)	Élesztő kivonat (g/l)	Glutamin (g/l)	Pepton (g/l)
T ₁	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	15	-	-	-	2	-	5
T ₂	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	-	2	-	5
T ₃	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	-	-	-	5
T ₄	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	7,5	-	-	7,5	-	-	5
T ₅	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	15	-	-	-	-	5
T ₆	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	15	-	-	-	5
T ₆₁	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	15	-	-	-	2,5
T ₆₂	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	15	-	-	-	1,25
T ₆₃	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	15	-	-	-	0
T ₆₃₁	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	7,5	-	-	-	-
T ₆₃₂	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	3,75	-	-	-	-
T ₆₃₃	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	1,875	-	-	-	-
T ₆₃₄	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	0	-	-	-	-
T ₇	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	15	-	-	5
T ₇₁	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	15	-	-	2,5
T ₇₂	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	15	-	-	1,25
T ₇₃	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	15	-	-	0
T ₇₃₁	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	7,5	-	-	-
T ₇₃₂	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	3,75	-	-	-
T ₇₃₃	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	1,875	-	-	-
T ₇₃₄	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	-	-	-	0	-	-	-
T ₈	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	15	-	-	-	2	1	5
T ₉	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	15	-	-	-	2	-	5
T ₁₀	0,03	0,005	0,005	5	1	0,1	0,5	2	5	5	5	5	2	1	-

2.2.3.1.1. a; kísérlet

2.2.3.1.1. b; kísérlet

2.2.3.1.1. c; kísérlet

3.2.2.1.2 Egykomponensű tápoldatok

Tanulmányoztam különböző egykomponensű tápoldatokban a Bti-fermentációjának a lehetőségét, előtérbe helyezve az ipari eljárásoknál keletkezett melléktermékeket, melyek csekély mértékben tartalmazzák a fermentációhoz szükséges tápanyagokat.

Egykomponensű tápoldatok összetétele:

T₁₁: SOLE gyártmányú tej: Fehérje (30g/l); Szénhidrát (47g/l); Zsír (28g/l); pH= 7,08;

T₁₂: Mikroelemeket tettem a T₁₁ tápoldathoz a spóráképző tulajdonság növelése érdekében. pH= 7,08;

$T_{12} = T_{11} + (3\text{g/l}) \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}; (0,5\text{g/l}) \text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}; (0,5\text{g/l}) \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O};$

T₁₃: Permeát; sajtgyártás során keletkezett melléktermék:

Alacsony pH-val rendelkezik, tejerjesztés során a fehérjék kicsapódnak, marad a tejsavó, majd ebből az ultraszűréssel eltávolított fehérjemennyiség után visszamaradó anyag a permeát (tejszűrlet).

6-7% szárazanyag; 63g/l laktóz; jelentős mennyiségű ásványi anyagok, zsír, fehérje, vitaminok; pH=6,52; Magas cukortartalma miatt veszélyes melléktermék.

T₁₄: A Bti-tenyésztés hatékonyságának növelésére a T₁₃ tápoldat összetételét bioszintézishez szükséges komponensekkel egészítettem ki. pH=6,50;

$T_{14} = T_{13} + (0,5\text{g/l}) \text{K}_2\text{HPO}_4; (2\text{g/l}) \text{NH}_4\text{NO}_3; (5\text{g/l}) \text{NaCl}; (2\text{g/l}) \text{élesztő kivonat};$

T₁₅: Mikroelemeket tettem a T₁₄ tápoldathoz a spóráképző tulajdonság növelése érdekében. pH=6,50;

$T_{15} = T_{14} + (3\text{g/l}) \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}; (0,5\text{g/l}) \text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}; (0,5\text{g/l}) \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O};$

T₁₆: 1000ml vízvezetéki víz; +50g húsliszt; pH=6,64

50g Húslisztet feloldottam 1000ml csapvízben. Az így kapott tápoldatot ½ órán keresztül autoklávbán 121 °C-on, 30 percig steriliztem.

T₁₇: A Bti-tenyésztés hatékonyságának növelésére a T₁₆ tápoldat összetételét bioszintézishez szükséges komponensekkel egészítettem ki. pH=6,73

$T_{17} = T_{16} + (0,5\text{g/l}) \text{K}_2\text{HPO}_4; (2\text{g/l}) \text{NH}_4\text{NO}_3; (5\text{g/l}) \text{NaCl}; (2\text{g/l}) \text{élesztő kivonat};$

T₁₈: Mikroelemeket tettem a *T₁₇* tápoldathoz a spóráképző tulajdonság növelése érdekében. pH=6,73

T₁₈= *T₁₇* + (3g/l) MgSO₄*7H₂O; (0,5g/l) MnSO₄*4H₂O; (0,5g/l) CuSO₄*5H₂O;

T₁₉: 1000ml vízvezetéki víz; +50g sertéshúst (comb); pH=8,82

A húst feldaraboltam, majd vízzel felöntöttem, és éjjelre hűvös helyre tettem. Másnap 30 percig főztem, majd vászonkendőn átszűrtem. Az elpárolgott vizet pótoltam, hogy a kezdeti aránynak megfeleljen. Az így kapott húslét ½ órán keresztül autoklávbán 121 °C-on, 30 percig steriliztem.

T₂₀: 1000ml vízvezetéki víz; +50g sertés fehércsont; pH=8,97

A sertés fehércsontot feldaraboltam, majd vízzel felöntöttem, és éjjelre hűvös helyre tettem. Másnap 30 percig főztem, majd vászonkendőn átszűrtem. Az elpárolgott vizet pótoltam, hogy a kezdeti aránynak megfeleljen. Az így kapott csontlét ½ órán át autoklávbán 121 °C-on, 30 percen keresztül steriliztem. Szakirodalomból szerzett ismeretek alapján kötőszövetek és támasztószövetek többféle (kb. 20 féle) kollagént tartalmaznak. A kollagén aminosav-tripletek periodicitásából áll, a tripleteket oligoszaccharidok kapcsolják össze. Aminosav-komponensei: glicin (Gly-35%), alanin (Ala-13%), prolin (Pro), lizin (Lys), 4-hidroxi-prolin (HO-Pro), δ-hidroxi-lizin (HO-Lys). A csont kalcium-foszfátot tartalmaz, főleg (Ca₃(PO₄)₂*CaCO₃ kettős-só alakjában (*Straub, 1982*).

A Bti-tenyésztés hatékonyságának növelésére a *T₁₉*- és *T₂₀*-tápoldatokhoz pepton-t tettem.

T₂₁: *T₁₉* + 5g/l pepton; pH=8,72

T₂₂: *T₂₀* + 5g/l pepton; pH=8,88

Mikroelemeket tettem a *T₂₁* és *T₂₂* tápoldatokhoz a spóráképző tulajdonság növelése érdekében.

T₂₃: *T₂₁*+(3g/l) MgSO₄*7H₂O; (0,5g/l) MnSO₄*4H₂O; (0,5g/l) CuSO₄*5H₂O; pH=8,71

T₂₄: *T₂₂*+(3g/l) MgSO₄*7H₂O; (0,5g/l) MnSO₄*4H₂O; (0,5g/l) CuSO₄*5H₂O; pH=8,93

3.2.2.2 A fermentáció további tanulmányozása

A csípőszúnyog lárvákra toxikus fehérjetest (δ -endotoxin) az exospóriummal körülvéve a Bti-baktérium spórája mellett található. Ehhez szükséges a baktériumok vegetatív alakjainak elszaporítása és spóráképzésre készítése. E folyamatok során eltérő lehet a tápanyag felhasználásuk, és egyéb életfolyamataikat kísérő jellemzők.

Ezért tovább tanulmányoztam a 2.2.3.1. kísérletekben optimálisnak bizonyult tápoldatot. Megállapítottuk a Bti-baktériumok szabad aminosav felhasználását HL-tápoldatban. Ezt követően T_{20} -tápoldatban meghatároztam a Bti-baktériumok szaporodási dinamikáját, a spóráképzés hatékonyságát, valamint mértem a tenyésztés során a pH-értékváltozást.

3.2.2.2.1 A felhasznált aminosavak meghatározása

A szabad aminosav meghatározását kollaborációban (Bay Zoltán Alapítvány Biotechnológia Intézet -Bioremediációs Labor) tanulmányoztuk.

A laboratóriumi HL-tápoldatban számos aminosav megtalálható. A HL-tápoldat 0, 24 és 240 órás fermentlé 1-1ml térfogatainak a szabad aminosav tartalmát határoztuk meg gázkromatográfiás módszerrel. A fermentátumból előzetesen centrifugálással (Gyrotory, 30perc, 4000rpm), eltávolítottuk a Bti-sejteket. A módszer leírását az irodalomjegyzékben (Hušek, 1991) leírtak szerint végeztük, HP5890 gázkromatográfval, és FID detektorral. A vizsgálathoz etil-kloroformáttal aminosav származékot képeztünk.

3.2.2.2.2 Az optimális tápoldat összecukor tartalmának meghatározása

Az összecukortartalom meghatározást kollaborációban végeztük az SZTE Biokémia Tanszékével. A 2.2.3.1. kísérletek során optimálisnak bizonyult tápoldat kiindulási és 12 órás Bti-baktériumok inkubációja során keletkező fermentlének összecukortartalmát határoztuk meg Anthron-módszerrel. A meghatározásnak az alapja, hogy a cukorkomponens, vagy komponensek az anthron reagenssel kénsavas közegben zöldeskék színezéket adnak, így a 620nm-nél mért extinkció értékekből kalibrációs egyenes segítségével kiszámíthatjuk a meghatározandó oldat cukortartalmát (*Alföldi és Hegedűs, 1952; Ábrahámné és munkatársai, 2004*).

3.2.2.2.3 A optimális tápoldat szaporodási dinamikája és a Bti-spóráképződése

A 2.2.3.1. kísérletek során optimális tápoldat 100ml mennyiségében Bti-szuszpenziót fermentáltam a 2.2.2. pont szerint. Az inkubáció során a képződött szuszpenzióból 1ml mintát vettem 0; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 32; 40; és 48

óra elteltével és meghatároztam a minta élő sejtszámát (2.2.2.1. pontban leírtak szerint) és spóratartalmát (2.2.2.2. pontban leírtak szerint).

3.2.2.2.4 A optimális tápoldat pH-értékváltozása a fermentáció során

A 2.2.3.1. kísérletek során optimálisnak bizonyult tápoldat 100ml mennyiségében fermentáltam a Bti-sejteket a 2.2.2. pontban leírtak szerint. Az inkubáció során a képződött szuszpenzióból 1ml mintát vettem 0; 4; 8; 12; 16; 20; 24; 32; 40; 48 és 96 óra elteltével és meghatároztam a minta pH-értékét OP 211/1 laboratóriumi pH-mérővel (Radelkis, Budapest).

3.2.3 Az optimális tápoldat ülepítése vízőldékony-polimerekkel

Az előállítás után a spórás Bti-szuszpenziót töményíteni szükséges. A koncentráls stabilizálja a baktériumok spóra állapotát is. (*Szmirnov és munkatársai, 1986*). A Bti-spórák koncentráls polielektrolitok (flokkulálószer) használatával történt. A hígított, spórás Bti-szuszpenziók flokkulációjával kapcsolatos méréseket a Miskolci Egyetem Analitikai Kémiai Tanszékén végeztük.

Flokkulálószerként SNFH528 (*Gyártó: SNF S.A., 41 rue Jean Huss, 42028 SAINT-ETIENNE, CEDEX 01, France*), Percol1697 és DS jelzésű kationos polielektrolitokat, SNFH149, SNFH57 (*Gyártó: lásd fent*), Magnafloc156 és Magnafloc1011 jelzésű anionos polielektrolitokat (*gyártó: Allied Colloids, jelenleg CIBA*) tanulmányoztunk. Percol1697 az akril-amid és akrilát kvatener-ammónium só kopolimere, molekulatömege kb. 200 000, töltéssűrűsége 14,9 mmol/g (*Bárány és Báder, 1988*). A Magnafloc156, 351 és 1011 polimereket nagy molekulatömegű poliakrilamid részleges hidrolízisével állítják elő, a 0,5% töménységű oldat viszkozitása megfelelően 1000 mNm⁻² s*10 és 1200 mNm⁻² s*10 (*Allied Colloids adat*). A gyártótól kapott információk szerint az SNFH57, SNFH528 és SNFH149 jelzésű polielektrolitok magas, nagyon magas és ultra magas molekulatömegű poliakrilamidok, vagy akrilamid kopolimerek akrilsav származékai. A 0,5%-os anionos polielektrolit-oldat viszkozitása 500-700mPa.s értékek között mozog. Az anionos minták szabad monomer tartalma kevesebb, mint 250ppm, a kationos mintánál kevesebb, mint 1000ppm. Jelenleg érvényben lévő rendeletek szerint nincs veszélyességi besorolásuk. Természetes vízi környezetben – az ott jelen lévő lebegő- és oldott anyagokon történő szorpciójuk miatt gyorsan eltűnnek a vízből.

3.2.3.1 Alkalmazott vízdékony-polimerek töltésének meghatározása

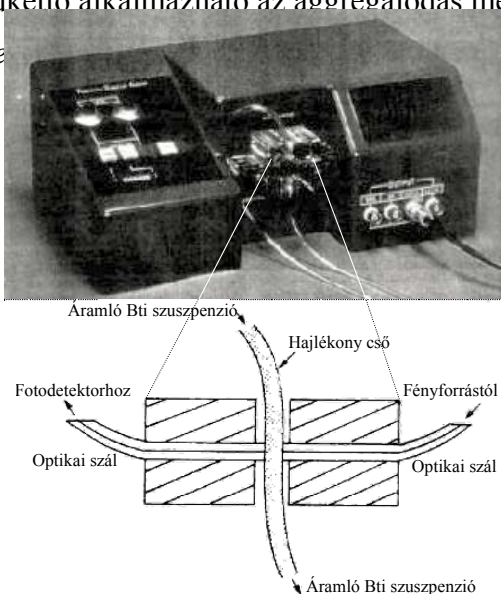
A pontosan ismert felépítésű anionos- és kationos jellegű (Na-lauril-szulfát⁽⁻⁾, Dicetil-dimetil-NH₄-Cl⁽⁺⁾) tenzidek 0,1%-os oldatai segítségével meghatároztuk az alkalmazott (Greenfloc; Rhodopol; Magnafloc156; Magnafloc351; Magnafloc1011; SNFH57; SNFH69; SNFH108; SNFH149; SNFH420; SNFH528) polielektrolitok makromolekuláinak töltéssűrűségeit 0,1% -os oldatok kolloid titrálásával.

A meghatározandó, ismeretlen töltéssűrűségű polimer 0,1%-os oldatának 2ml térfogatát adagoltuk az említett anionos- és kationos (0,1%) tenzidoldatok 2ml térfogatához (*Fleer és Scheutjens, 1993*). Az azonos töltésű polimeroldatokat a kicsapódás mértékének vizuális megfigyelése alapján sorrendbe állítottuk.

3.2.3.2 A flokkuláció tanulmányozása

A flokkulációs méréseket dinamikus feltételek mellett PDA-2000 részecskeméret analízisére alkalmas berendezéssel (Rank Brothers Inc, Anglia) végeztük a *Bárány és Báder (1988)*, valamint *Gregory (1988)* közleményeiben leírt módon. A műszer működési elve röviden a következő: az átlátszó flexibilis csövön áthaladó szuszpenzió egy kis térfogatában (jellemzően 1mm³) lévő részét egy szűk fénysugárral merőlegesen világítják meg. A szuszpenzió áthaladó fényintenzitás értékét érzékeny fotodetektor regisztrálja, amely a fényjelet elektromos jellé alakítja át (*11. ábra*). A fényjel az áthaladó fény átlag-intenzitását, azaz a szuszpenzió zavarosságát jellemző állandó fluxusból (dc), és a megvilágított zónában megjelenő részecskék számát jellemző fluktuáló fluxusból (ac) tevődik össze. Kimutatták (*Gregory, 1988*), hogy a fluktuáló jel négyzetes átlagának négyzetgyökös értéke (RMS) arányos a részecskék darabszám szerint átlagolt koncentrációjával és méretével. Az RMS értékek jelentősen növekednek az aggregálódás kezdetével és csökkennek a folyamat végzetével. A kijövő jel mutatja az RMS és az RMS/dc arány értékét is. Mindkettő alkalmazható az aggregálódás mértékének jellemzésére.

11. ábra: PDA-2000 mérőműszer



A PDA-2000 műszer korai információval szolgál a rendszerben lejátszódó aggregálódási folyamatokról, akár már másodpercek elteltével a komponens szuszpenzióhoz való hozzáadása után. Az ábrákon bemutatott RMS értékek a műszerrel érzékelhető effektusok tartományában végzett legalább három mérés eredményének az átlagai.

3.2.3.2.1 Az optimális tápoldat flokkulációjának kinetikája

A flokkuláció mértékét, melyet az RMS értékkel jellemeztünk, általában a polimeroldatnak a szuszpenzióhoz való (állandó keverés mellett) hozzáadása után 4-6 percen át mértük. Fontos volt megállapítani, hogy ez az időtartalom elegendő-e egy időben már lényegesen nem változó állapot elérésére, azaz reprodukálható aggregáció mértékek meghatározására. A méréseket egy cirkuláló rendszerben valósítottuk meg, a RMS értékeket 12 másodpercenként regisztráltuk. Ezzel a módszerrel részletesen tudtuk követni a flokkuláció időbeli lefolyását.

3.2.3.2.2 A méréshez szükséges Bti-szuszpénzió koncentrációnak a meghatározása

A PDA-2000 műszer érzékeny mérési tartománya az 1,00 és 4,00 RMS értékek között van. A flokkulációs kísérletek előtt meghatároztuk, milyen koncentrációjú tápoldatban végezhető el a polielektrolitoknak a Bti-spórákra gyakorolt aggregáló hatásának a tanulmányozása, vagyis hogy az effektusok a fenti RMS tartományban jól mérhetők legyenek. E célból az $1,5 \cdot 10^7$ n/ml kiinduló spórák Bti-szuszpénzióból tízszeres, hússzoros, harmincszoros, negyvenszeres, ötvenszeres és százszoros hígítású szuszpenziókat készítettünk és mértük ezek fényszórását.

Mivel úgy tapasztaltuk, hogy a tápoldat koncentrációja és az RMS értékek között nincs egyenes összefüggés, ezért minden méréssorozat előtt meghatároztuk a alkalmazott sejtszuszpénzió (viszonyítási alapul szolgáló) RMS értékét.

3.2.3.2.3 A leghatékonyabb kationos és anionos polimerek kiválasztása

Munkánk során különböző kationos és anionos polielektrolitokat vizsgáltunk, majd részletesen tanulmányoztuk a leghatékonyabbaknak bizonyult minták által kiváltott flokkuláció törvényszerűségeit. A kísérleteket $3 \cdot 10^5$ n/ml töménységű és 100% spóratartalmú Bti-szuszpénzióval, valamint 0,01%-os polielektrolit-oldatok alkalmazásával végeztük, mind a kationos, mind az anionos polielektrolitok esetében.

3.2.3.2.4 A Bti-szuszpénzió koncentrációjának a hatása

Ennek tanulmányozására különböző hígítású szuszpenziókat flokkuláltattunk az (igen hatékonynak bizonyult) SNFH528 jelzésű kationos polielektrolit 0,01%-os oldatával.

3.2.3.2.5 A polimeroldat adagolási módjának a hatása

Tanulmányoztuk, hogy változik-e a Bti-szuszpénzió aggregálódásának mértéke, ha a vízdékony-polimeroldatot folyamatosan, vagy szakaszosan visszük be a rendszerbe. Megmértük a rendszer RMS értékének változását a bevitt SNFH528 jelzésű kationos polimer (0,01%) koncentrációjának függvényében, ha a vegyszert egyszerre, vagy két egyenlő részben (a második részletet az első után öt perc elteltével) adagoltuk.

3.2.3.2.6 A polimeroldat koncentrációjának a hatása

Gyakran az alkalmazott polimeroldat koncentrációja is befolyásolja a részecskék aggregálásának a mértékét (*Bárány, 2000*). Ennek a hatásnak az ellenőrzését SNFH528 jelzésű kationos polielektrolit 0,1% és 0,01% oldatával történő flokkulálás során tanulmányoztuk.

3.2.3.3 A tömény optimális tápoldat ülepítése

A tömény Bti-szuszpénzió flokkulációját a továbbiakban Szegeden végeztem a Bay Zoltán Alapítvány Biotechnológia Intézetében. A hígított, spórás Bti-szuszpénziók tanulmányozásánál szerzett ismereteket alkalmazva megfigyeltem a spórás, natív (nem-hígított) Bti-szuszpénzióban a makromolekulák hatására képződött sejtaggregátumok ülepedését. Az SNFH528, SNFH57 és SNFH149 polimerekből (SNF S.A., 41 rue Jean Huss, 42028 SAINT-ETIENNE, CEDEX 01, France) 0,1%-os vizes oldatokat készítettem. Az alkalmazás során 25ml spórás Bti-szuszpénzió ülepedésének hatékonyságát figyeltem meg 10ml össztérfogatú polimer és desztillált víz elegyének a hozzáadását követően, amely növekvő polimer mennyiséget tartalmazott 0-10ml térfogatú 0,1%-os polimeroldat függvényében. A végső térfogatban (35ml) a Bti-spóra tartalom $1 \cdot 10^7$ n/ml volt a kémcsövekben. Kontrollként 25ml Bti-szuszpénzió és 10ml desztillált víz keverékében

tanulmányoztuk a spontán ülepedést. A kísérletek folyamán rendszeresen (24, 48, 120 órás effektusok után) mértem a felülúszó optikai denzitását (OD_{546} , vakoldat: ioncserélt víz) spektrofotométerrel (Unicam UV-Visible Spectrometers; P.O.B: 206; York Street, Cambridge, UK.), majd 120 óra flokkulációs hatást követően meghatároztam a felülúszó élő csíraszámát a hígítás és szélesztés módszerét felhasználva (2.2.2.1. pontban leírtak szerint). A kontroll szuszpenzió spontán ülepedését hasonlítottam össze a polimerek ülepítésre gyakorolt hatásával.

3.2.4 A hordozók jellemzése

A folyadék-közegű Bti-spóra készítményeket a csípőszúnyog lárvák tenyészővízeibe kell eljuttatni, hogy ott kifejtsék toxikus hatásukat. A repülőgéppel való kijuttatás a leggyorsabb módszer. A tenyészővizek a legtöbb esetben növényzettel borítottak, ezért a repülőgépről kijuttatott permetnek csak kis része jut el a tenyészőhelyek felszínére. Egyik lehetséges megoldás, hogy a spórás Bti-szuszpénzió egy nagy tömegű hordozóhoz rögzítve jut át a növényzeten, és a vízbe jutva a hordozóról leoldódó Bti-spórákák fejtik ki a szúnyoglárvákra toxikus hatásukat.

Tanulmányaim során mádi természetes zeolit ásványi frakciót, erdőbényei égetett kovaföld ásványi őrleményt, erdőbényei szárított kovaföld ásványi őrleményt és mosott folyami homok szemcséket (Maros) tanulmányoztam. Előzetesen meghatároztam a részecskék folyadékmegkötő képességét, amiből a felületük egymáshoz viszonyított nagyságára következtettem.

A hővel sterilizált (24 órás expozíció, 105°C hőmérséklet) részecskéket telítettem 100% spóra tartalmú Bti-szuszpénzióval, majd steril körülmények között szobahőmérsékleten (23°C) beszárítottam. Az így előállított szorbeált Bti-készítményekről reszuszpendálódó Bti-spórák hatékonyságára voltam kíváncsi, ezért biológiai lárvatesztet (2.3.) ellenőriztem készítményeim eredményességét. A felületen történő kitapadás ugyanis elősegíti és stabilizálja a spóráképződést (Szmirnov és munkatársai, 1986).

mádi természetes zeolit ásványi frakció:

Porózus ásványi frakció, melynek szemcseméretét szitálással állítottam be (szemcseméret: 1,5-2mm). Az alkalmazott ásványi frakció porózus szerkezetű részecskéi közel izometrikus alakúak voltak.

erdőbényei égetett és szárított kovaföld ásványok:

A kovaföld ásványokat az előállítás során kiégetik, de a kísérlet érdekében tanulmányoztam a beszárított kovaföld alkalmazhatóságát is.

Az égetett, gyári kovaföldet szitálással frakcionáltam (szemcseméret: 0,2-0,5cm). Az alkalmazott ásványi frakció porózus részecskéi közel izometrikus alakúak voltak.

A porózus szárított kovaföld szemcsemérete 1-1,2mm.

mosott folyami homok frakció

A Maros hordalékából származó tömör felületű ásványi frakciót szitálással frakcionáltam (szemcseméret: 1-1,5mm). Az alkalmazott ásványi frakció részecskéi közel izometrikus alakúak voltak.

3.2.4.1 A részecskék víztartalmának meghatározása

Az ásványi hordozók (zeolit, égetett kovaföld, szárított kovaföld és folyami homokszemcsék) felszínükön a fajlagos felülettel arányban vizet kötnek meg. Ennek mennyiségi meghatározására légszáraz állapotban lemértem 10-10 gramm ásványi anyagot. A kísérletet szobahőmérsékleten ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) végeztem. Ezt követően a főzőpoharakat 105°C –os termosztátba helyeztem, majd 96 óra múlva vákuum exikátorban lehűtve a tanulmányozott részecskéknek ismét lemértem a tömegét. A kapott tömegvesztesség az elpárolgott víz mennyisége volt, melyet százalékos értékben fejeztem ki, a vízzel telített részecskék tömegéhez viszonyítva.

3.2.4.2 Hordozókhoz kötött Bti-készítmények előállítása

A hordozókhoz kötött Bti-készítmények előállításánál a natív Bti-szuspenzió 10ml-ével steril körülmények között telítettem a felsorolt hordozók 10-10 grammos mennyiségét, majd alumínium fólián szétterítettem és steril fülke alatt 37°C –on beszárítottam a készítményeket.

3.2.4.3 A hordozókhoz kötött készítményekből a Bti-spórák reizolálása

Két darab literes lombikba egy-egy liter ioncserélt vizet sterilizáltam. A tanulmányozott hordozókhoz kötött Bti-spóra készítmények (FHT_{20Bti}-H; SZKT_{20Bti}-H; ÉKT_{20Bti}-H) két-két grammnyi ásványi frakcióját adagoltam a lombikokba helyezett víz felszínére, majd ellenőriztem az ásványi részecskékből kioldódott Bti-spóra mennyiségét a Bti-ázalék felszínéről vett minta élő

sejtszámának meghatározásával. A mintavételeknél ügyeltem a steril körülményekre, hogy egyéb mikroba ne zavarja a tanulmányaimat. A mintavételek élő sejtszám értékeit a kiindulási sejtszám százalékában ábrázoltam. Az ázalék tetejéről vett minta élő sejtszámát határoztam meg 1; 2; 12; 24; 48; 96 és 168 órás expozíciót követően.

3.3 Bti-toxicitás meghatározására használt teszt

A *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* alfaj fő támadáspontja a csípőszúnyog lárvák emésztőcsatornájának bélhámja (Chilcott és Ellar, 1988; Bhattacharya, 1998). A szúnyoglárvákkal szemben kifejtett toxicitást ezért a jelenlegi munka fő eredményének tekinthető.

A csípőszúnyogok a kétszárnyúak rendjébe tartoznak, s így a teljes átalakulással járó fejlődésmenet jellemző rájuk (pete, lárv, báb, imágó). A lárvállapot négy fejlődési stádiummal jellemezhető, melyek legegyszerűbben méret alapján különíthetők el. A kísérleteim során 3. lárvállapotú *Aedes vexans* egyedeket használtam (Klowden és munkatársai, 1984).

A teszttel meghatároztam az összeállított tápoldatok és készítményeim toxicitását. Kontrollként kezeletlen tenyészővizet (negatív kontroll-I.), Bti-baktériummentes tápoldattal kezelt tenyészővizet (negatív kontroll-II.), valamint ismert toxicitású kereskedelmi készítménnyel kezelt tenyészővizet (pozitív kontroll) használtam. Meghatároztam a vegetatív Bti-sejtek toxicitását és tanulmányoztam a különböző fejlődési stádiumú szúnyoglárvák ellenálló képességét. A negatív kontrollok esetében a pusztulás minimális volt 1-2%, a kontrollok grafikonjait nem tüntettem fel a diagramokon.

A biológiai teszthez a vizek szennyezettségének kimutatására használt *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) tesztet vettem alapul (ISO 6341:1996) (MSZ: EN ISO 6341, 1998). A biológiai teszt során közegként a szúnyoglárvák tenyészőhelyének vizét használtam, így nem kellett beállítani a közeg pH-értékét, keménységét és oxigén koncentrációját. A légkör és a közeg 22°C-os, és toxikus gőzöktől mentes volt. Ennek igazolására negatív kontrollként a szúnyoglárvák tenyészőhelyének kezeletlen vizét használtam. A teszt során az állatokat nem szabad etetni. A tesztet két lépésben végeztem, a két lépés között csak a Bti-tartalom növelésének léptékében volt különbség. Az előtesztben a főteszt során meghatározott hígítású tartományt tanulmányoztam.

A kezdeti hatásos gátló koncentráció (24-EC50) értékét matematikai módszerrel számítottam ki az 50%-os mobilitásgátláshoz tartozó Bti-spóraszám

meghatározásával. Az eredmények akkor tekinthetők érvényesnek, ha a negatív kontrollban mért százalékos immobilizáció legfeljebb 10%. A szúnyoggyérítésnél használt spórás Bti-készítményekkel szemben elvárás a 99-100% -os toxicitás a csípőszúnyog lárvákkal szemben. Kísérleteimben az 50%-os kezdő toxicitási értéket határoztam meg, mert az 50%-os toxicitás pontos ismereteket ad a tanulmányozott spórás Bti-készítményekről. A legkisebb hatásos gátló koncentráció (24-EC100) értéke 100%-os immobilitást okoz a tanulmányozott tesztállatoknál. Megfigyeléseim szerint ez az érték a 24-EC50 érték kétszerese volt. Egyidejűleg meghatároztam a kereskedelemben használatos VECTOBAC 12 AS készítmény 50%-os toxicitását is. Mérési eredményeimből következtethettem a tanulmányozott spórás Bti-készítmények 100%-os toxicitást előidéző mennyiségére is.

A tesztek során 200ml-es főzőpoharakba növekvő mennyiségű spórás Bti-szuszpenziót töltöttem, és hozzáadtam kb. 75-80ml tenyészőhely vizet. Ezt követően belehelyeztem 30-75db 3.lárvaállapotú *Aedes vexans* szúnyoglárvát, és a pohár végtérfogatát tenyészőhely vízzel 100ml –re egészítettem ki. Ügyeltem arra, hogy a főzőpoharankénti egyedsűrűség ne haladja meg az egyedenkénti 2ml tenyészővíz értéket. A 24 órás tesztidőtartam lejártával minden edényben megszámoltam a mozgásképtelen tesztegységeket és kiszámítottam a kiindulási egyedszámhoz viszonyított százalékos immobilizációt. A kapott értékeket ábrázoltam a spóraszámhoz tartozó mobilitásgátlás koordináta-rendszerében.

Az *Aedes vexans* lárvák toxicitástesztjének közege a lárvák gyűjtésének időpontjában gyűjtött tenyészőhely vize volt (Klebersberg telep - gyálaréti-holtág).

A *Daphnia magna* egyedek toxicitásteszt-közegének az összetétele megtalálható a (MSZ: EN ISO 6341, 1998) Magyar Szabvány leírásában.

A individuális meghatározás céljából módosítottam az alkalmazott toxicitástesztet. A vizsgált tesztállatok egyedeit és a Bti-spóra készítmény tartalmú tenyészővíz 2,5ml térfogatú aliquotját, 24 lyukú szövettenyésző lemez 3ml térfogatú üregébe helyeztem. Ezzel a módszerrel a főzőpohár valamennyi egyedének mozgékonyágát gyorsan tudtam detektálni. Az individuális megfigyelést meghatározó módszert párhuzamosan végeztem a főzőpohárban végzett megfigyelésekkel. A különböző módszerekkel kapott eredmények azonosak voltak. Az individuális megfigyelés módszere főleg a fiatal egyedeknél könnyítette meg a toxicitás detektálását.

3.3.1 Az *Aedes vexans* csípőszúnyog-lárvák toxicitásának meghatározása

A biológiai toxicitásteszt módszerének leírását a 3.3. pont alatt ismertettem. A tanulmányozott spórás Bti-készítmények toxicitásának meghatározásához a 3.3.1. pont alpontjai esetében tesztállatként 3.lárvaállapotú *Aedes vexans* szúnyoglárvát használtam.

3.3.1.1 Bti-szuszpenziók

A módszer megegyezik a 3.3. pontban leírtakkal. A kidolgozott tápoldatokban fermentált spórás Bti-szuszpenziók toxicitását tanulmányoztam.

3.3.1.2 Bti-flokkulátumok

A módszer megegyezik a 3.3. pont alatt leírtakkal. A vízőldékony-polimerekkel koncentrált spórás Bti-szuszpenziók toxicitását tanulmányoztam.

3.3.1.3 Hordozókhoz kötött Bti-készítmények

A módszer megegyezik a 3.3. pont alatt leírtakkal. A tanulmányozott hordozók felületére szorbeált spórás Bti-szuszpenziók toxicitását tanulmányoztam. A tanulmányozott hordozók Bti-spórákat tartalmazó mennyiségeit 100cm magasról adagoltam a szúnyoglárvákat tartalmazó 1000ml térfogatú tenyésztővízbe.

3.3.1.4 Különböző fejlődési stádiumú lárvák

A rovarok osztályába (Insecta) és kétszárnyúak rendjébe (Diptera) tartozó csípőszúnyogok teljes átalakulással fejlődnek (pete, lárva, báb és imagó). Csak lárvaállapotukban nőnek, mialatt négy lárvaállapotot különböztetünk meg. A különböző életkorú lárvák Bti-spórákkal szembeni érzékenységét tanulmányoztam.

A módszer megegyezik a 3.3. pontnál leírtakkal. A teszt során a különböző lárvaállapotú *Aedes vexans* csípőszúnyog-lárvák Bti-spórákkal szembeni toxicitását határoztam meg, és hasonlítottam össze.

3.3.2 A *Daphnia magna* Straus egyedek toxicitásának meghatározása

A biológiai toxicitásteszt módszerének leírását a 3.3. pont alatt ismertettem. A spórás Bti-készítmények vizsgálatához a 3.3.1. pont alpontjai esetében tesztállatként 24 órás *Daphnia magna* Straus egyedeket használtam (MSZ: EN ISO 6341, 1998).

A T_{20} -tápoldatban fermentált T_{20Bti} -szuszpenzió 1000ml mennyiségét centrifugálással (Gyrotory, 30perc, 4000rpm) koncentráltam, majd az üledéket 10ml PBS fiziológiás sóoldatban oldottam fel. Az így kapott Bti-spóra szuszpenzió $4,1 \cdot 10^9$ n/ml élő spóraszámú volt. A Bti-spóra szuszpenzió töményítését azért végeztem el, mert nem akartam a *Daphnia magna* egyedek tenyésztővizének összetételét jelentős mértékben megváltoztatni a T_{20} -tápoldat komponenseivel.

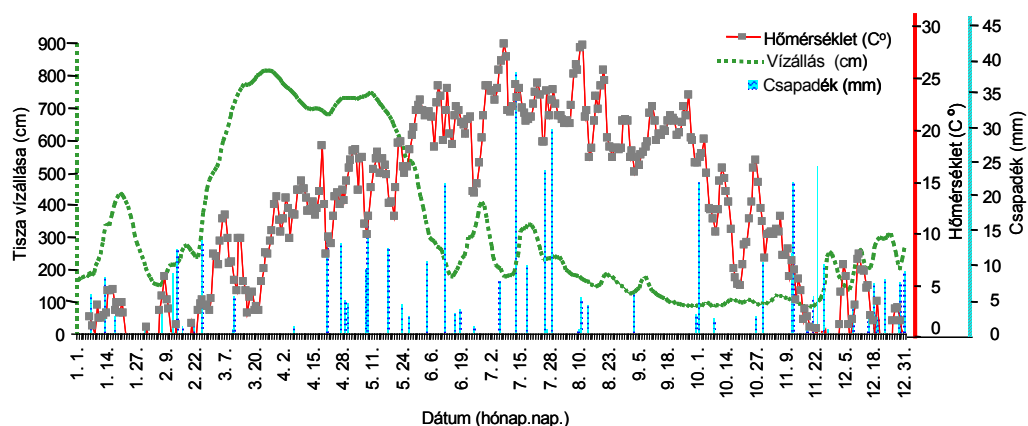
4 EREDMÉNYEK

4.1 A csípőszúnyogok megjelenésének tanulmányozása

Tisza vízállása: A Tisza folyó a Kárpátokban ered. Miután leereszkedik a Kárpát-medencébe, tipikus alföldi folyóvá válik. Az év során a vízszintnek általában két maximuma és két minimuma van. A szúnyogok megjelenése szempontjából az első maximum az érdekes, amely áprilisban következik be, a Kárpátokban olvadó hó eredményeképpen. Az 1999. évi vízállásadatokat mutatja a 12. ábra. A Tisza vízállása nincs korrelációban a szúnyogok egyedszámával, de a tavaszi árhullám levonulása egybeesik a hőmérsékletnek a szükséges szint felé emelkedésével, s így az árhullám levonulása után az ártér mélyedéseiben visszamaradt pocsolyákban kedvező körülmények között megindul az Aëdes szúnyoglárva egyedfejlődése (13. ábra).

Hőmérséklet: Az év során május elejétől október végéig éri el a hőmérséklet a szúnyoglárva egyedfejlődéséhez szükséges értéket. (12. ábra) Május elején erősek az éjszakai lehülések, de a meleg nappalok hatására felpattannak az előző évek során az ártérre lerakott Aëdes szúnyogpeték. A Culex genus imágói csak az éjszakai lehülések megszűnte után, június közepe táján rakják le a vízfelszínre petetutajaikat (13. ábra).

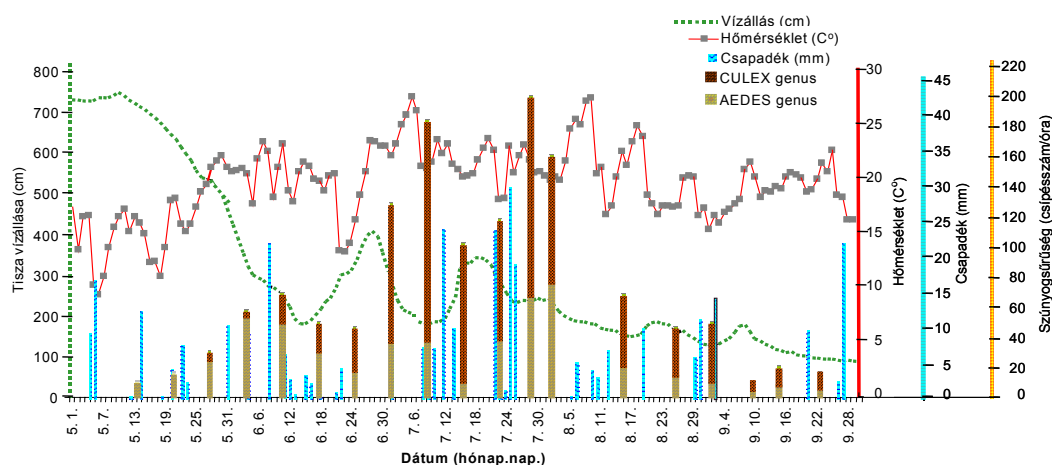
Csapadék: Nyáron a csapadék hatására kialakult időszakos tenyészőhelyek (pocsolyák, csónakok, esővizes hordók, kerti tavak) szolgálnak a szúnyogok tenyészővizeiként. Az időszakos nyári vizek a többgenerációs szúnyogfajok fejlődésének kedveznek.



12. ábra: A Tisza vízállása (cm), a napi középhőmérséklet (°C), és a napi csapadék viszonyok (mm) változásai Szegeden /1999-es adatok/ (Tisza vízállás adatok – Alsó-Tisza Vidéki Vízügyi Igazgatóság; hőmérséklet és csapadék adatok – Országos Meteorológiai Szolgálat)

4.1.1 A Szeged környéki csípőszúnyog együttes tanulmányozása

Májustól október végéig voltak megfelelőek a hőmérsékleti értékek a szúnyogok egyedfejlődéséhez. A szúnyogegyüttesek tanulmányozása májustól szeptember végéig történt (13. ábra). A szúnyogszezon az Aedes genus képviselőinek megjelenésével kezdődik május közepén, május végén-június elején csatlakoznak hozzájuk a Culex genus egyedei, majd a szúnyogszezon szeptember végén ér véget a Culex szúnyogok dominanciájával. Kevés számban az Aedes szúnyogok októberben is megtalálhatók, a Culex genus egyedei pedig imágó alakban telelnek.



13. ábra: Szegeden az 1999. évben a Tisza vízállása (cm), a napi középhőmérséklet (°C) és a napi csapadék viszonyok (mm) változásai a szúnyogszezon folyamán (május-szeptember), valamint a szúnyogsűrűség mintavételek időpontjaiban mért értékeinek (csípésszám/óra) ábrázolása. (Tisza vízállás adatok – Alsó-Tisza Vidéki Vízügyi Igazgatóság; hőmérséklet és csapadék adatok – Országos Meteorológiai Szolgálat)

A szúnyogszezonban az Aedes genus (árvízi szúnyogok) képviselőinek megjelenése csúsztatott korrelációban van (kb. 10 napos csúszás) a Tisza-folyó árhullámaival (13. ábra). A Culex genus (házi vagy dalos szúnyogok) egyedeinek dominanciája növekszik a nyár folyamán. Egyedfejlődésük nem függ a Tisza-folyó árhullámaitól.

4.1.2 Éves változás a csípőszúnyog együttes összetételében

Tavasszal az Aedes genus egyedeinek megjelenésével kezdődik el a szúnyogszezon. A migráció az Aedes fajok esetében lehetővé teszi a bevándorlást más élőhelyekről a kémiai kezeléseket követően. A tavaszi áradás után nedves időszak volt jellemző a Tisza-folyó mentén (13. ábra).

A *Culex* genus egyedei csak június végén jelennek meg, és dominanciájuk egyre kifejezettebbé válik a száraz nyár folyamán. A *Theobaldia* és *Anopheles* genusok egyedei csak csekély mennyiségben fordulnak elő a szegedi szúnyoggyűttesben.

A Tisza-folyó tavaszi árhullámának levonulása általában egybeesik a napi középhőmérsékleti érték emelkedésével. Az ártérre jellemző szúnyoggyűttes összetétele fajszegény. A Tisza-folyótól távolabb érvényesülnek a közvetlen helyi adottságok, és változatos szúnyoggyűttest produkálnak. Ezeken a területeken jelen voltak az *Aedes vexans* mellett az ártéri erdőket kedvelő *Aedes sticticus*, *Aedes annulipes*, *Aedes cantans* és a szikes területeket kedvelő *Aedes dorsalis* egyedek is (II. táblázat).

II. táblázat: Szegeden a mintavevő helyeken humán csapdázással gyűjtött csípőszúnyogok (egyed/óra) /1999 –es összesített adat/

Sz.	Mintavevő helyek	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	Összes	%
Szúnyog fajok														
(1)	<i>Aedes annulipes</i> Meigen	102	84	-	18	14	264	-	-	36	276	-	794	5.9
(2)	<i>Aedes cantans</i> Meigen	-	30	96	6	12	80	6	-	-	66	36	332	2.4
(3)	<i>Aedes caspius</i> Pallas	30	18	-	-	12	18	-	-	-	-	-	78	0.6
(4)	<i>Aedes cinereus</i> Meigen	66	24	-	-	-	6	-	-	-	-	-	96	0.7
(5)	<i>Aedes dorsalis</i> Meigen	42	18	90	144	90	646	18	-	12	48	54	1162	8.6
(6)	<i>Aedes excrucians</i> Walker	-	-	-	-	6	6	-	6	-	-	-	18	0.13
(7)	<i>Aedes flavescens</i> Müller	-	-	-	18	-	6	-	-	6	-	-	30	0.22
(8)	<i>Aedes rossicus</i> D. G. M.	-	42	42	12	-	-	-	-	-	-	-	96	0.7
(9)	<i>Aedes rusticus</i> Rossi	-	-	-	-	-	6	-	-	-	60	-	66	0.41
(10)	<i>Aedes sticticus</i> Meigen	78	42	162	72	166	226	6	-	66	78	168	1064	7.85
(11)	<i>Aedes vexans</i> Meigen	96	120	552	204	42	84	6	-	72	174	18	1368	10.1
(12)	<i>Culex hortensis</i> Ficalbi	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	12	0.09
(13)	<i>Culex modestus</i> Ficalbi	204	24	18	528	132	260	-	12	90	6	90	1364	10.1
(14)	<i>Culex pipiens molestus</i> Forskal	336	294	66	1386	500	1998	24	48	1260	222	222	6356	46.9
(15)	<i>Theobaldia annulata</i> Schrank	6	18	-	-	12	252	-	-	108	-	-	396	2.9
(16)	<i>Anopheles messae</i> Falleroni	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0.09
(17)	<i>Anopheles hyrcanus</i> Pallas	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	12	0.09
(18)	Nem meghatározott	-	30	36	12	24	82	-	-	60	30	24	298	2.2
Összes		960	756	1062	2412	1010	3934	60	66	1722	960	612	13554	100

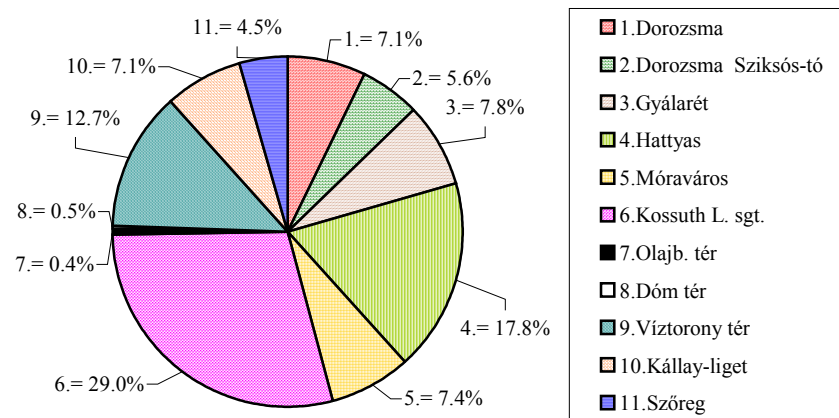
1= Dorozsma; 2 = Dorozsma (Sziksós-tó); 3 = Gyálarét; 4 = Hattyas; 5 = Móraváros;
6 = Kossuth L. sgt.; 7 = Olajbányász tér; 8 = Dóm tér; 9 = Víztorony tér; 10 = Kállay-liget; 11 = Szőreg

Az év folyamán a *Culex pipiens molestus* szinte valamennyi mérőponton uralkodó faj volt, kivéve a 3.(Gyálarét), 10.(Kállay-liget) mérőpontokat. Megfigyelhető, hogy a legnagyobb szúnyogártalom a 6.(Kossuth L. sgt.).-on volt mérhető (3934 egyed/óra), ezt követte 4.(Hattyas) (2412 egyed/óra) és 9.(Újszeged, Víztorony tér) (1722 egyed/óra). A szikes területekre jellemző *Aedes dorsalis* faj valamennyi megfigyelt mérőponton megtalálható volt, jelezve ezzel a terület tenyészővizeinek szikesedésre hajlamos jellegét. Kiemelkedően magas volt a

gyakorisága a 6.(Kossuth L. sgt.) (646 egyed/óra) és 4.(Hattyas) (144 egyed/óra) mérőpontokon. A belvárosi Dóm téren és az Olajbányász téren nagyon kevés szúnyogegyedet gyűjtöttünk. A mérőpontokra jellemző éves egyedszamarányt mutatja a 14. ábra.

Szintén a nyár közepén (június) jelentek meg a *Theobaldia* fajok képviselői kis egyedszámban, de a 6.(Kossuth L. sgt.) (252 egyed/óra) és a 9.(Újszeged, Víztorony tér) (108 egyed/óra) mérőpontokon jelentős mértékben.

Az *Anopheles* genus egyedeiből csak néhány képviselővel jelentek meg a humán csapdázással gyűjtött mintában. Ezek között volt jelen két *Anopheles hyrcanus* Pallas 1771 egyed. Ezt a fajt korábban nem gyűjtötték a Tisza-völgyben, de a legújabb felmérések szerint megtalálható a Tisza-tó szúnyogegyüttesében. (Szabó 2003, személyes információ)



14. ábra: 1999-ben a különböző szegedi mérőpontokon gyűjtött csípőszúnyogok egyedszámainak a gyűjtött összegyedszámhoz viszonyított százalékmegoszlása (%)

4.2 Saját Bti-készítmények előállításának eredményei

A jelentős mértékű szúnyogártalmak a folyók tavaszi és nyári árhullámainak levonulását követően jelentkeznek. A tömegesen megjelenő szúnyogok ellen biológiai és kémiai módszerekkel védekezhetünk hatékonyan. Dolgozatomban a szúnyogegyüttes tanulmányozását követően a szúnyogártalom elleni biológiai védekezés környezetbarát módjával (Bti-módszer) foglalkoztam. A Bti-módszert a 3.fejlődési szakaszú csípőszúnyog lárvák ellen használják eredményesen, ezért szükséges ismerni a csípőszúnyogok életmódját és meghatározni a kezelések időpontját. A csípőszúnyogok 3.stádiumú lárvállapota csak néhány napig tart. Ebben a stádiumban a lárvák méretük alapján már könnyen észrevehetőek, de még elég érzékenyek a Bti-toxinra.

A továbbiakban a Bti-baktérium fermentációjának és spóráképzésének optimalizálását majd a készítmény kiszerezésének és hatékonyságának lehetőségeit tanulmányoztam.

4.2.1 Tápoldatok tanulmányozása

A Bti-baktériumok eltérő hatékonysággal tenyésztethetők a különböző tápoldatokban. A vizsgálatok eredményei az alsó táblázatban:

4.2.1.1 Szintetikus tápoldatok

III. táblázat: Bti-fermentáció élő élő csíraszám ($\cdot 10^5$ n/ml), és spóratartalom (%) értékei szintetikus tápoldatokon (2.2.3.1.1. kísérlet)

tápoldatok	48 órás fermentáció eredménye		96 órás fermentáció eredménye		144 órás fermentáció eredménye	
	Élő csíraszám ($\cdot 10^5$ n/ml)	Sporocitás (%)	Élő csíraszám ($\cdot 10^5$ n/ml)	Sporocitás (%)	Élő csíraszám ($\cdot 10^5$ n/ml)	Sporocitás (%)
Kontroll HL	670	0	690	0	-	9,7
T ₁	0	0	0	0	-	-
T ₂	5,8	0	5,9	0	-	-
T ₃	4,4	0	4,4	0	-	-
T ₄	2,2	0	2,1	0	-	-
T ₅	0	0	0	0	-	-
T ₆	8,7	0	9,1	0	-	-
T ₆₁	6,4	0	9,8	0	-	8,2
T ₆₂	37	0	52	2	-	7,2
T ₆₃	68	0	72	2	-	26
T ₆₃₁	102	2	122	17,3	-	17,6
T ₆₃₂	176	5,9	166	25,7	-	87,2
T ₆₃₃	188	17,2	192	96,1	-	100
T ₆₃₄	118	31,5	130	89,2	-	96,2
T ₇	10,6	0	9,5	0	-	-
T ₇₁	6,8	0	7	0	-	0
T ₇₂	21,7	0	24,2	2,5	-	4,5
T ₇₃	106	0	106	4,8	-	13,7
T ₇₃₁	146	0	124	5,9	-	77,5
T ₇₃₂	184	7,7	196	23,6	-	98,6
T ₇₃₃	246	18,2	262	37,5	-	100
T ₇₃₄	218	21,4	212	35,2	-	100
T ₈	1,8	0	1,8	0	-	-
T ₉	1,1	0	1,3	0	-	-
T ₁₀	0,016	0	0,016	0	-	-
A; kísérlet			C; kísérlet			
B; kísérlet			-		nem volt mérés	

A; kísérlet: Az anyagok és módszerek fejezetben leírt 2.2.3.1.1. A. kísérlet eredményei láthatóak a *III. táblázatban*  jelöléssel. A táblázat adataiból látható, hogy a Bti-mikroba preferálja a szacharóz vagy a laktóz tartalmú tápoldatokat (T₆, T₇) mivel a tanulmányozott tápoldatok közül ezeken bizonyult a legeredményesebbnek a vegetatív baktérium sejtek elszaporodása, közepes mértékben elfogadja a pepton és élesztő kivonat tartalmú (T₂) vagy a csak pepton tartalmú tápoldatokat (T₃), valamint csekély mértékben tenyészthető a glükóz tartalmú tápoldatokban (T₄, T₈, T₉). Az izocukor tartalmú tápoldatban (T₅) nem tenyészthető. Többlet glutamin-aminosav igénye a Bti-baktériumnak nincs. Az optimális eredmény két nagyságrenddel alulmaradt a kontrollként használt laboratóriumi HL-tápoldathoz viszonyítva.

B; kísérlet: Az anyagok és módszerek fejezetben leírt 2.2.3.1.1.B. kísérlet eredményei láthatók a *III. táblázatban*  jelöléssel. A táblázat adatain látható, hogy a laktóz vagy szacharóz tápanyagforráson tenyésztett Bti-fermentátum csíraszama emelkedik a pepton csökkenő tápanyagtartalmával, illetve pepton hozzáadása nélkül fermentálható a Bti-baktérium a legjobban (T₆₃; T₇₃ tápoldatok). A pepton minimalizálása, illetve nélkülvé tétele a tápoldatban megindította a vegetatív Bti-baktériumok spóráképzését. Az optimális növekedés mértéke egy nagyságrenddel alulmaradt a kontrollként használt laboratóriumi húsleves tápoldathoz viszonyítva.

C; kísérlet: Az anyagok és módszerek fejezetben leírt 2.2.3.1.1.C. kísérlet eredményei láthatók a *III. táblázatban*  jelöléssel. A kísérlet során azt tapasztaltam, hogy a szintetikus tápoldat szén és energiaforrásának csökkentésével megnövekszik a tenyésztés hatékonysága és a vegetatív Bti-baktériumok spóráképződésének hatékonysága is. Az optimális szintetikus tápoldat a laktózzal folytatott kísérletsorozatban a T₆₃₃ (élő spóraszám: $1,98 \cdot 10^7$ n/ml; spóratartalom: 100%) tápoldat, míg a szacharózzal folytatott kísérletsorozatban a T₇₃₃ (élő spóraszám: $2,62 \cdot 10^7$ n/ml; spóratartalom: 100%) tápoldat volt. A szintetikus tápoldatokban tenyésztett optimális növekedés mértéke alulmaradt a kontrollként használt laboratóriumi húsleves tápoldathoz viszonyítva, viszont a spóráképzés hatékonysága jóval felülmúlta a kontroll HL-tápoldatnál mért hatékonyságot.

4.2.1.2 Egykomponensű tápoldatok

IV. táblázat: Bti-fermentáció élő csíraszám (*10⁷n/ml) és spóratartalom (%) értékei egykomponensű tápoldatokon (2.2.3.1.2. kísérlet)

tápoldatok	48 órás fermentáció eredménye		96 órás fermentáció eredménye		144 órás fermentáció eredménye	
	Élő csíraszám (*10 ⁷ n/ml)	Sporocitás (%)	Élő csíraszám (*10 ⁷ n/ml)	Sporocitás (%)	Élő csíraszám (*10 ⁷ n/ml)	Sporocitás (%)
Kontroll HL	6,7	0	6,9	0	-	17,7
T ₁₁	14,6	0	14,6	0	-	0
T ₁₂	15,3	0	16	0	-	0
T ₁₃	0,46	0	0,48	0	-	0
T ₁₄	0,76	0	0,76	0	-	0
T ₁₅	0,32	0	0,38	0	-	0
T ₁₆	0,05	0	0,06	0	-	0
T ₁₇	2,75	0	2,75	0,9	-	1,5
T ₁₈	2,2	0	3,1	17,5	-	41,8
T ₁₉	4,5	92,4	4,5	100	-	100
T ₂₀	3,1	96,1	3,1	100	-	100
T ₂₁	1,8	24,6	1,8	58,8	-	66,2
T ₂₂	1,1	12,9	1,1	17,6	-	44,2
T ₂₃	0,8	7,9	0,8	18	-	23
T ₂₄	0,4	11,2	0,44	14,5	-	32,5
-	nem volt mérés					

Az egykomponensű tápoldatokon végzett fermentációk eredményei láthatók a IV. Táblázatban. A Bti-baktérium vegetatív alakjainak tenyésztetősége optimális a tej tápoldatban (T₁₁). A tej, mint tápoldat nagy mennyiségben tartalmaz a Bti-baktériumok tenyésztéséhez szükséges tápanyagokat, de benne a hozzáadott spóráképzést elősegítő kétvegyértékű ionokat tartalmazó mikroelem oldat se növelte a spóratartalmat (T₁₂).

A permeát a magas cukortartalma miatt a sajtgártás veszélyes melléktermékének minősül. Ha megfelelő tápoldatnak bizonyul a Bti-baktérium tenyésztéséhez, a további felhasználása összefonódna a biológiai szűnyoggyérítéssel. A permeát tartalmú tápoldatokban történő fermentáció azonban csekély szaporodást eredményezett a Bti-mikrobák esetében (T₁₃). A permeát tartalmú tápoldat kiegészítése a Bti-bioszintézishez szükséges komponensekkel nem növelte számottevően a tápoldat (T₁₄) jóságát. A vegetatív Bti-baktériumok nem képeztek spórát egyik permeát tartalmú tápoldatban se. A spórák baktériumok spóráképzését elősegítő kétvegyértékű-ionokat tartalmazó mikroelem oldat hozzáadása a tápoldathoz nem eredményezett spóráképzést (T₁₅).

A húsliszttel folytatott kísérletek során a natív húslisztet tartalmazó tápoldatban csekély növekedést ért el a Bti-baktérium (T_{16}). Ezt az eredményt nagymértékben lehetett fokozni bioszintézishez szükséges szerves komponensek hozzáadásával (T_{17}). Az eddigi húsliszt tartalmú tápoldatok (T_{16-17}) esetében a vegetatív Bti-baktérium spóráképzése eredménytelen volt. A T_{17} -tápoldat kiegészítése spóráképzést elősegítő mikroelem oldattal (T_{18}) indukálta a spóráképződést, azonban a fermentálás hatodik napján elért 41,8%-os hatékonyság nem lehet a nagyüzemi Bti-spóra gyártásának az alapja.

A natív húslé (T_{19}) és a csontlé (T_{20}) alapú tápoldatok hatékonynak bizonyultak, mind a vegetatív Bti-baktériumok tenyésztése, mind spóráképzése szempontjából. A 48 órás fermentáció szinte már csak spórákat tartalmazott, a 96. órában pedig valamennyi esetben spórák Bti-szuszpenziót találtam. Gazdaságosság szempontjából a T_{20} -tápoldat alkalmazása kedvezőbb. A T_{20} -tápoldatban a Bti- spórák képződéséhez már a 28°C hőmérséklet elegendő volt. A peptonnal dúsított T_{19} - és T_{20} -tápoldatokban (T_{21} , T_{22}) a keletkezett Bti-sejtszám nem volt magasabb, de a spóratartalom indexe az adalékokkal feldúsított tápoldatokban nagymértékben csökkent. A spóráképzést elősegítő kétvegyértékű-ionokat tartalmazó mikroelem oldat hozzáadása a T_{21} - és T_{22} -tápoldatokhoz nem növelte a spóratartalom-indexet (T_{23} , T_{24}).

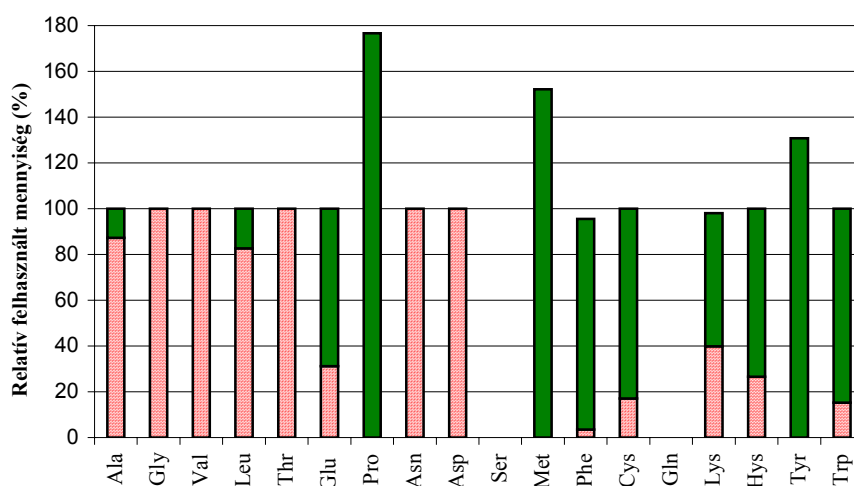
4.2.2 Az optimális tápoldat kiválasztása és a fermentáció további tanulmányozása

A 3.2.1. pont alatti eredmények alapján a T_{20} -tápoldat bizonyult optimálisnak a 2.2.3.1. kísérletek közül a Bti-baktériumok spóra alakjainak nagyüzemi fermentálására. A fermentáció során $3-5 \cdot 10^7$ n/ml élő spóraszámú Bti-mikroba benne, melynek a 100%-a rövid időn belül (48-96 óra) spontán endotoxin tartalmú, toxikus spórákká alakul. Az inkubáció alacsony hőmérsékleten is végbemegy (28°C) és az egykomponensű tápoldatot a fermentáció során a spóráképzés fokozása érdekében nem kell módosítani. Gazdasági szempontból szintén ez a tápoldat bizonyult a legkevesebb költséggel előállíthatónak a tanulmányozottak közül, az előállításához szükséges alapanyag költsége kevesebb, mint 4 Ft/liter (2003. évi adat).

4.2.2.1 A Bti-fermentációja és spóráképzése során felhasznált aminosavak

V. táblázat: HL-tápoldat esszenciális aminosav összetétele (mg/l) a 0, 24 és 240 órás Bti-fermentáció időpontjában

Aminosav	0 órás fermentlé (mg/l)	24 órás fermentlé (mg/l)	240 órás fermentlé (mg/l)
Ala	77,443	9,867	0
Gly	45,947	0	0
Val	85,039	0	0
Leu	188,111	32,51	0
Thr	61,762	0	0
Glu	452,126	311,098	0
Pro	46,659	82,426	0
Asn	24,34	0	0
Asp	31,569	0	0
Ser	0	0	0
Met	33,325	50,7	0
Phe	109,96	106,138	4,798
Cys	14,574	12,078	0
Gln	0	0	0
Lys	238,349	143,48	4,835
Hys	133,195	97,854	0
Tyr	22,544	29,4	0
Trp	22,277	18,892	0

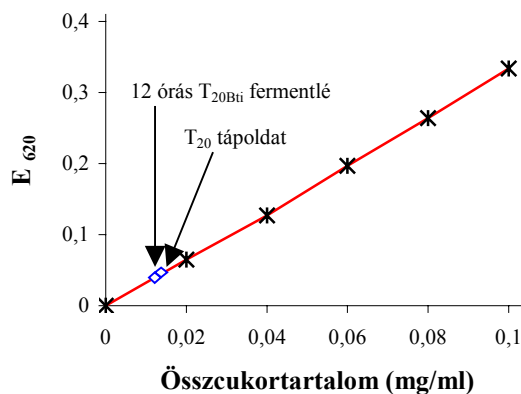


15. ábra: A HL-tápoldatban fermentált Bti-sejtek szabad aminosav felhasználásának minőségi és mennyiségi tanulmányozása a kiindulási aminosav összetartalomhoz viszonyítva. A piros pontok a vegetatív Bti-sejtek (24 órás fermentáció), a zöld szín a spórák Bti-sejtek (240 órás fermentáció) aminosav felhasználását mutatják

A steril HL-tápoldatban 16 esszenciális aminosav található (*V. táblázat*). A fermentáció kezdetén a Bti-baktériumok vegetatív alakjainak szaporodásához a legkönnyebben felhasználható (átalakítható) esszenciális aminosavakat használták fel. Az eredményekből azt tapasztaltuk, hogy a prolin (Pro), metionin (Met) és tirozin (Tyr) aminosavakat csak a spóráképződés fázisában használta fel a Bti-baktérium.

A Bti-baktériumok 240 órás fermentációjuk során csaknem minden esszenciális aminosavat teljesen felhasználnak (*15. ábra*). A vegetatív Bti-alakok elszaporodásuk szakaszában a glicin (Gly), valin (Val), treonin (Thr), aszparagin (Asn) és aszparaginsav (Asp) aminosavakat teljesen felélik, majd a preferált aminosavak elfogyását követően a spóráképződés fázisában a Phenilalanin (95,6%) és a Lysin (98%) kivételével valamennyi esszenciális aminosavat 100%-ban felhasználják anyagcseréjükhöz. A vegetatív fázis folyamán a prolin (Pro), metionin (Met) és a tirozin (Tyr) mennyisége a kiindulási értékeik felé emelkedett. A prolin mennyiségének növekedése bomlási folyamatokra utal.

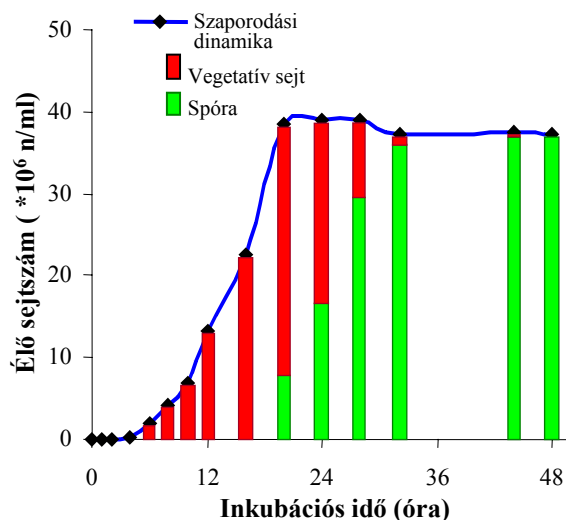
4.2.2.2 A fermentlé összucukortartalom meghatározása



16. ábra: *T₂₀-tápoldat és 12 órás T₂₀Bti-fermentlé összucukor tartalmának meghatározása kalibrációs egyenes segítségével. A grafikon a 620nm-nél mért extinkció értékeknek az összucukortartalomtól való függését ábrázolja*

A T₂₀-tápoldat és a sejtmentes T₂₀Bti-fermentlé összucukor tartalma a mérések alapján egyaránt minimális (*16. ábra*).

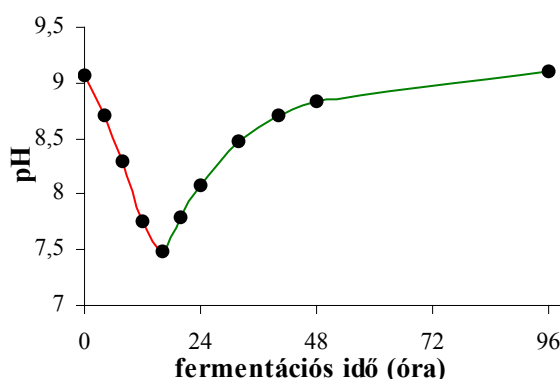
4.2.2.3 A szaporodási dinamika és a spóráképződés a fermentáció során



17. ábra: *T₂₀-tápoldatban fermentált Bti-baktériumok szaporodási dinamikájának az alakulása az inkubációs időtartam függvényében és a mérési időpontokhoz tartozó vegetatív sejt–spóra arány ábrázolása*

A T₂₀-tápoldatban fermentált Bti-baktériumok 20 órás inkubáció során érik el a szaporodásuk maximumát (17. ábra). Ezt követően indul meg a spóráképződés folyamata, ami további 24 óra alatt megy végbe a Bti-szuszpenzióban. A fermentáció kinetikája a tápanyagszegény T₂₀-tápoldatban lassúbb, mint az irodalomban leírt baktérium-fermentációk szaporodásának kinetikái (Vácz, 1988), de rendkívül fontos megjegyezni, hogy a T₂₀-tápoldatban 48 órás inkubációt követően 99,9-100% volt a spóratartalom.

4.2.2.4 A pH-értékváltozás a fermentáció során



18. ábra: *A T_{20Bti}-fermentáció során mért pH-értékváltozások az inkubációs idő függvényében*

A T₂₀-tápoldat kezdeti pH-értéke lúgos kémhatású (pH=9,06) (18. ábra). A vegetatív Bti-sejtek képződésének fázisában a tápoldat pH-értéke a semleges érték felé tolódik el (pH=7,5), majd a spóráképződés szakaszában ismét erősen lúgossá válik (pH=9,11).

4.2.3 Vízoldékony-polimerekkel történő flokkuláció tanulmányozása

Az előkísérletekben ismertettem egy minden szempontból optimális tápoldat összetételét a Bti-baktériumspórák elszaporítására. Az előállítás folyamán azonban szükséges koncentrálni a Bti-spórákat, hogy alkalmazás során ne kelljen sok vizet szállítani. A fermentátum töményítésére polielektrolit-oldatokkal történő flokkulációs eljárást alkalmaztunk.

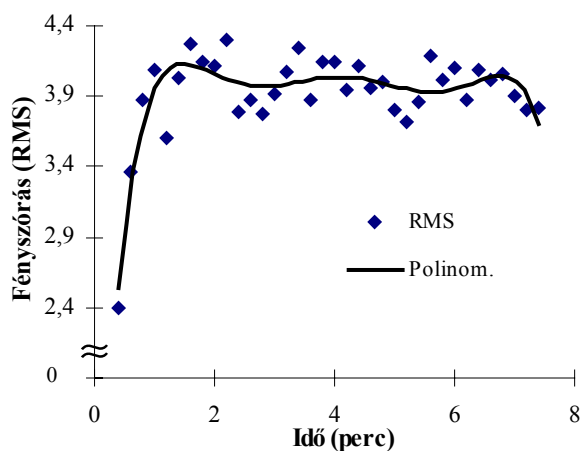
4.2.3.1 Alkalmazott vízoldékony-polimerek töltésének meghatározása

VI. táblázat: A polimeroldatok töltésének meghatározása és a flokkulumképzés hatékonyságának sorrendje

polimeroldatok	Kationos tenzidoldattal kiváltott kicsapódás hatékonyságának sorrendje	Anionos tenzidoldattal kiváltott kicsapódás hatékonyságának sorrendje	Töltés-jelleg	képződött flokkulum jellemzése
Greenfloc	8	-	anionos	csekély kiválás, ülepedés nélkül
Rhodopol	5	-	anionos	laza, nem ülepedő flokkulum
Magnafloc 156	6	-	anionos	laza, nem ülepedő flokkulum
Magnafloc 351	8	-	anionos	csekély kiválás, ülepedés nélkül
Magnafloc 1011	4	-	anionos	laza, nem ülepedő flokkulum
SNFH 57	2	-	anionos	tömörebb, nem ülepedő flokkulum
SNFH 69	3	-	anionos	laza, nem ülepedő flokkulum
SNFH 108	7	-	anionos	csekély kiválás, ülepedés nélkül
SNFH 149	1	-	anionos	tömörebb, nem ülepedő flokkulum
SNFH 420	8	-	anionos	csekély kiválás, ülepedés nélkül
SNFH 528	-	1	kationos	tömörebb, nem ülepedő flokkulum

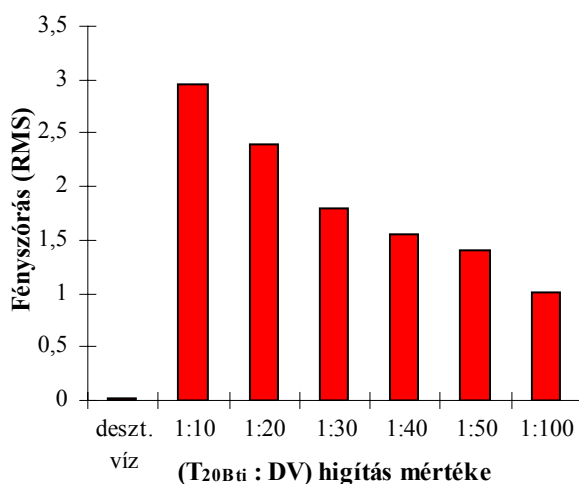
A tanulmányozott polimeroldatok közül az SNFH528 jelzésű kationos jellegűnek, a többi anionos jellegűnek bizonyult (VI. táblázat). Az anionos jellegű polimeroldatok közül vizuális megfigyelés alapján hatékonyak voltak a SNFH57 és a SNFH149 jelzésűek, mert titrálásuk során tömörebb, flokkulumok képződtek. A továbbiakban a flokkulációs vizsgálatokat a SNFH528 jelzésű kationos, valamint a SNFH57 és a SNFH149 jelzésű anionos polimeroldatokkal valósítottuk meg. Az anionos jellegű polimeroldatok hígított Bti-spóra szuszpenzióra gyakorolt flokkulációjánál tanulmányoztuk a Magnafloc351 és a Magnafloc1011 jelzésűeket is.

4.2.3.2 A flokkuláció kinetikája



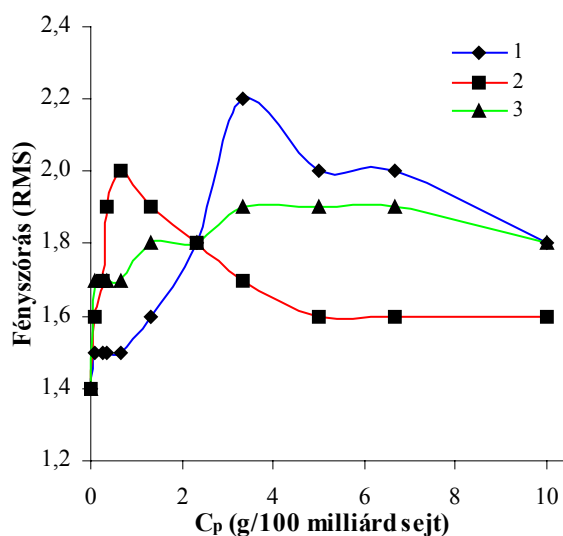
19. ábra: Hígított (1:20) Bti-spóra szuszpenzió flokkulációjának kinetikája 10g/100milliárd spóra SNFH528 polimer jelenlétében. A flokkulációt 0,1% polimeroldattal valósítottuk meg

A flokkuláció mértéke a polimeroldat hozzáadása utáni 1-7 percen nagyjából állandó értéket mutat, csak ezután kezd csökkenni az RMS értéke, ami a nagyméretű flokkulumok (szabad szemmel is látható) kiüledésével magyarázható (19. ábra). Az állandó RMS értékkel jellemezhető tartományban az aggregátumok (flokkulumok) elérik maximális nagyságukat, amely nyilvánvalóan a keverés intenzitásának és a flokkulumok stabilitásának, szilárdságának függvénye. A 0 és 1 perc közötti tartományban a RMS értéke rohamosan nő.



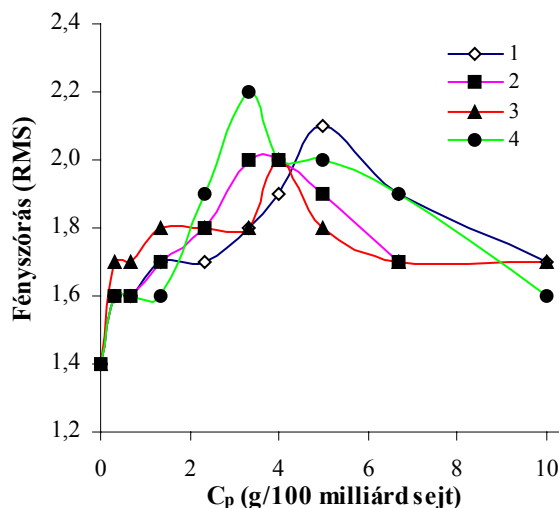
20. ábra: Hígított Bti-spóra szuszpenziók alapzavarosságának fényszórásmérése (RMS)

A töményebb oldat alapzavarossága elég nagy és a hígítással csökken, ezért a flokkuláns-hozzáadás következtében fellépő aggregáció növekedése nem mérhető elég széles tartományban (20. ábra). Az alap-koncentráció $1,5 \cdot 10^7$ n/ml volt, így a mérések többségét 1:50 hígítású $3 \cdot 10^5$ n/ml szuszpenziókkal végeztük, melyekben jól mérhető az alapzavarosság és a polimer által kiváltott effektusok is. Az is megfigyelhető, hogy a tápoldat koncentráció és az RMS értékek között nincs lineáris összefüggés, ami a (polimert nem tartalmazó) töményebb sejtsuszpenzióban fellépő aggregálódással hozható összefüggésbe.



21. ábra: 50* hígítású Bti-spóra szuszpenzió flokkulációja 0,01% kationos polimeroldatokkal. A grafikonok a szuszpenzió RMS értékeinek a bevitt polimerek mennyiségeitől való függését ábrázolják. A diagram jelmagyarázata az alábbi kationos polimeroldatokat jelöli: SNFH528 (1), PERCOL1697 (2) és DS (3)

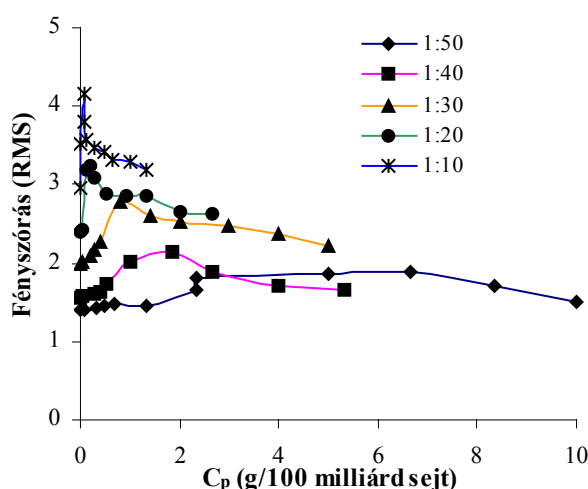
Az 50* hígítású, azaz $3 \cdot 10^5$ n/ml spóraszámú Bti-suszpenzió SNFH528, Percol 1697 és DS jelzésű kationos polielektrolitok 0,01%-os oldata adagolásával megvalósított flokkuláltatás eredménye figyelhető meg a 21. ábrán. Látható, hogy a hozzáadott vegyszer mennyiségének növelésével az aggregáció mértéke először növekszik, majd csökken, azaz a híg diszperziókra jellemző klasszikus viselkedés figyelhető meg, vagyis kis koncentrációknál a nagy molekulatömegű flokkuláns érzékenyítő, jelentős mennyiségekben pedig stabilizáló hatást fejt ki. A flokkuláció mértékével arányos maximális RMS értékek néhány $g/10^{11}$ spóra polimer koncentrációknál figyelhetők meg.



22. ábra: Hígított (1:50) Bti-spóra szuszpenzió flokkulációja 0,01% anionos polimeroldatokkal. A grafikonok a szuszpenzió RMS értékeinek a bevitt polimerek mennyiségeitől való függését ábrázolják. A diagram jelmagyarázata az alábbi anionos polimeroldatokat jelöli: Magnaflor1011 (1), Magnaflor351 (2), SNFH57 (3) és SNFH149 (4)

A tanulmányozott négy anionos polimeroldat (SNFH149, SNFH57, Magnaflor351 és Magnaflor1011 jelzésű) közül az SNFH149 jelzésű polielektrolit-oldat bizonyult a leghatékonyabbnak, mert a legkevesebb mennyisége okozott nagy flokkulációs hatást, meglehetősen széles polimer koncentráció-tartományban (22. ábra).

4.2.3.3 A Bti-szuszpénzió koncentrációjának a hatása



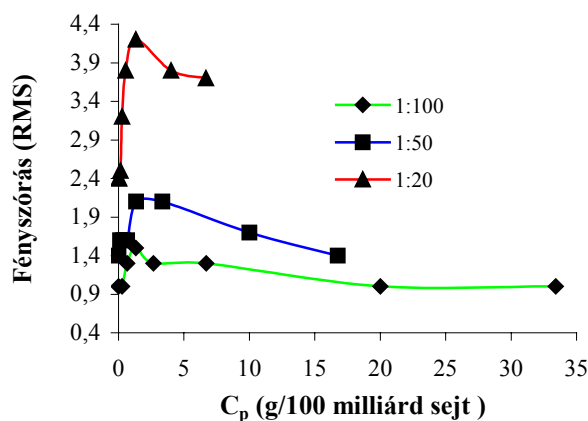
23. ábra: Különböző hígítású Bti-spóra szuszpenziók flokkulációja 0,01% SNFH kationos polimeroldattal. A grafikonok a szuszpenzió RMS értékeinek a bevitt polimer mennyiségeitől való függését ábrázolják. A diagram jelmagyarázata a Bti-szuszpénzió hígításának mértékét mutatja (T_{20Bti} : víz)

A töményebb szuszpenziók maximális flokkulációjához kevesebb polimer szükséges és ez a kevesebb polimer nagyobb mértékű (nagyobb RMS értékkel jellemezhető) aggregációt vált ki (23. ábra). A sejtszám csökkenésével a flokkuláció mértéke csökken, de a destabilizációs zóna kiszélesedik.

VII. táblázat: *Különböző töménységű spórás Bti-szuszpensiók maximális flokkulációját kiváltó optimális kationos SNFH528 polimer mennyiségek*

Hígítás	Sejtszám (n/50ml)	Optimális polimer tartalom (mg/50ml)	Maximális előidéző mennyiség (g/100milliárd sejt)	flokkulációt polimer-
50*	$1,50 \cdot 10^7$	1	6,7	
40*	$1,87 \cdot 10^7$	0,35	1,9	
30*	$2,50 \cdot 10^7$	0,2	0,8	
20*	$3,75 \cdot 10^7$	0,075	0,2	
10*	$7,50 \cdot 10^7$	0,05	0,07	

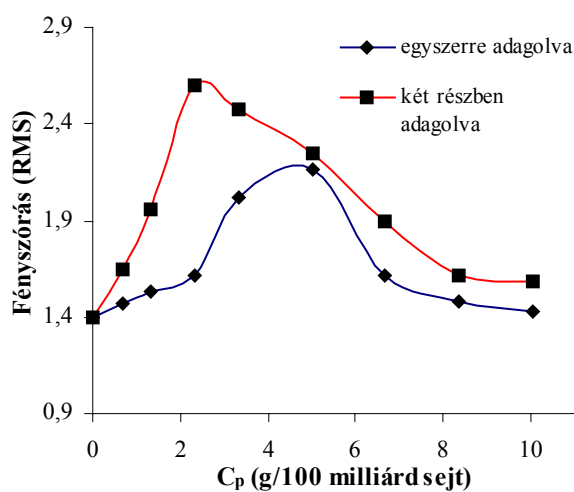
A $1,50 \cdot 10^7$ n/50ml sejtszámú szuszpenziótól a $7,50 \cdot 10^7$ n/50ml sejtszámú szuszpenzióig való átmenet során a optimális flokkulációt kiváltó polielektrolit mennyiség 6,7-0,07g/10¹¹ spóra eléréséig igen jelentősen csökken (VII. táblázat).



24. ábra: *Különböző hígítású Bti-spóra szuszpenzió flokkulációja 0,01% anionos SNFH 57 polimeroldattal. A grafikonok a szuszpenzió RMS értékeinek a bevitt polimer mennyiségeitől való függését ábrázolják. A diagram jelmagyarázata a Bti-szuszpensió hígításának mértékét mutatja (T_{20Bti} : víz)*

Az anionos polimeroldat hígított Bti-szuszpensiókban történő alkalmazásánál hasonló jelenséget tapasztaltunk, mint a kationos polimeroldat esetében (24. ábra).

4.2.3.4 A polimeroldat adagolási módjának a hatása

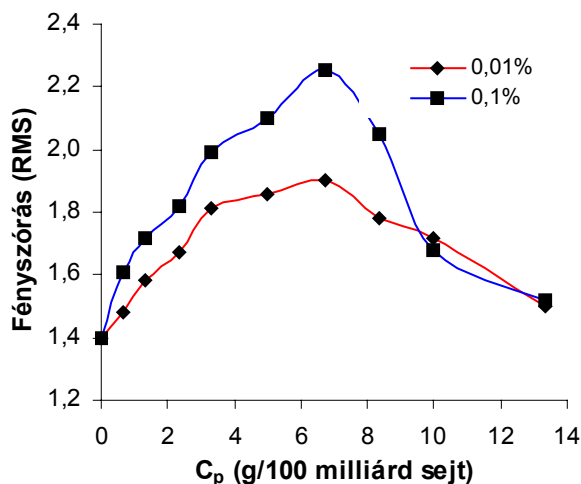


25. ábra: 0,01% kationos SNFH 528 polimeroldat adagolási módjának hatása hígított (1:50) spórás Bti-szuszpenzió flokkulációjának mértékére. A grafikonok a szuszpenzió RMS értékeinek a bevitt polimer mennyiségeitől való függését ábrázolják. A diagram jelmagyarázata a polimeroldat adagolási módját mutatja

Azonos térfogatú kationos polielektrolit-oldat adagolása azonos térfogatú szuszpenziók esetében nagyobb hatást fejt ki, ha a polimeroldatot két részben adjuk a szuszpenzióhoz (25. ábra). Nemcsak a flokkuláció mértéke lett nagyobb, hanem a maximális flokkuláció eléréséhez is kevesebb polimer mennyiség szükséges.

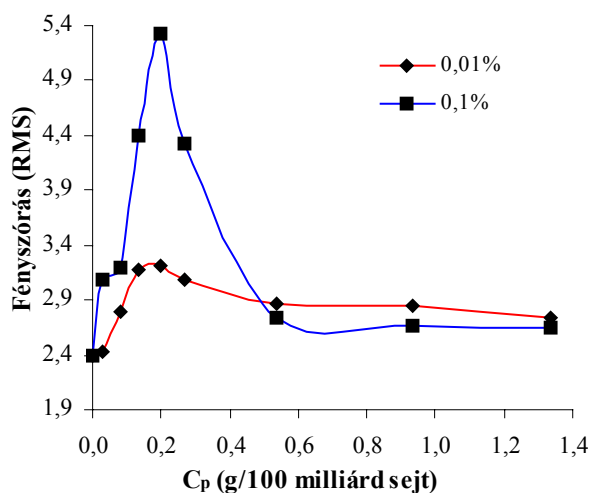
4.2.3.5 A polimeroldat koncentrációjának hatása

A nagyobb koncentrációjú (0,1%-os) polimeroldat adagolása a spórás Bti-szuszpenzióhoz megnövelte a flokkulációs hatást (26. ábra).



26. ábra: 0,01% és 0,1% kationos SNFH528 polimeroldatok flokkuláltató hatása 1:50 hígítású spórás Bti-szuszpenziókban. A grafikonok a szuszpenzió RMS értékeinek a bevitt polimer mennyiségeitől való függését ábrázolják. A diagram jelmagyarázata a polimeroldat koncentrációját mutatja

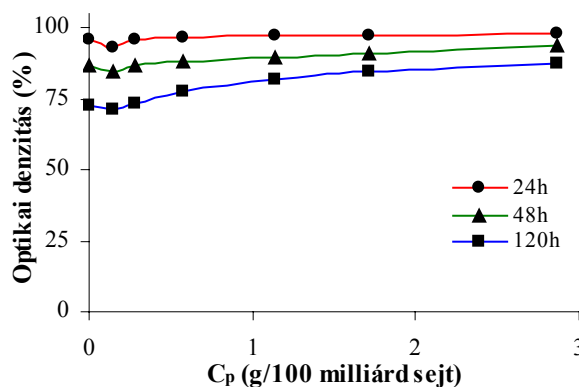
Különösen jelentős a polimeroldat koncentrációjának hatása a töményebb $7,5 \cdot 10^5$ sejt/ml (1:20 hígítású) szuszpenzió esetében (27. ábra).



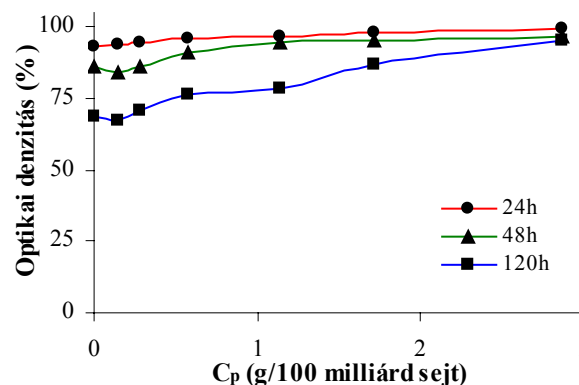
27. ábra: 0,01% és 0,1% kationos SNFH528 polimeroldatok flokkuláltató hatása 1:20 hígítású spórás Bti-szuszpenziókban. A grafikonok a szuszpenzió RMS értékeinek a bevitt polimer mennyiségeitől való függését ábrázolják. A diagram jelmagyarázata a polimeroldat koncentrációját mutatja

4.2.3.6 Tömény Bti-szuszpenzió ülepítése

A polimerekkel kezelt natív (nem-hígított) spóras Bti-szuszpenzióban az aggregátumok percekben belül kialakulnak, de a flokkulált sejtek hatékony ülepedése néhány napot igényel.



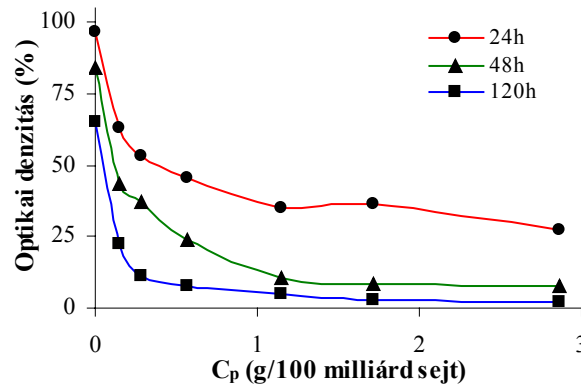
28. ábra: A natív Bti-spóra szuszpenzió 24, 48 és 120 órás ülepedési hatékonyságának a hozzáadott 0,1%-os anionos flokkulálószer (SNFH57) mennyiségétől való függése, a felülúszóból vett minta alapján. A spektrofotometriás vizsgálat OD értékeit a kezeletlen minta kiindulási értékének (25ml T_{20Bti} és 10ml desztillált víz) százalékában fejeztem ki.
A kémcsövek 35ml $1 \cdot 10^7$ n/ml spóraszámú Bti-szuszpenziót tartalmaztak



29. ábra: A natív Bti-spóra szuszpenzió 24, 48 és 120 órás ülepedési hatékonyságának a hozzáadott 0,1%-os anionos flokkulálószer (SNFH149) mennyiségétől való függése, a felülúszóból vett minta alapján. A spektrofotometriás vizsgálat OD értékeit a kezeletlen minta kiindulási értékének (25ml T_{20Bti} és 10ml desztillált víz) százalékában fejeztem ki.
A kémcsövek 35ml $1 \cdot 10^7$ n/ml spóraszámú Bti-szuszpenziót tartalmaztak

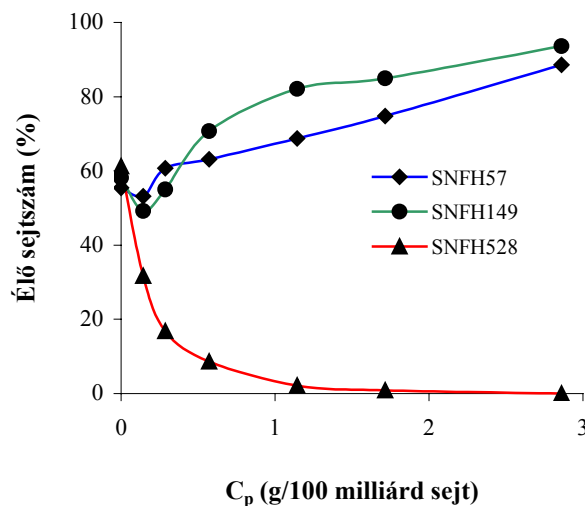
Az anionos polimeroldatok esetében 0,143g/100milliárd sejt mennyiségig csekély mértékben elősegíti, de az anionos polimeroldatok további adagolása gátolja

a gravitáción alapuló spontán ülepedést, vagyis a nagyobb mennyiségű anionos polimeroldatok hatására stabilizálódik a szuszpenzió (28. és 29. ábra).



30. ábra: A natív Bti-spóra szuszpenzió 24, 48 és 120 órás ülepedési hatékonyságának a hozzáadott 0,1%-os kationos flokkulálószer (SNFH528) mennyiségétől való függése, a felülúszóból vett minta alapján. A spektrofotometriás vizsgálat OD értékeit a kezeletlen minta kiindulási értékének (25ml T_{20Bti} és 10ml desztillált víz) százalékában fejeztem ki.
A kémcsövek 35ml $1 \cdot 10^7$ n/ml spóraszámú Bti-szuszpenziót tartalmaztak

A kationos polimeroldat fokozza a gravitáción alapuló spontán ülepedést, vagyis kis mennyiségű kationos polimer is hatékonyan ülepíti a szuszpenziót, és ez a hatás a polimer mennyiségének növelésével fokozódik (30. ábra).



31. ábra: A natív spóras Bti-szuszpenzió 120 órás, élő csíraszámamláláson alapuló ülepedési hatékonyságának meghatározása a hozzáadott 0,1%-os flokkulálószer (SNFH57, SNFH149, SNFH528) mennyiségétől függvényében, a felülúszóból vett minta alapján. A spektrofotometriás vizsgálat OD értékeit a kezeletlen minta kiindulási értékének (25ml T_{20Bti} és 10ml desztillált víz) százalékában fejeztem ki.
A kémcsövek 35ml $1 \cdot 10^7$ n/ml spóraszámú Bti-szuszpenziót tartalmaztak

A 31. ábrán két anionos vízdékony-polimeroldat (SNFH57 és SNFH149) ülepitő hatékonyságát hasonlítottam össze a kationos SNFH528 polimeroldat ülepitési sebességével. Az adatokból látható, hogy az élő csíraszámláláson alapuló tanulmányozással sokkal eredményesebben detektálható a spórás Bti-szuszpenzió ülepedésének hatékonysága a kationos (SNFH528) polimeroldattal. Az ülepedés 2,86g SNFH528 polimer és 100milliárd spórát tartalmazó Bti-szuszpenzió esetében az élő sejtszámlálás módszerével meghatározva 0,01% hatékonyságú.

4.2.4 Hordozók tanulmányozása

A biológiai Bti-alapú spórás készítményt a csípőszúnyog lárvák tenyészővízeibe szükséges eljuttatni. Ezek a vízfelszínek a legtöbb esetben növényzettel borítottak. Egyik lehetséges megoldás, hogy a spórás Bti-szuszpenzió nagy tömegű hordozóhoz rögzítve jut át a növényzeten, és a vízbe jutva a hordozóról leoldódó mikrobák fejtik ki a szúnyoglárvákra toxikus hatásukat.

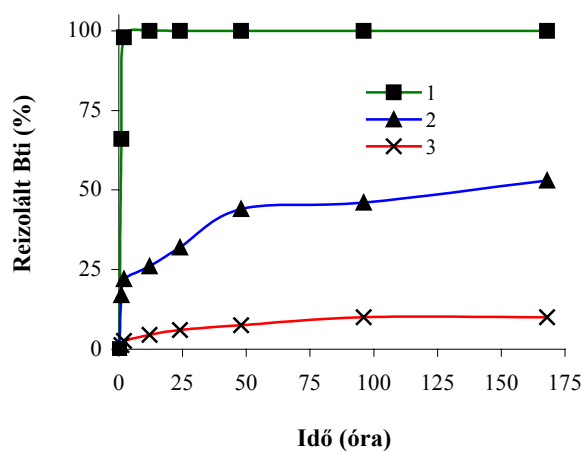
4.2.4.1 Hordozók folyadék megkötő képessége

VIII. táblázat: A tanulmányozott ásványi frakciók nedvesség-tartalma

	természetes zeolit őrlemény	égetett kovaföld őrlemény	szárított kovaföld őrlemény	folyami homok szemcse
légnedves állapot (%)	100	100	100	100
légszáraz állapot (%)	96,07	98,11	94,47	99,59
megkötött víz (%)	3,93	1,89	5,53	0,41

A zeolit, égetett~ és szárított kovaföld szemcsék porózus szerkezetű hordozók. Pórusaik belső felületén jelentős mennyiségű vizet vagy spórás Bti-szuszpenziót képesek megkötni. A folyami homok (Maros) frakció tömör felületű, és viszonylag nagy sűrűségű hordozó. Felületén kisebb mennyiségű víz és Bti-spóra szuszpenzió adszorbeálódik, és valószínűleg onnan könnyebben leoldható és biztosabban eljut a tenyésző víz felületére, mint a porózus szerkezetű hordozók alkalmazása során (VIII. táblázat).

4.2.4.2 Hordozókhoz kötött készítményekből a Bti-spórák kioldódása

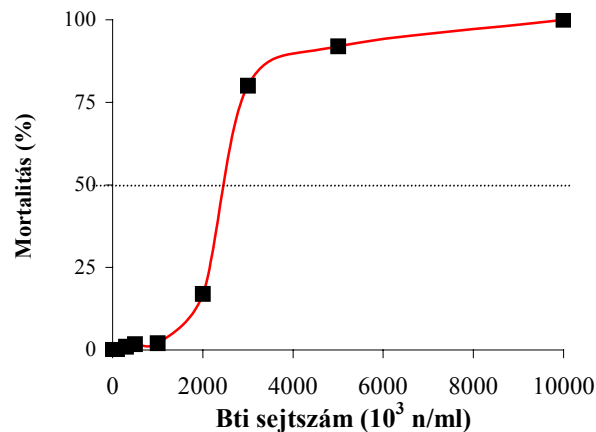


32. ábra: A hordozó részecskékhez kötött Bti-spóra készítményekből extrahálás során kioldódó Bti-spóráknak az expozíciós időtől való függése. A kioldódás hatékonyságát a szorpció előtti összes spórához viszonyítottuk (100%). A diagram jelmagyarázata a készítményeket jelöli: FHT_{20Bti}-H (1), SZKT_{20Bti}-H (2) és ÉKT_{20Bti}-H(3)

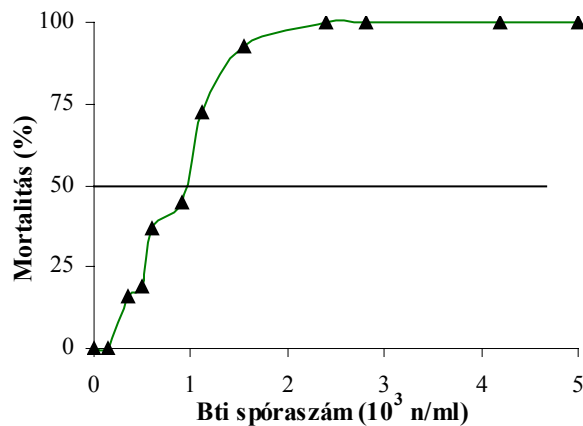
A folyami homok felületére adszorbeált Bti-spóra szuszpenzió (FHT_{20Bti}-H) nagyon gyorsan leoldódott a tömör felületű hordozóról, s nagy mennyiségben jelent meg az oldószerben (1-jelzésű grafikon) (32. ábra). A porózus felületű hordozók pórusaiban abszorbeálódott Bti-spóra szuszpenzió (SZKT_{20Bti}-H, ÉKT_{20Bti}-H) viszont nem oldódott le elegendő mennyiségben desztillált vízzel történő összerázás, majd ülepítés hatására (2- és 3-jelzésű grafikonok).

4.3 Bti-készítmények laboratóriumi biológiai toxicitástesztje

A Bti-spóra készítmények toxicitástesztjei során valamennyi kísérletsorozat esetében kontrollként ellenőriztem a tenyészőhely vizét (negatív kontroll-I.), illetve megvizsgáltam a készítmény előállításánál alkalmazott valamennyi komponens toxicitását (negatív kontroll-II.). A Bti-baktérium nélküli komponensek toxicitása megközelítőleg nulla volt, ezért ezeket az adatokat nem ábrázoltam.



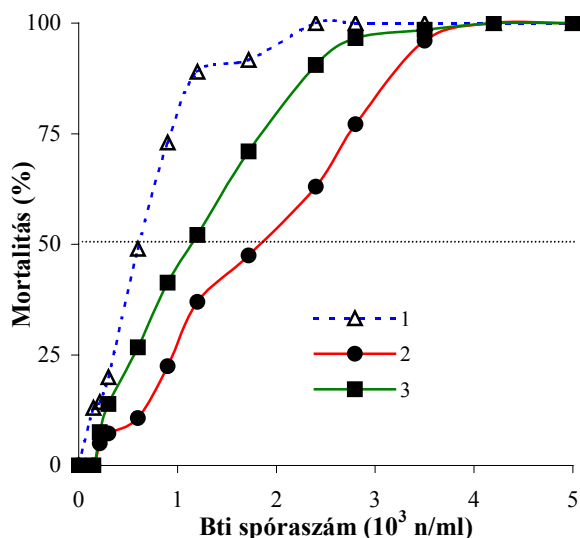
33. ábra: Vegetatív Bti-baktériumok laboratóriumi szúnyoglárva-tesztjének eredménye (24-EC50). A grafikon a 24 órás expozíció alatt elpusztult lárvák összlárvaszámhoz viszonyított százaléktételeinek a vegetatív Bti-sejtszámtól való függését mutatja



34. ábra: Bti-spórák laboratóriumi szúnyoglárva-tesztjének eredménye (24-EC50). A grafikon a 24 órás expozíció alatt elpusztult lárvák összlárvaszámhoz viszonyított százaléktételeinek a Bti-spóraszámtól való függését ábrázolja

A vegetatív Bti-baktériumok is toxikusak a 3.lárvaállapotú *Aedes vexans* csípőszúnyog lárvákra, mint ez megfigyelhető a 33. és 34. ábrákon. A vegetatív baktériumok esetében az 50%-os mobilitásgátlást előidéző Bti-baktérium mennyiség: $EC_{50}=[2523800\text{n/ml}]$. A Bti-spórák esetében ez az érték: $EC_{50}=[940\text{n/ml}]$. A csípőszúnyog lárvák 2600 –szor érzékenyebbek a Bti-spórákra, mint a vegetatív sejtekre.

4.3.1 Szintetikus tápoldatokban fermentált spórás Bti-készítmények

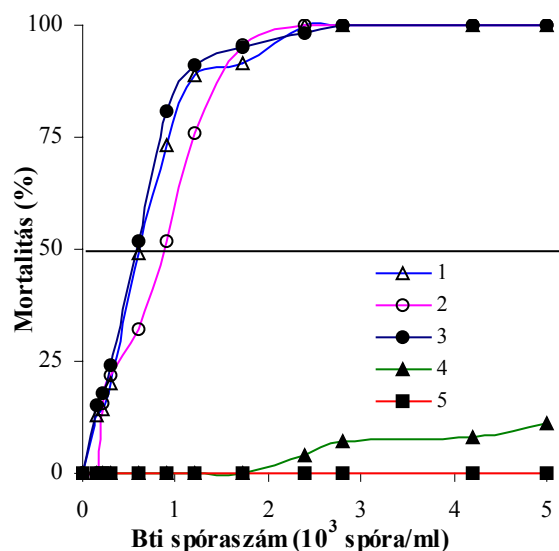


35. ábra: Szintetikus tápoldatokban fermentált spórás Bti-készítmények laboratóriumi szúnyoglárvá-tesztjeinek eredménye (24-EC50). A grafikonok a 24 órás expozíció alatt elpusztult lárvák összlárvaszámhoz viszonyított százaléktételeinek a Bti-spóraszámától való függéseit ábrázolják. Pozitív kontrollként ismert toxicitású (VECTOBAC 12 AS) készítmény volt alkalmazva. A diagram jelmagyarázata: VECTOBAC 12 AS (1), T_{633Bti} (2) és T_{733Bti} (3)

A szintetikus tápoldatokban növesztett T_{635Bti} - és T_{735Bti} -fermentátumok toxicitása alulmarad a kontrollként használt VECTOBAC 12 AS toxicitásától (35. ábra). A tanulmányozott készítmények EC50 toxicitásának értéke: VECTOBAC 12 AS – [613n/ml]; T_{633Bti} – [1830n/ml] és T_{733Bti} – [1140n/ml].

A 1,875g/l szacharóz tartalmú tápoldat hatékonyabbnak bizonyult a 1,875g/l laktóz tartalmú tápoldatnál.

4.3.2 Egykomponensű tápoldatokban fermentált spórás Bti-készítmények



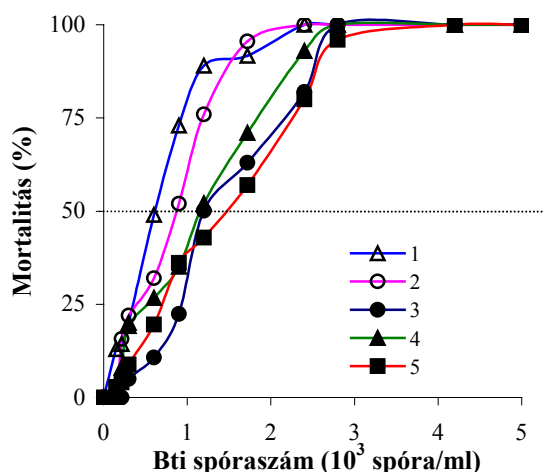
36. ábra: Egykomponensű tápoldatokban fermentált spórás Bti-készítmények laboratóriumi szúnyoglárva-teszti-eredménye (24-EC50). A grafikonok a 24 órás expozíció alatt elpusztult lárvák összlárvaszámhoz viszonyított százaléértékeinek a Bti-spóraszámától való függéseit ábrázolják. Pozitív kontrollként ismert toxicitású (VECTOBAC 12 AS) készítmény volt alkalmazva. A diagram jelmagyarázata: VECTOBAC 12 AS (1), T_{20Bti} (2), T_{19Bti} (3), T_{18Bti} (4) és T_{11Bti} (5)

A csontlé (T_{20}) és húslé (T_{19}) tápoldatokban fermentált Bti-spórák csípőszúnyog-lárva toxicitása megegyezik a kontrollként használt VECTOBAC 12 AS ismert toxicitásával (36. ábra). A vegetatív Bti-baktériumokat tartalmazó (T_{11Bti}) fermentátum a vizsgált koncentrációban nem volt toxikus a csípőszúnyog lárvákra. Csekély mértékben bizonyult toxikusnak a 41,8% spóratartalmú (T_{18Bti}) fermentátum.

A vizsgált készítmények EC50 toxicitásának értéke: VECTOBAC 12 AS -[613n/ml; T_{20Bti} -[870n/ml]; T_{19Bti} -[580n/ml]; T_{18Bti} -[? n/ml] és T_{11Bti} -[? n/ml].

4.3.3 Vízoldékony-polimerekkel ülepített spórás Bti-készítmények

A Bti-baktériumspórák fermentálására az előzetes kísérleteink alapján a T₂₀-tápoldat bizonyult gazdasági szempontból optimálisnak. Kísérletemben a T₂₀-tápoldatban fermentált és polimeroldatokkal sűrített Bti-spóra szuszpenzió csípőszúnyog lárvákra kifejtett toxicitását határoztam meg.



37. ábra: Vízoldékony-polimerekkel ülepített spórás Bti-készítmények laboratóriumi szúnyoglarva-teszti-jeinek eredménye (24-EC₅₀). A grafikonok a 24-órás expozíció alatt elpusztult lárvák összlárvaszámhoz viszonyított százalék-értékeinek a Bti-spóraszámától való függéseit ábrázolják.

Pozitív kontrollként ismert toxicitású kereskedelmi készítményt (VECTOBAC 12 AS), és kezeletlen T_{20Bti}-szuszpenziót is alkalmaztam.

A diagram jelmagyarázata: VECTOBAC 12 AS (1), T_{20Bti} (2), SNFH57+T_{20Bti} (3), SNFH149+T_{20Bti} (4) és SNFH528+T_{20Bti} (5)

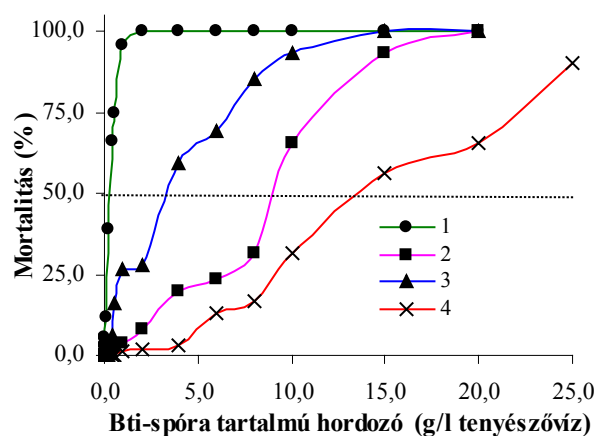
A polimeroldatokkal kezelt T_{20Bti}-szuszpenzió toxicitása csekély mértékben marad el a kezeletlen T_{20Bti}-szuszpenzió, valamint a VECTOBAC 12 AS készítmény toxicitásától (37. ábra). Az ellentétes töltéselőjelű polimerekkel kezelt szuszpenziók toxicitása hasonló.

A tanulmányozott készítmények EC₅₀ toxicitásának értéke:

VECTOBAC 12 AS -[613n/ml]; T_{20Bti} -[870n/ml]; SNFH57+T_{20Bti} -[1200n/ml];

SNFH149+T_{20Bti} -[1170n/ml] és SNFH528+T_{20Bti} -[1460n/ml].

4.3.4 Hordozókhoz kötött spórás Bti-készítmények



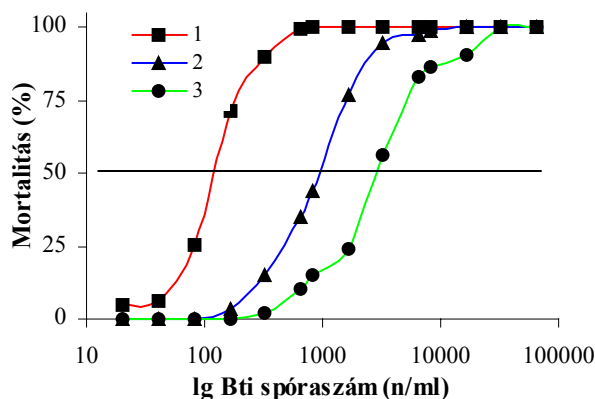
38. ábra: A vizsgált hordozókhoz kötött spórás Bti-készítmények laboratóriumi szúnyoglárvá-tesztjeinek eredménye (24-EC50). Az expozíció alatt elpusztult lárvák összlárvaszámhoz viszonyított százaléktételeinek a hordozók tömegétől való függése. A tanulmányozott hordozók grammonként $2,52 \cdot 10^7$ Bti-spórát tartalmaznak.

A diagram jelmagyarázata: FHT_{20Bti}-H (1), ÉKT_{20Bti}-H (2), SZKT_{20Bti}-H (3) és ZT_{20Bti}-H (4)

A tömör felületű folyami homokszemcsékre adszorbeált Bti-spórák (FHT_{20Bti}-H) a vízbe jutva gyorsan reszuszpendálódnak a hordozóról és kifejtik toxikus hatásukat a szúnyoglárvákra (38. ábra). Az 50%-os mortalitás (EC50) eléréséhez [0,28g] Bti-spórát tartalmazó folyami homokszemcsére volt szükség literenként. A homokszemcsék felületéhez kötött Bti-spóraszámából hétszer annyi mennyiség szükséges az EC50 eléréséhez, mint a szabad sejtes Bti-spóra készítmény spóraszámából.

A porózus hordozókból nem tudtak kellő hatékonysággal kioldódni a baktérium spórák. A kísérlet során a zeolit ásványi frakción abszorbeált Bti-spóra szuszpenzió (ZT_{20Bti}-H) bizonyult legkevésbé hatékonynak. Valószínűleg azért, mert a zeolit szemcséknek magas a vízmegkötő képessége, és ezért a szemcsék pórusaiban abszorbeált spórás Bti-szuszenziót kis hatékonysággal és lassan adja le. Az 50%-os mortalitást literenként [13,7g] Bti-spórát tartalmazó zeolit-szemcse adagolásával tudtam elérni..

4.3.5 Különböző stádiumú Aëdes vexans szúnyoglárva toxicitásának meghatározása

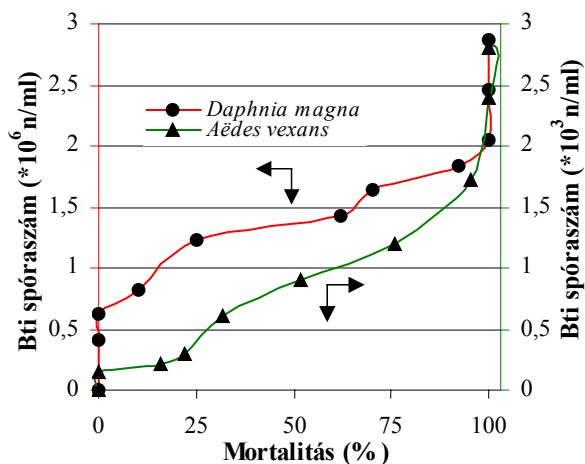


39. ábra: Különböző fejlődési szakaszú Aëdes vexans szúnyoglárva szúnyoglárva-tesztjeinek eredménye (24-EC50). A grafikonok a 24 órás expozíció alatt elpusztult lárvák összlárvaszámhoz viszonyított százaléktételeinek a Bti-spóraszámától való függéseit ábrázolják. A szemléletesség érdekében a Bti-spóraszám értékeknek a logaritmusát ábrázoltam.

A diagram jelmagyarázata a különböző fejlődési szakaszú lárvák toxicitástesztjét jelöli: 2.stádiumú lárvák vizsgálata (1), 3.stádiumú lárvák vizsgálata (2) és 4.stádiumú lárvák vizsgálata (3)

A különböző életkorú csípőszúnyog-lárva érzékenysége a Bti-spóra készítményekkel szemben különböző (39. ábra). Az 1.stádiumú lárva nagyon érzékeny a minimálisan is megváltozott környezetre. A kontroll egyedek mortalitása meghaladta a tesztben meghatározott 10%-os értéket, ezért az 1.stádiumú lárva eredményét nem vettem figyelembe. A 2.stádiumú lárva esetében a 24-EC50 értéket [126n/ml] Bti-spóra koncentrációnál, a 3.stádiumú lárva esetében a 24-EC50 értéket [978n/ml] Bti-spóra koncentrációnál és a 4.stádiumú lárva esetében a 24-EC50 értéket [2973n/ml] Bti-spóra koncentrációnál mértem. A mért adatok azt mutatják, hogy a 2.stádiumú lárva csaknem nyolcszor érzékenyebb a 3.stádiumú lárvaéhoz képest. A 4.stádiumú lárva háromszor ellenállóbbak, mint a 3.stádiumú csípőszúnyog-lárva.

4.3.6 A *Daphnia magna* Straus egyedek toxicitásának meghatározása



40. ábra: *Daphnia magna* Straus egyedek és *Aedes vexans* szúnyoglárva Bti-spórákkal szembeni laboratóriumi toxicitás-tesztjének összehasonlítása (24-EC50). A grafikonok a 24 órás expozíció alatt elpusztult tesztállatok összegyedszámhoz viszonyított százaléktételeinek a Bti-spóraszámától való függéseit ábrázolják. A grafikonok és az értéktengelyek kapcsolata a diagramon jelölve.

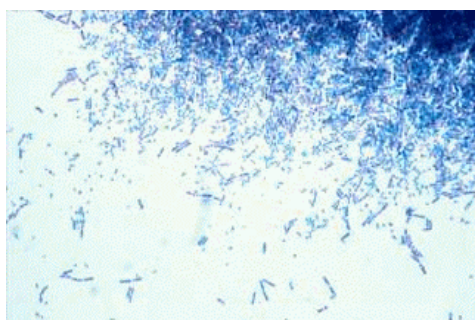
A Bti-spórák $(0,15-2,4) \cdot 10^3$ n/ml koncentrációban toxikus az *Aedes vexans* tesztgyedekre, míg $(61,5-205) \cdot 10^6$ n/ml koncentrációban toxikus a *Daphnia magna* tesztgyedekre (40. ábra). Az öt nagyságrendbeli különbség jól tükrözi a Bti-spórák nagyfokú szelektivitását a csípőszúnyog-lárvákkal szemben.



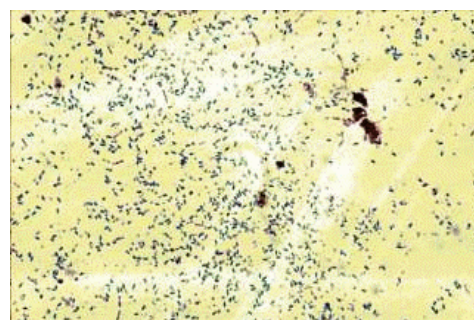
1 órás minta



24 órás minta



36 órás minta



48 órás minta

41. ábra: A T_{20} -tápoldatban történő spóráképződés folyamata a T20Bti-fermentátum képződése során (A felvételek 1000*-es nagyítással, Zeiss-axioskop mikroszkóppal készültek)

A spóráképződés folyamata látható a 41. ábrán. Jól látszik a vegetatív Bti-csírák mennyiségének növekedése mellett a spóratartalom-értékének emelkedése is. Az egy órás mintán a fermentációs folyamat „lag” fázisa látható 0%-os spóratartalom mellett. A Bti-spórákat a Malachit-zöld festék zöldre, a vegetatív Bti-sejteket a safranin kontrasztfestés pirosra festi. A 24 órás minta valamennyi vegetatív sejtjében látható a denz, zöld színű endospóra. A 36 órás mintában már több a Bti-spóra (zöld szín), mint a vegetatív sejt (piros szín) és a 48 órás mintán csak zöld színű Bti-spórák láthatók.

5 ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉS

A szúnyogok által terjesztett kórokozók lehetnek vírusok (sárgaláz vírusa, dengue láz vírusa stb.), baktériumok (tularaemia, lépfene stb.), egysejtű állatok (malária) és férgek (fonálférgek) (Mihályi és Gulyás, 1963). Magyarországon jelenleg nem nagy számban fordulnak elő szúnyogok által terjesztett betegségek, ezek között is elsősorban a fonálféreg fertőzések dominálnak. Legutóbb a Népszabadság 2004. június 30.-i cikke számolt be egy szúnyogcsípés által szemüregbe került fonálféreg sikeres műtéti eltávolításáról.

A szúnyogártalom környezet-, és természetcentrikus megszüntetését célzó munkámat a szegedi szúnyogdenzitás tér-, és időbeli felmérésével kezdtem.

5.1 A szegedi csípőszúnyog együttes

A korábbi tanulmányok a településmentes ártéri területek szúnyogegyüttesét mérték fel (Tóth, 1977; Branka, 1984). Ezek a kutatások a Tisza-folyó völgyében leggyakoribb fajoknak az *Aedes vexans* (41,17%), *Culex modestus* (26,68%) és *Aedes rossicus* (19,06%) szúnyogot találták.

Az irodalmi ismeretek alapján a szúnyogegyüttes összetétele a szezon folyamán is változik (Mihályi és Gulyás, 1963; Bergey's manual, 1986). Az Alsó-Tisza mentén az eddigi tanulmányok nem hasonlították össze a nedves tavaszi és a száraz nyár folyamán kialakult szúnyogegyüttesek összetételét (Tóth, 1977; Branka, 1984).

Dolgozatom újdonsága, hogy az urbanizációval zavart (kommunális hulladék, szennyezett vizek jelenléte, heti kémiai szúnyogirtás, mesterségesen kialakult szúnyogtenyésztő helyek... stb.) Tisza-parti város szúnyogegyüttesének összetételét és az összetétel időbeni változását tanulmányozza. Az 1999-es szegedi területen végzett felmérések alapján a szúnyogszezonban a *Culex pipiens* (46,9%) faj bizonyult dominánsnak, a *Culex modestus* (10,1%) és az *Aedes vexans* (10,1%) fajok voltak szubdominánsak. A domináns egyedek mellett, kisebb számban megjelentek a ritka fajok is, pl. *Aedes dorsalis* (8,6%), *Aedes sticticus* (7,85%), *Aedes annulipes* (5,9%), *Aedes cantans* (2,4%), *Theobaldia annulata* (2,9%). A ritka fajok megjelenéséhez speciális igényeket kielégítő környezet szükséges (Mihályi és Gulyás, 1963; Becker és Magin, 1986). A rendszeres kémiai szúnyoggyérítés, és a száraz nyár hatására eltűnnek az évente néhány generációs szúnyogfajok, helyüket átveszik a sokgenerációs fajok.

Tanulmányaim során megfigyeltem egy fajt, *Anopheles hyrcanus* Pallas, 1771 (Mihályi és Gulyás, 1963), melyet a korábbi dolgozatok nem említettek meg a

Tisza-völgyben, de a legújabb felmérések szerint előfordul a Tisza-tó szúnyogegyüttesében. (Szabó 2003, személyes közlés). Ennek a fajnak a megjelenése az alföldi területeken nem gyakori, mert lárvája érzékeny a tenyészvíz sótartalmára. Ugyanakkor jelenléte a humán csapdázás módszerével nehezen detektálható, mert imágója az embert ritkán támadja meg (*Mihályi és Gulyás, 1963*).

A csípőszúnyogok rövid idő alatt óriási mértékben képesek kifejlődni, ezért a szúnyogártalom megszüntetésére külső beavatkozás szükséges (*Becker és Magin, 1986*). A rövid idő alatt sok utódot létrehozó élőlényeket életmódjuk alapján r-stratégiájúaknak nevezik. Legfontosabb jellemzőik a rövid fejlődési ciklus, rövid élettartam és a gyorsan változó életterek gyors benépesítése. A csípőszúnyogok természetes ellenségei ezzel szemben k-stratégiájúak. Ennek az életciklusnak a legfontosabb jellemzői a kevés számú utód létrehozása, jelentős méretnövekedés az életük folyamán és a hosszú élettartam (*Heinrich és Hergt, 1994*).

5.2 A Bti-baktériumok fermentációja

A szúnyogártalom ellen a biológiai védekezés Bti-spórákkal történő lárvairtó módszerét tanulmányoztam a továbbiakban (*Margalit és Dean, 1985; Becker és Magin, 1986*). Szintetikus tápoldatok minimalizálásával (*Faloci és munkatársai, 1986*), majd egykomponensű tápoldatok tanulmányozásával előállítottam egy minden szempontból optimális tápoldatot, melyben gyorsan elszaporodnak a vegetatív Bti-baktériumok és rövid inkubációs idő alatt a csípőszúnyog lárvákra toxikus spórák képződnek (*Alföldi és Hegedűs, 1952; Szmirnov és munkatársai, 1986*).

Az irodalmi adatok szerint a szintetikus tápoldatokban lassú a sejtszétválás üteme (*Kuppusamy és Balaraman, 1991*), és az aerob baktériumok kevés spórát képeznek (*Szmirnov és munkatársai, 1986; Desai és Shethna, 1989; Dregval' és munkatársai, 1999*). Ugyanakkor a megfelelő komponensek hozzáadásával ezekben a tápoldatokban is optimális spóráképződés érhető el (*Faloci és munkatársai, 1986*). Az általam végzett kísérletek megerősítették a szintetikus tápoldatok tanulmányainak az eredményeit. A baktériumok tenyésztéséhez optimális összetételű tápoldatban történő fermentáció eredményeként a Bti-baktériumok csíraszama csekély mértékben növekedett, és a spóráképzés valamennyi esetben 0%-os volt. A vegetatív Bti-baktériumok növekedése csak a szacharóz vagy laktóz tartalmú tápoldatokban volt jelentős mértékű (T_6 , T_7). A pepton tápanyagkomponens minimalizálása, illetve elhagyása a tápoldat összetételéből hozzájárult a fermentátum élő Bti-sejtszámának növekedéséhez, illetve megindította

a spóráképződést (T_{63} , T_{73}). Tanulmányoztam a pepton tápanyagkomponens nélkül a Bti-tenyésztetőségét a cukor (szén- és energiaforrás) minimalizálása mellett. A táp- és energiaszegény szintetikus tápoldatban megemelkedett mind a Bti-baktériumok élő sejtszáma, mind a spóráképzés hatékonysága. Az optimális szén és energiaforrásokból csekély mennyiség (1,875g/l) elegendő volt a hatékony spóráképzéshez, ami együtt járt a szintetikus tápanyagokban optimális tenyésztéssel ($T_{633}=1,9 \cdot 10^7$ n/ml –laktóz cukortartalom mellett; $T_{733}=2,6 \cdot 10^7$ n/ml –szacharóz cukortartalom mellett). A fermentálódott Bti-baktériumok 100% -ban képeztek toxikus spórákat az energia- és tápanyag forrás kimerülését követően. A szacharóz tartalmú tápoldat gazdasági szempontból kedvezőbb.

Gazdaságos megoldás valamely melléktermék továbbhasznosíthatósága Bti-baktériumspórák fermentálására. Az egykomponensű tápoldatok között egyes tápoldatokban nem is szaporodott a Bti- $(T_{13}-T_{17})$; másokban jól szaporodott, de a vegetatív alakok nem képeztek spórákat ($T_{11}-T_{12}$). Voltak tápoldatok, melyekben a vegetatív Bti-baktériumokból képződött Bti-spóra, de azok nem mutattak toxikus hatást a szúnyoglárvákra (T_{18}) és voltak tápoldatok, melyekben felszaporodott a Bti-mikroba és rövid idő alatt csípőszúnyog lárvákra letális hatású spórákká alakult (T_{19} : élő spóraszám: $4,5 \cdot 10^7$ n/ml; spóratartalom: 100%; T_{20} : élő spóraszám: $3,1 \cdot 10^7$ n/ml; spóratartalom: 100%). A T_{20} -tápoldatban a Bti-spórák fermentációja 28°C hőmérsékleten is végbement. A spóráképződés folyamatát többféle spórázást elősegítő hatással próbáltam gyorsítani, de előállítottam egy tápoldatot, melyben minden kezelés nélkül, a tápanyagforrás kimerülését követően, 98-100%-os δ -endotoxin tartalmú spóráképződés volt megfigyelhető (T_{19} , T_{20}). Gazdasági okokból a T_{20} -tápoldat bizonyult optimálisnak, a tápoldat előállításához szükséges alapanyag költsége 4 Ft/liter (2003. évi adat).

A Bti-spórák fermentációja során megfigyelhető a tápoldat szabad aminosav tartalmának a változása. Az irodalom szerint (*Perani és Bishop, 2000*), ha a tápoldatban 20 esszenciális aminosav van jelen, akkor a vegetatív Bti-baktérium δ -endotoxin tartalmú spórákat képez egyéb vitamin vagy növekedési faktor hiányában is. A steril HL-tápoldatban 16 esszenciális aminosav volt kimutatható. A prolin (Pro-177%); metionin (Met-152%) és tirozin (Tyr-131%) aminosavak mennyisége a tápoldatban a kiindulási értékhez viszonyítva megemelkedett a vegetatív fázis végére. Ennek a jelenségnek az egyik lehetséges magyarázata, hogy a Bti-baktérium fermentációjában a felhasznált aminosavak transzamináció révén egymás intermediereként szolgálhatnak a lebontási folyamataik során. Másik lehetőség, hogy az aminosavak nemcsak fehérjeforrásként használnak fel, hanem

energiaforrásként is funkcionálnak, és emiatt is csökkenhet a mennyiségük. A tirozin bioszintézisének alapja a fenil-alanin (Phe), a prolin bioszintézisének és lebontásának egyaránt köztes terméke a glutaminsav (Glu) és a metionin a cisztein (Cys) aminosav felhasználásával szintetizálódhat (*Elődi, 1983*). A spóráképződés fázisának végére csaknem valamennyi szabad aminosav felhasználódik a tápoldatból, kivéve a fenil-alanint (4,3%-maradt) és a lizint (2,0%-maradt), melyek a kiindulási érték csekély százalékában a fermentáció spóráképző szakaszának végén is jelen voltak.

A spórázás Bti-készítmény nagyüzemi előállítására gazdasági szempontból a T₂₀-tápoldat bizonyult optimálisnak, előállításának költsége, kevesebb, mint 4 Ft/liter (2003. évi adat), ezért a fermentáció körülményeit részletesebben is tanulmányoztam.

Kísérleteink eredményeképpen feltételezhető, hogy a Bti-baktériumnak a proteáz aktivitása mellett kollagenáz aktivitása is van. A fermentációnak azért lehet lassú a kinetikája, mert a baktérium saját extracelluláris enzimje bontja el a tápoldat fehérjét. Mindazonáltal feltételezhető a T₂₀-tápoldat nagyon csekély tápanyagtartalma, mivel se a steril T₂₀-tápoldatban, se a 12 órás T_{20Bti}-fermentleiben nem volt az érzékeny gázkromatográfiás módszerrel kimutatható szabad aminosav mennyiség jelen. A csont szerkezetében jelentős mennyiségű kalcium-foszfát található, melynek lebontásakor a felszabaduló Ca²⁺-ionok részt vehetnek a spóráképződés folyamatában. A Ca²⁺-ionok szerepe a spóráképződés 6.stádiumában kulcsfontosságú, amikor a dihidropikolinsavval (sp.-nak 5-15%-a) komplexet képezve stabilizálják a spóra szerkezetét és biztosítják a spóra hővel szembeni rezisztenciáját (*Szmirnov és munkatársai, 1986*).

Meghatároztuk a steril T₂₀-tápoldat összecsukortartalmát, mely szerint a spóráképződés szempontjából legeredményesebbnek talált steril T₂₀-tápoldatban minimális mennyiségű szénhidrátot találtunk. Tanulmányoztuk a 12 órás T_{20Bti}-fermentátum sejtmentes fermentlevének összecsukortartalmát is, azonban annak értéke a vizsgált fermentleiben természetesen nem változott.

Az irodalom szerint a mikroorganizmus szuszpenziók szaporodási dinamikájának „log” (logaritmikus) fázisa folyékony tápoldatban 5-10 óra időtartamú (*Straub, 1982; Vácsi, 1988*). A T₂₀-tápoldatban történő Bti-fermentálás esetében ez az időtartam 20 órát igényelt. A fehérjéket felépítő aminosavakat valószínűleg nemcsak saját testének felépítésére használja fel, hanem feltehetően dezaminálás után a szénhidrátláncukat lebontja, majd energiaforrásként is hasznosítja őket. A dezaminálás következtében feltehetően megnövekszik a

tápközeg pH-értéke. A tápanyagszegény tápoldatban fermentált Bti-sejtek lassabban nőttek ugyan fel, de 24 órás fermentáció után 44%-os volt a spóratartalom, és 48 órás inkubálás elteltével szinte csak Bti-spórák voltak találhatóak a szuszpenzióban. A irodalomban (*Salama és munkatársai, 1983; Liu és munkatársai, 1995; Kraemer-Schafhalter, 1996*) eddig nem írtak le a fentiekhez hasonló Bti-fermentációt, amelynek során egy melléktermék felhasználásával, rövid időn belül (2-3 nap) 100%-os spóratartalom érhető el.

A T₂₀-tápoldat vizsgálatánál a fermentáció kezdetén magas pH-értékeket (pH= 8,5-9,0) mértem, ez 16 órás fermentáció alatt csökkent (pH= 7,5 -re), majd 48 órás inkubálás után újra (pH= 8,5-9,0) emelkedett. A pH-értékének csökkenése kedvez a vegetatív Bti-sejtek elszaporodásának, majd a pH-érték ismételt emelkedése kedvezőtlen a Bti-sejteknek, de kedvez a spóráképződésnek. Tápanyaggazdag tápoldat pH-értékének mesterséges emelése nem váltja ki a Bti-spóráképzését, csak kísérő jelensége a spóráképzés folyamatának. Feltételezhető, hogy a pH-értékének csökkenését a fermentáció során keletkező CO₂ és szerves savak okozhatják. A pH-értékének emelkedését pedig a T₂₀-tápoldatban jelenlevő aminosavak dezaminálással történő lebontása okozhatja, vagy a Bti-baktériumok lúgos fermentációjának következménye (*Elődi, 1983; Vácz, 1988*).

5.3 A Bti-szuszpenzió koncentrációja

Az előállított spórák Bti-készítmény kiszűrése és gyakorlati célokra való alkalmazása csak koncentrált szuszpenziók esetében lehetséges. A Bti-szuszpenzió víztartalmának csökkentésére nagy molekulatömegű anionos és kationos polielektrolitokat, úgynevezett flokkulálószereket alkalmaztunk.

A Bti-spórák felülete pozitív és negatív töltésű „területekből” áll. A sejtfelszín ζ -potenciál értéke -23mV (a Bti-spórák ζ -potenciál értékét Kassai Műszaki Egyetem Eljárástechnikai és Környezetvédelmi Tanszékén lévő, Doppler-effektuson alapuló (ZetaPlus, Brookhaven Inc, USA) műszer alkalmazásával határoztuk meg, nem közölt adat), azaz kissé negatív. Az ellentétes töltéselőjelű, kationos polimerrel történő flokkulációkor a Bti-spórák gyors kötődése következtében a sejtek ütközésének hatékonysága jelentősen növekszik, ami az aggregálódás kezdetéhez vezet (*Fleer, 1971*). Érdekes módon a flokkuláció kinetikai görbéjén nem figyelhető meg jelentős kezdeti „lag” (10. ábra - lappangási fázis) szakasz, melyben az aggregáció mértéke nem vagy csak alig növekszik, mint ez jellemző szerves anyagok (kaolin, szilícium-dioxid stb.) diszperzióinak polielektrolitokkal történő flokkuláltatása esetében (*Gregory és Lee, 1990*). A polimerekkel való flokkuláció

szervetlen diszperziók esetében is egy igen bonyolult, sok paramétertől függő folyamat (Fleer, 1971; Bárány és Gregory, 1996; Bárány, 2000).

A spórás Bti-szuszpenziók flokkulációjánál alkalmazott polimer mennyiség arányos az *Escherichia coli* és más sejt-suszpenziókban mért optimális flokkulációt előidéző polimer koncentrációkkal. A csekély mértékű eltérés oka feltételezésem szerint a mikrobák eltérő méreteiben kereshető (Bti: $3-5 \times 0,5-0,8 \mu\text{m}$; E.coli: $1-3 \times 0,5 \mu\text{m}$), valamint a baktériumsejteket körülvevő sejthártya összetételében, a Bti ugyanis Gram-pozitív (G^+) baktérium, az E. coli pedig Gram-negatív (G^-) baktérium (Becker és Magin, 1986; Neidhardt, 1996). A nagy töltéssűrűségű Percoll1697 jelzésű kationos polielektrolit, melynek adszorpciós affinitása a negatív töltésű sejtfelülethez valószínűleg a legnagyobb, már $1-2\text{g}/100\text{milliárd}$ sejt mennyiségben is jelentős flokkulációt idéz elő. Ugyanakkor a flokkulációs zóna szélessége ebben az esetben meglehetősen kicsi. Hatékonyabb polimernek bizonyult az SNFH528 polielektrolit, itt az aggregálódás mértéke nagyobb és flokkulációs tartomány is szélesebb. A kationos DS polielektrolit flokkuláltató képessége az előbbi két mintához viszonyítva lényegesen gyengébb. A kationos polimerek flokkuláltató képessége elsősorban a makroionok pozitív és a sejtfal negatív töltései között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatások következtében fellépő adszorpcióval van összefüggésben (Bárány, 2000). Merevláncú polielektrolitok esetében az említett tényező mellett jelentős szerepet játszhat a flokkuláció hídkötéses mechanizmusa is, mint megfigyelhető E.coli szuszpenziók merev- vázú poliszacharidokkal (kitozán és származékai) történő flokkuláltatása során (Bárány, 1988; Bárány és Teszlenko, 1992). A makro-lánc hajlékonyságától (rigiditásától) függően tehát az aggregáció különböző mechanizmusai dominálnak.

A kísérletek alapján számos anionos polielektrolit-oldat is aránylag jól aggregálja hígított szuszpenziókban a Bti-spórákat. Itt is a klasszikus viselkedés - kis polimer-töménységeknél aggregálódás, majd jelentős polimer koncentrációknál a diszperzió újbóli stabilizációja - figyelhető meg. Feltételezhető, hogy a sejtfal mozaikszerű szerkezete, ahol pozitív és negatív töltésű funkciós csoportok váltják egymást, lehetőséget teremt az anionos szegmensek kötődésére is a felülethez. Mivel a pozitív funkciós csoportok száma a sejtfelületen aránylag kicsi (lényegesen kisebb, mint a negatív funkciós csoportok koncentrációja), így az anionos polielektrolit csak kisszámú kötéssel kapcsolódik a sejtfelülethez, ezért a kevésbé deformált, jelentős kiterjedésű adszorbeált makro-anion képes hídkötéses mechanizmus révén összekötni, aggregálni több Bti-spórát. A sejtfelület és

polielektrolit-szegmensek közötti hidrofób kölcsönhatások is szerepet játszhatnak az adszorpciós réteg kialakulásában.

Minél nagyobb a spórák koncentrációja a szuszpenzióban, annál kisebb makromolekula-mennyiség (és feltehetően adszorbeált polimer-mennyiség) szükséges a hatékony aggregáció eléréséhez, hígított Bti-szuszpensiók esetében. Hasonló megfigyelések történtek polisztirol-latex és más szerves szuszpenziók flokkuláltatásának tanulmányozása során kationos és nemionos polimerekkel (*Solementseva és munkatársai, 1980; Bárány, 2000*). Esetünkben ez a jelenség valószínűleg a flokkuláció kinetikai aspektusával van összefüggésben: a szuszpenzió töménységének növekedésével a sejtek ütközésének gyakorisága és ennek folytán az adszorbeált polimer által előidézett aggregáció mértéke jelentősen növekszik. A gyakoribb ütközések következtében az oldatba bevitt polimer gombolyagoknak (láncoknak) kevesebb idő áll rendelkezésre, hogy a felülettel való kontaktus után ezen szétterüljenek, felvegyék egyensúlyi konformációjukat. Így a töményebb szuszpenzióban a (hatékonyabb) flokkulációt kevésbé deformált, valószínűleg nagyobb méretű makromolekulák idézik elő, mint híg rendszerekben, ahol a ritkább ütközések eredményeként a polimer molekuláknak a deformálódásra, konformáció változásra több idő áll rendelkezésükre. Az utóbbi esetben a gyengébb flokkuláció a jobban deformált, a felülethez több kötésponttal kötődő, vékonyabb adszorpciós rétegek képződésével magyarázható. Hasonló összefüggéseket figyeltünk meg a hígított Bti-szuszpensió SNFH149 és SNFH57 jelzésű anionos polielektrolitokkal történő flokkulációja során is.

Az irodalom szerint a polimerek flokkuláltató hatását növelhetjük úgy is, hogy a polimert nem egy, hanem két egyenlő vagy több részletben adagoljuk a diszperzióhoz. Az ismert irodalmi adatok szerves szuszpenziók flokkuláltatására vonatkoznak (*Shaw, 1986; Bárány, 1988; Bárány és Teszlenko, 1990; Bárány, 2000*). Feltehetően a hatékonyabb flokkuláció oka az lehet, hogy az első polimerrészlet bevitele után képződött flokkulumok a második adaggal bevitt makromolekulák hatására tovább aggregálódnak, azaz a flokkulációs folyamat két lépcsőben játszódik le. Először csak kis flokkulumok képződnek, majd ezek nagyobb aggregátumokká egyesülnek. A másodlagos aggregátumok nagyobbak, mint az elsődlegesek, amit nagyobb RMS érték jelez. Ezt a flokkulációs maximumot kevesebb polimer mennyiség felhasználásával lehetett elérni (*Bárány, 2000*). Eredményeinkből arra a megállapításra jutottunk, hogy a Gram-pozitív (G^+) Bti-spórák esetében is igaz ez a korábbi megfigyelés.

Tanulmányozásunk során azt tapasztaltuk, hogy a töményebb polimeroldat adagolása esetén nagyobb flokkulációs hatást mértünk a hígított Bti-spóra szuszpenzió (1:50 arányban hígított) esetében. Különösen szembetűnő az RMS értékek különbsége töményebb (1:20 arányban hígított) szuszpenziók esetében. Ennek a jelenségnek az oka egyértelműen nem tisztázott. Feltételezhető, hogy a tömény polimeroldatban nagyméretű asszociátumok, szupramolekula-struktúrák képződnek és ezek kötődése, adszorpciója a sejtfelületen határozza meg az aggregálódás mértékét. Elképzelhető az is, hogy a koncentrált(abb) oldatban a polielektrolit töltései jobban le vannak árnyékolva, a makromolekula nagyobb mértékben van begombolyodva és ennek kinyúlása, szétterülése a sejtfelületen, illetve töltéseinek hozzáférhetősége, kölcsönhatása a felület töltéseivel megnehezített. Ennek következtében a gyakori ütközésekkel jellemezhető szuszpenzióban a flokkulált állapotot a kevésbé deformált, kisszámú kötésponttal rendelkező (nagyobb kiterjedésű, azaz nagyobb flokkuláltató hatással bíró) adszorbeált makromolekulák hozzák létre.

A natív fermentálé polimeroldatokkal történő hatékony ülepítése volt a flokkulációs kísérleteink végső célja. A vizsgálataink alapjául szolgáló natív fermentátumot hígítanunk kellett, a műszeres tanulmányozás érdekében. A natív fermentáléban az élő sejtszám mennyisége jóval nagyobb, ezért természetes, hogy más mechanizmus hatása fog érvényesülni. Megfigyelhető a szuszpenzióban egy spontán aggregálódás folyamat, amit csak intenzív keveréssel (homogenizálással) lehetne kiküszöbölni. De nem lehet a flokkuláció folyamatát intenzív keveréssel párosítani, mert szétesnek a képződő flokkulumok. Feltételezhető, hogy a nagy méretű spontán képződő Bti-spóra aggregátumok belsejében csak gyenge adszorpciós kölcsönhatások alakulnak ki a Bti-spórák között. A közegben mindig kell lenni szükséges számú makromolekulának, hogy az ülepedés közben széteső aggregátumok belsejéből kiszabaduló Bti-spórákkal flokkulumokat képezhessenek.

Az anionos polimeroldatok csekély mértékben fokozták az ülepedést, de mennyiségüknek növelése már csökkentette az ülepedés sebességét. Feltételezhetően a jelenség a Bti-spórák felszínének töltésmegoszlásával magyarázható. A Bti-spórák felszínének bruttó töltése kissé negatív, de felületük pozitív és negatív töltésű területekből áll. Kis mennyiségben képesek megkötni az anionos makromolekulákat, ezáltal méretük megnövekszik, ami fokozhatja az ülepedés sebességét. De az anionos makromolekulákkal kölcsönhatásba lépő pozitív töltésű szabad területek elfogyását követően a további negatív töltésű

makromolekulák adagolása már stabilizálja a szuszpenziót, mivel a negatív töltésű felületek és az anionos makromolekulák taszítják egymást.

A kationos polimeroldatnak a Bti-spóra szuszpenzióhoz kis mennyiségben történő adagolása is fokozta az ülepedés sebességét. A jelenség jól értelmezhető a nagyobb méretű flokkulumok gyorsabb ülepedésével (*Bárány, 2000*). A Bti-spórák felületének negatív töltésű területei könnyen lépnek kapcsolatba a pozitív töltésű makromolekulákkal. Öt nap expozíciós idő után a szuszpenzió optikai denzitása nem csökken a kiindulási értékhez viszonyítva 2,2 % alá, ugyanakkor a szuszpenzió baktérium tartalmának a meghatározása az élő sejtszámláláson alapuló módszerrel hatékonyabb ülepedést eredményezett.

5.4 Hordozóhoz kötött Bti-készítmények

A porózus szerkezetű szemcsék pórusaiban (zeolit, kovaföld) abszorbeált spórás Bti-szuszpénzió esetében feltételezhetően létrejöhet belső felületen történő kölcsönhatás is a Bti-spórák és a hordozók között. E jelenség reverzibilitás esetén megnövelheti a hatékonyság időtartamát, de ha irreverzibilis kölcsönhatás jön létre, akkor megszünteti a készítmény larvicid tulajdonságát. A tömör felszínű hordozók (folyami homok) felületére adszorbeált Bti-spóra szuszpenzió esetében a felszínen feltételezhetően gyengébb kapcsolat jön létre a szemcse és a baktériumspórák között, mint a porózus szerkezetű hordozók pórusaiban, belső tereiben. Valószínűleg ez a magyarázata a Bti-spórák gyors és hatékony leoldódásának erről a tömör felületű hordozóról (*Su és Mulla, 1999*). A szabadsejtes készítmények által tartalmazott Bti-spóráknak a többszörösét szükséges tartalmaznia a homokszemcséhez kötött spórás Bti-készítménynek. Feltételezhetően a toxicitás tartóssága hosszabb ideig tart.

Ugyanakkor a porózus felületű hordozók felszínükkel arányosan több Bti-spórát képesek megkötni, mint a tömör felületű hordozók. A felületi immobilizáció generálja és stabilizálja a spóra állapotot (*Szmirnov és munkatársai, 1986*).

5.5 Bti-toxicitás meghatározására használt teszt

Szinte valamennyi Bti-spóra készítménnyel kapcsolatos szakirodalom foglalkozik a szúnyoglárva elleni szuperszelektív toxicitással (*de Barjac, 1978; Berry és munkatársai, 1987*), ugyanakkor kevés azon publikációk száma, amely egyéb élőlények toleranciáját mutatja be (*Becker és Magin, 1986*). A környezetbe juttatott Bti-spórák túladagolása a szúnyogok közeli rokonait veszélyezteti

leginkább. Az irodalom szerint a legérzékenyebben reagálnak a Chironomidae családba tartozó árvaszúnyogok, mert a csípőszúnyogokra toxikus Bti-spóra készítmény tízszeres túladagolása elpusztítja őket is. Különösen fontos a Chironomidae család védelme, melyek lárvái a halak, és sok egyéb vízi élőlény táplálékát képezik. Ezeknek a nem célszervezeteknek az elpusztítását az alkalmazott spórás Bti-készítmény pontos adagolásával el lehet kerülni. De a szakirodalom szerint a túladagolás veszélyes lehet még a Dixidae (tutajos szúnyogok), Psychodidae (lepkeszúnyogok), Tipulidae (lőszúnyogok), Limoniidae (iszapszúnyogok), Sciaridae (gyászó szúnyogok) családok fajaira is (Becker és Magin, 1986).

Az irodalom szerint δ -endotoxin a vegetatív Bti-baktérium spóráképzésének a 3-5.fázisában képződik (Szmirnov és munkatársai, 1986), a vegetatív baktériumsejtben csak a toxin genetikai állományát kódoló plazmid található meg (Sekar és Carlton, 1985; Chilcott és Ellar, 1988; Thiery és munkatársai, 1992). Az összehasonlítás eredményeképpen azt tapasztaltam, hogy a Bti-spóra közel 3000-szer toxikusabb a 3.stádiumú szúnyoglárvákra, mint a vegetatív Bti-sejt. Az irodalmi adatok ezt az értéket megerősítik (Walther és munkatársai, 1986).

A biológiai toxicitásteszthez a vizek szennyezettségének kimutatására használt *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) tesztet vettem alapul (ISO 6341:1996) (MSZ: EN ISO 6341, 1998).

Az irodalom szerint (Margalit és Dean, 1985; Szmirnov és munkatársai, 1986) a szelektív toxikus hatásért az exospóriummal burkolt δ -endotoxin a felelős. Összehasonlítottam a vegetatív Bti-baktériumok és a Bti-spóráknak a szúnyoglárvákra kifejtett toxikus hatását. A vegetatív baktériumok esetében az EC50 érték közel $\approx 2,6 \cdot 10^6$ n/ml, míg a Bti-spórák esetében közel $\approx 1 \cdot 10^3$ n/ml volt, tehát a Bti-spórák 2600-szor toxikusabbak a csípőszúnyog lárvákra, mint a vegetatív Bti-baktériumok.

A fiatal (1-2.stádiumú) lárvagyedek detektálásának megkönnyítése érdekében a toxicitás meghatározását 24 lyukú szövettenyésztő lemez üregeiben is elvégeztem. A tesztedények mérete nem befolyásolta a tesztek eredményét, mivel a szúnyoglárvák a levegőt a vízfelszínről veszik (kivéve: *Taeniorhynchus richiardi*).

A szacharóz tartalmú tápoldatban fermentált Bti-spórák csekély mértékben toxikusabbnak bizonyultak, mint a laktóz tartalmazó tápoldatban növesztett mikroba. De a szintetikus tápoldatok toxicitása kis mértékben gyengébb volt, mint a pozitív kontroll kereskedelmi készítmény (VECTOBAC 12 AS) toxicitása. Az irodalom szerint szintetikus tápoldatokon a Bti-baktériumok nehezebben

szaporodnak és spórásodnak, de segédanyagok alkalmazásával ez a folyamat elősegíthető (*Szmirnov és munkatársai, 1986*).

Az egykomponensű tápoldatok között voltak olyanok, melyekben a tenyésztett Bti-spórák toxicitása gyakorlatilag megegyezett a kereskedelmi termék toxicitásával (*Rasnitsyn és munkatársai, 1993*), volt olyan tápoldat, melyben csak vegetatív Bti-sejtek képződtek az egy hónapos fermentáció alatt, kedvezőtlen körülmények hiányában, s volt olyan tápoldat is, melynek az összetétele nem tartalmazta a Bti-baktérium fermentációhoz szükséges komponenseket.

A polimeroldatokkal ülepített spórás Bti-készítmények toxicitása csekély mértékben maradt el a szabad sejtes készítmények toxicitásától. Ez azzal magyarázható, hogy a flokkuláció nem befolyásolta számottevően a toxicitást és a Bti-spórák hozzáférhetőségét se gátolta. Az irodalmi adatok szerint a flokkuláció nem gátolja a biológiai rendszerek életműködését (*Bárány és Teszlenko, 1992; Bárány, 2000*). Elképzelhető, hogy a kationos flokkulálószerrel koncentrált Bti-spórák csak részlegesen tudnak feloldódni, a flokkulumok széttöredeznek, de nagyobb mennyiségű Bti-spóra marad együtt. A szúnyoglárva számára könnyebben detektálható élelmet jelentenek, s nagyobb mennyiséget fogyasztanak el a spórákból, mint ami elpusztítja őket. A két szabadsejtes készítmény toxicitása gyakorlatilag megegyezett. Minimális volt a különbség a kationos és az anionos polimeroldatokkal flokkulált Bti-spórák toxicitásai esetében. Az anionos makromolekulákkal flokkulált spórás Bti-készítmény alig kimutathatóan toxikusabbnak bizonyult. Feltételezhető, hogy az anionos bruttó felszínű Bti-spórák és az anionos polimer között gyengébb kötés alakul ki, mint a kationos polimerrel flokkulált Bti-spórák között.

A tömör felületű szemcsékről a Bti-spórák reszuszpendálhatósága rendkívül jó, s alkalmazásával nem juttatunk semmilyen tájidegen anyagot az ártérre, csak a ráadszorbeálható Bti-spórák mennyiségét kellene növelni. Feltételezhetően a porózus szerkezetű hordozók nagyobb erővel tartják vissza a Bti-spórákat, vagy irreverzibilisen abszorbeálják őket (*Su és Mulla, 1999*). Ez a jelenség további kutatásokat kíván, mert ha szabályozni tudjuk a kioldódás mértékét, akkor felmerül a lehetősége egy hosszú ideig hatásos spórás Bti-készítmény előállításának.

Az irodalom szerint az *Aedes vexans* lárvák toxicitása lárvastádiumonként kettes faktorral nő (*Becker és Magin, 1986*). Kutatási eredményeim során nem tudtam a kísérleteket elvégezni 1.stádiumú *Aedes vexans* szúnyoglárvákkal, mert a kontroll egyedek is magas százalékban pusztultak el. A Bti-spórák toxicitása a 2.lárvaállapotú szúnyoglárvákra csaknem nyolcszor haladta meg a 3.stádiumúak

ellen kifejtett toxikus hatást. Ugyanakkor az utóbbiak csak háromszoros voltak érzékenyebbek, mint a 4.lárvaállapotúak. A kísérletek során megfigyeltem azt a jelenséget, hogy a 4.lárvaállapotú szúnyoglárvák gyorsabban bábozódtak be a Bti-spórákkal kezelt közegben, mint a kontroll egyedek kezeletlen tenyészhely vizében.

A természetbe vagy környezetbe jutott Bti-spórákat egyéb élőlények is elfogyasztják. A szakirodalom szerint a Bti-spórák semmilyen más élőlényre nem toxikusak. A *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) egyedek toxicitástesztjét a vízi szennyezések kimutatására használják a vízibolhák szennyezésekkel szemben mutatott érzékenysége miatt (*Wan és munkatársai, 2000*). Kis szennyeződés esetén is eltűnnek a vizekből. Eredményeim szerint a 3.lárvaállapotú *Aedes vexans* szúnyoglárvák több mint 1500-szor érzékenyebben reagálnak a Bti-készítményre, mint a rendszertanilag távolabb álló 24 órás *Daphnia magna* egyedek.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A nyári (nyárközeli) esték kellemetlen velejárói az emberek nyugalját csípésükkel zavaró szúnyogok, melyek ritkábban egyes betegségek kórokozóit is terjeszthetik. Munkám során elsőként a Szeged környéki csípőszúnyogok megjelenésének ökológiáját és a szúnyogegyüttes éves változását tanulmányoztam az 1999-es évben. A fő ökológiai adottságok (hőmérséklet, csapadék) május elejétől október végéig kedveztek a szúnyogok egyedfejlődésének. A tavaszi áradás után megjelenő változatos és néhány generációs szúnyogfajokat (*Aedes* genus) a száraz nyár, a rendszeres kémiai kezelés és az urbanizáció együttes hatásának eredményeként egy fajszegény és sokgenerációs szúnyogegyüttes (*Culex*, *Theobaldia* és *Anopheles* genusok) váltotta fel.

Tanulmányaim folyamán megfigyeltem egy új fajt (*Anopheles hyrcanus*), melyet a korábbi kutatások Szeged környékén nem mutattak ki. Tavalyi eredmény szerint a Tisza középső szakaszán, a Tisza-tó szúnyogegyüttesében találták meg nagyobb számban ezt a fajt.

A továbbiakban a szúnyogártalom környezetbarát megszüntetésére alkalmas Bti-baktériumok fermentációjának lehetőségeit tanulmányoztam. Szintetikus és egykomponensű tápoldatokban figyeltem meg a Bti-sejtek tenyésztetőségét, valamint spóratartalmát. A szintetikus tápoldatok fő komponenseit optimalizáltam a jobb hatásfok érdekében. A szintetikus tápoldatok esetében a hozzáadott pepton elhagyását követően tapasztaltam csak csekély mértékű Bti-csíraszám növekedést, amely a szénhidrát-komponens minimalizálásának hatására együtt járt a spóráképződés emelkedésével. Az egykomponensű tápoldatok esetében a Bti-fermentáció hatékonyságának növelésére a tápoldatok összetételét bioszintézishez szükséges komponensekkel egészítettem ki, illetve a spóráképző tulajdonság növelése érdekében mikroelemeket tettem a tanulmányozott tápoldatokhoz. A fermentációhoz a 28°C hőmérséklet elegendő volt. A hozzáadott pepton az egykomponensű tápoldatok esetében sem növelte a Bti-bioszintézisének a hatékonyságát, illetve a tanulmányozott tápoldatokhoz adagolt mikroelem oldat sem fokozta a spóráképződést.

A Bti-baktérium szabad aminosavakat tartalmazó HL-tápoldatban is tenyésztethető $6,9 \cdot 10^7$ n/ml hatékonysággal. Ekkor a tápoldatban található valamennyi aminosavat felhasználja, valószínűleg vagy fehérjeszintézisre, vagy energiaforrásként dezaminálja, majd lebontja a szénhidrogéncsoportjukat.

Tanulmányoztam egy tápoldatot (T_{20}), amely minden szempontból ígéretesnek bizonyult. A vegetatív Bti-baktériumok megfelelő hatékonysággal ($3\cdot 5\cdot 10^7$ n/ml) szaporodtak ebben a tápoldatban, és a fermentátum külső komponenssel történő kiegészítés nélkül, rövid idő alatt 99,9-100% spóratartalmú, δ -endotoxin tartalmú spórákká alakult. A T_{20} -tápoldat további előnye, hogy egy ipari melléktermék (csont) továbbhasznosításával, viszonylag csekély anyagi ráfordítással állítható elő.

A steril T_{20} -tápoldat lúgos kémhatású (pH=9,06). A fermentáció kezdetén a pH-érték csökken (pH=7,5), ami kedvez a vegetatív baktériumsejtek elszaporodásának, majd 16 órás fermentációt követően megfigyelhető a pH-értékének emelkedése (pH=9,11). Feltételezhető, hogy a pH-értékének csökkenését a fermentáció során keletkező CO_2 és szerves savak okozzák. A pH-értékének későbbi emelkedését a T_{20} -tápoldatban jelenlevő aminosavak dezaminálással történő lebontása eredményezheti.

A tápoldatban fermentált Bti-sejtek (spórák) gyakorlati alkalmazása megköveteli a tápoldat koncentrációját. A koncentrációs módszerei közül a polielektrolitokkal történő flokkulációt a Miskolci Egyetem Analitika Tanszékén tanulmányoztam. A flokkulációs folyamat 1-2 perces effektust követően megbízhatóan mérhető részecskeméret-analizátorral és a kontaktus időtartalmának növelése kb. 7 percre nem változtatja meg a flokkuláció mértékét, de az érzékeny műszer mérési tartománya megkövetelte a hígított Bti-spóra szuszpenzió használatát. A spórák Bti-szuszpénzió polielektrolitokkal történő flokkuláltatása egy igen bonyolult, összetett folyamat, melynek törvényszerűségei a mozaikszerű sejtfalhoz kapcsolódó mind pozitív, mind negatív töltésű makro-ionok kapcsolódásával, a polimeradszorpció és sejtaggregálódás kinetikai aspektusaival, valamint az aggregálódásban szerepet játszó polimer-hídkötés és felületi töltés-csökkenés figyelembevételével magyarázhatók.

A spórák Bti-szuszpénzió leghatékonyabb flokkulálószerének a kationos polielektrolitok bizonyultak a Bti-szuszpénzió flokkulációjánál. Ez a polimer pozitív töltéseinek a sejtfal bruttó negatív töltéséhez való jó kötődésével magyarázható. Érdekes módon számos anionos polielektrolit is aránylag jól aggregálja a Bti-spórákat, feltételezhetően ez a baktérium-spórafal töltésszerkezetének mozaikszerű struktúrájának (pozitív és negatív töltésű felületrészek váltakozása) köszönhető. A flokkuláltatás hatékonysága és a destabilizációs zóna szélessége alapján kiválasztottuk a spórák Bti-szuszpénzió sűrítésére leginkább alkalmas kationos és anionos polielektrolitokat.

A polimeroldatok adagolásánál előnyös a töményebb polimeroldat (0,1%) több részletben való hozzáadása a szuszpenzióhoz. A maximális flokkulációhoz szükséges polimer-mennyiség - ami néhány tized $g/10^{11}$ spóra és néhány $g/10^{11}$ spóra értékek között mozog - a szuszpenzió töménységének növelésével jelentősen csökken. Ezt a flokkuláció kinetikai törvényszerűségeivel hoztuk összefüggésbe.

Tanulmányoztam natív T_{20Bti} -spóra szuszpenzióban is a polielektrolitokban található makromolekulák flokkuláló hatását. A polimer nélküli spórás Bti-szuszpensióban 5 nap alatt a felülúszóból spontán, a nehézségi erő hatására a sejtek 20%-a ülepedik le. A kationos polimeroldat elősegíti, míg az anionos polimeroldatok gátolja ezt a koncentrációs folyamatot.

A növényzettel borított tenyésző helyek vizébe nehezebben jut el a repülőgépről szórt spórás Bti-készítmény permet, ezért előállítottunk hordozókhoz kötött Bti-spóra készítményeket. Porózus felületű hordozókhoz (égetett kovaföld, szárított kovaföld, zeolit) és tömör felületű hordozókhoz (kvarchomok) rögzítettük a Bti-spórákat. A porózus felületű hordozók hatékonyabban abszorbeálják a spórás Bti-szuszpenciót, de a sima felületű hordozók toxikusabbnak bizonyultak.

A Bti-spóra készítmények toxicitástesztjét a mobilitásgátlás meghatározása alapján végeztem, azaz meghatároztam azt a legkisebb Bti-spóra készítmény koncentrációt, mely a szúnyoglárva 50% értékét pusztítja el.

Összehasonlítottam a vegetatív Bti-baktériumsejteknek és a Bti-spóráknak a 3.lárvaállapotú *Aedes vexans* szúnyoglárvákra kifejtett toxikus hatását. A Bti-spórák nagyságrendekkel (2600^*) toxikusabbak voltak, mint a δ -endotoxin genomját csak plazmidjaikban hordozó vegetatív alakú Bti-baktériumsejtek.

A szabad sejtes Bti-spóra készítmények csekély mértékben toxikusabbnak bizonyultak, mint a Bti-spóra flokkulumok, de valamennyi tanulmányozott folyadék-közegű készítmény 24-EC50 toxicitási értéke hasonló volt. Feltételezhetően a flokkulumok elfogyasztásával több Bti-spórát tudnak egyszerre megenni, mint amennyi a pusztulásukhoz elegendő.

Összehasonlítottam 2.-3.-4.stádiumú *Aedes vexans* csípőszúnyog lárvák toxicitását a Bti-baktériumokkal szemben. A 3.időszakú lárvák háromszor voltak érzékenyebbek a 4.időszakú lárváknál, és csaknem nyolcszor voltak ellenállóbbak, mint a 2.időszakú lárvák.

A csípőszúnyogokkal rendszertanilag nem rokon 24 órás *Daphnia magna* Straus egyedek 1500-szor bizonyultak rezisztensebbnek a Bti-baktérium spórákkal szemben, mint a 3.stádiumú *Aedes vexans* szúnyoglárvák.

7 IRODALOMJEGYZÉK

- Ábrahámné, G. M., Hermes, E., Kissné, D. A., Kotormán, M., Lehoczkiné, S. M. (2004): Biokémiai gyakorlatok. – *JATE Press, Szeged*.
- Alföldi, Z., Hegedűs, A. (1952): Bakteriológiai vizsgáló módszerek. Ed: Bálint, P.: Klinikai laboratóriumi diagnosztika.- *Egészségügyi kiadó, Budapest*.
- Arnold, E. G., Lenore, S. C., Andrew, D. E. (1992): Standard Methods. - *American Public Health Association, Washington*.
- Bánsági, J., Makara, Gy., Zoltai, N. (1962): Rovar- és rágcsálóirtószerek felhasználása. Övrendszabályok. – *Eü. Min. Tájékoztató 1. sz. füzet. Budapest, 106*
- Bárány, S. (1988): Flocculation of cellular suspension by polyelectrolytes. - *Colloids and Surfaces. 31, 259-264*.
- Bárány, S. (2000): Polimerek diszperz rendszerekben. A kémia újabb eredményei, 88. Kötet. - *Akadémiai Kiadó, Budapest*.
- Bárány, S., Báder, E. (1988): - Magyar Kémiai Folyóirat. 104, 47-52.
- Bárány, S., Gregory, J. (1996): Flocculation of kaolin suspensions by cationic polyelectrolytes. - *Colloid J. 58, 9-14*.
- Bárány, S., Teszlenko, A. (1990): Flocculants in biotechnology. - *Khimiya Publishing House, Leningrad. 1-156. (Orosz nyelven)*
- Bárány, S., Teszlenko, A. (1992): Mikroorganizmus szuszpenziók flokkulációja. - *Magyar Kémiai Folyóirat. 12, 463-476*.
- Bárány, S., Teszlenko, A., Medvedev, Ju. V. (1991): Uspekhi kolloidnoj khimii, *Khimiya Kiadó, Leningrád, 358-476. (Orosz nyelven)*
- de Barjac, H. (1978): A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. - *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci. 286. 797-800*.
- de Barjac, H., E. Frachon. (1990): Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. - *Entomophaga. 35(2), 233-240*.
- Becker, N., Magin, H., (1986): 10 Jahre Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage e. V. Biologische Steckmückenbekämpfung - ein Modell am Oberrhein. - *Verlag Amelung und Hollatz, Heidelberg, 1-89*.

- Bennett, R. W., Harmon, S. M. (1990): *Bacillus cereus* Food Poisoning. Chapter 8. In Balows, A. et al. (eds.). Laboratory diagnosis of infectious diseases: Principles and practice. Volume 1: Bacterial, mycotic, and parasitic diseases. - New York: Springer-Verlag.
- Bergey's manual, (1986): Bergey's manual[®] of systematic bacteriology (2). Sneath, P. H. A.: Endospore forming gram-positive rods and cocci. Ed: Holt, J.G. - Williams & Wilkins, Baltimore,
- Berry, W. J., Novak, M. G., Khounlo, S., Rowley, W. A., Melchior, G. L. (1987): Efficacy of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for control of *Culex pipiens* and floodwater Aedes larvae in Iowa. - *J Am Mosq Control Assoc.* 3, 579-582.
- Bhattacharya, P. R. (1998): Microbial control of mosquitoes with special emphasis on bacterial control. - *Indian J. Malariol.* 35, 206-224.
- Branka, B. (1984): Investigation of mosquito fauna (Diptera, Culicidae) in Potsije. - *Tiscia an Ecological Journal.* 20, 111-116.
- Chilcott, C. N., Ellar, D. J. (1988): Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins in vivo and in vitro. - *J Gen Microbiol.* 134, 2551-2558.
- Desai, S. Y., Shethna, Y. I. (1989): Growth & toxicity of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. - *Indian J Med Res.* 89, 314-321.
- Dregval', O. A., Cherevach, N. V., Andrienko, O. E., Vinnikov, A. I. (1999): The effect of a soil extract on the development of *Bacillus thuringiensis* and on its synthesis of an insecticidal endotoxin. (Orosz nyelven) - *Mikrobiol Z.* 61, 40-44.
- Drobniewski, F. A. (1994): The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 101-109.
- Elődi, Pál. (1983): Biokémia. Aminosavak anyagszeréje. - *Akadémiai Kiadó, Budapest.* 543-620.
- Entwistle, P. F., és munkatársai (1993): *Bacillus thuringiensis*, An environmental biopesticide: Theory and practice. - John Wiley & Sons, New York.
- Erdős, Gy., Szlobodnyik, J., Gálffy, Gy. (2001): Módszertani levél a szúnyogok elleni védekezésről. - *EPINFO* 9: 1-47.
- Eriksson, L. B., Hardin, A. M. (1987): Flocculation in Biotechnology and Separation Systems - Attia, Y. A., Ed.; Elsevier Publ., New York.
- Faloci, M. M., Arcas, J. A., Yantorno, O. M. (1986): Influence of various ions in sporulation and the formation of delta-endotoxin in *Bacillus thuringiensis* cultures. [Article in Spanish] - *Rev Argent Microbiol.* 18, 53-62.

- Farm Chemicals Handbook. (1992): Willoughby, OH: Meister Publishing Company.
- Federici, B. A. (1995): The future of microbial insecticides as vector control agents. - *J. Am. Mosq. Control.* 11, 260-268.
- Feitelson, J. S., Payne, J., Kim, L. (1992): *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. - *Bio/Technology.* 10, 271-275.
- Felföldy, L. (1987): A biológiai vízminőség. – *Vízügyi hidrobiológia.* 16, 19-29.
- Fleer, G. J. (1971): Polymer Adsorption and its effect on Colloidal Stability. *Thesis. Wageningen: Agricultural University.*
- Fleer, G. J.; Cohen-Stuart M. A.; Scheutjens, J. M. H.; Cosgrove, T.; Vincent, B. (1993): Polymers at Interfaces. – *Chapman and Hall, London – Glasgow – New York – Tokyo – Melbourne – Madras.*
- Fleer, G. J.; Scheutjens, J. M. H. M. (1993): In: „Coagulation and Flocculation: Theory and Applications”. B. Dobias Ed. *Surfactant Science Series Vol. 47*, Marcel Dekker, 209.
- Gill, S. S., Cowles, E. A., Pietrantonio, P. V. (1992): The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. - *Annu. Rev. Entomol.* 37, 615-636.
- Gregory, J. (1988): Polymer adsorption and flocculation in sheared suspensions. - *Colloids and Surfaces.* 31, 231-253.
- Gregory, J., Lee, S. Y. J. (1990): *Water SRT-Aqua.* 39, 265.
- Guan, X., Chen, J., Huang, Z., Tang, Y., Gao, R. (1998): Batch fermentation and optimization of media for *Bacillus thuringiensis*. - *Chin. J. Biotechnol.* 14, 45-51.
- Heinrich, D., Hergt, M. (1994): Ökológia. (SH atlasz) – *Springer Hungarica kiadó.*
- Horváth, S. (1980): Mikrobiológiai Praktikum. - *Tankönyv kiadó, Budapest.*
- Hušek, P. (1991): Amino acid derivatization and analysis in five minutes. – *1991 Federation of European Biochemical Societies.* 280 (2), 354-356.
- Kertész, K. (1904): A magyarországi szúnyogfélék rendszertani ismertetése. - *Állattani közlemények.* 3, 1-75.
- Klier, A., Rapoport, G. (1987): *Bacillus* larval toxin crystal protein.- *Microbiol Sci.* 9, 247-246.
- Klowden, M. J., Held, G. A., Bulla, L. A. Jr. (1983): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis to adult *Aedes aegypti* mosquitoes. - *Appl Environ Microbiol.* 46, 312-315.

- Klowden, M. J., Bulla, L. A. Jr. (1984): Oral toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to adult mosquitoes. - *Appl. Environ. Microb.* 48, 665-667.
- Kraemer-Schafhalter, A., Moser, A. (1996): Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale batch process. - *Bioprocess Engineering*. 14, 139-144.
- Kuppusamy, M., Balaraman, K. (1991): Fed-batch fermentation studies with *Bacillus thuringiensis* H-14 synthesising endotoxin. - *Indian J Exp Biol.* 29, 1031-1034.
- Lambert, B., Peferoen, M. (1992): Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. – *BioScience*. 42(2), 112-122.
- Lee, H. L., Gregorio, E. R., Khadri, M. S., Seleena, P. (1996): Ultralow volume application of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* for the control of mosquitoes.- *J Am Mosq Control Assoc.* 12, 651-655.
- Liu, W. M., Bihari, V., Bajpai, R. (1995): A carbon-limited medium for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. - *Hindustan Antibiot Bull* . 37, 1-8.
- Magyar Szabvány: EN ISO 6341. (1998): Vízminőség. A mobilitásgátlás meghatározása *Daphnia magna* Strauson. - Akut toxicitási teszt.
- Margalit, J., Dean, D. (1985) The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.).- *J. Am. Mosq. Control.* 1, 1-7.
- Martin, K., Baum, L. (1994): Memorandum to Vicki Skeers. - *Washington Department of Health, Office of Toxic Substances. Re: Use of Foray 48B in Washington State.*
- Mihályi, F. (1939): A szúnyog elleni védekezés entomológiai előkészítése Hévízen – *Állattani közlemények.* 36, 107-117.
- Mihályi, F. (1954): Előzetes vizsgálatok a dunai szúnyogkérdés megoldásához – *Állattani közlemények.* 44, 1-2: 81-86.
- Mihályi, F., Gulyás, M. (1963): Magyarország csípő szúnyogjai. – *Akadémiai kiadó, Budapest.*
- Mihályi, F., Soós, Á., Sztankay, Sz., Zoltai, N. (1953): A Balaton-menti községek szúnyoghelyzete és a gyakorlati védekezés módjai. – *A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Osztályának Közleménye.* 2, 35-94.
- Neidhardt, F. C. (1996): *Escherichia coli* and *Salmonella*. – *American Society for Microbiology Press.* 2,
- Perani, M., Bishop, A. H. (2000): Effects of media composition of delta-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains. - *Microbios*; 101, 47-66.

- Pramatha, R. B. (2000): Hyper-Production of Insecticidal Crystal Protein (δ -endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Is Not Related to Sporulation-Specific Biochemical Functions. - *Current Microbiology*. 41, 187–191.
- Rasnitsyn, S. P., Voitsik, A. A., Iasiukevich, V. V. (1993): The effect of water temperature on the action of bacterial insecticides against mosquito larvae. - *Med Parazitol. (Mosk)* 1, 8-10. (Orosz nyelven)
- Salama, H. S., Foda, M. S., Selim, M. H., El-Sharaby, A. (1983): Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically - active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. - *Zentralbl Mikrobiol.* 138, 553-563.
- Samples, J. R., Buettner, H. (1983): Ocular infection caused by a biological insecticide. - *J. Infectious Dis.* 148 (3), 614.
- Sekar, V., Carlton, B. C. (1985): Molecular cloning of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. – *Gene*. 33, 151-158.
- Shakoori, A. R., Anwar, S., Khurshed, N., Riaz-ul-Haq (1999): Biocidal activity of *Bacillus* species for *Anopheles* larvae. - *Folia Biol. (Krakow)* 47, 143-148.
- Shaw, D. J. (1986): Bevezetés a kolloidkémiaiba. – *Műszaki kiadó, Budapest*.
- Shephard, A. (1951): The chemistry and action of insecticides. – *First. Ed. McGraw Hill Book Comp., New York, Toronto, London*, 504.
- Siegel, J. P., Shaddock, J. A. (1988): Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In de Barjac, H. and D.J. Sutherland. (ed) *Bacterial control of mosquitoes & black flies: Biochemistry, genetics & applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. - *NJ: Rutgers University Press, New Brunswick*.
- Siegel, J. P., Shaddock, J. A. (1990): Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals. - *J. Econ. Ent.* 83(2), 347-355.
- Smith, R. A. (1982): Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. - *Can. J. Microbiol.* 28, 1089-1092.
- Sneath, H. A. P. (1986): Systematic Bacteriology. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. - *Holt, J.G., Ed.; Williams & Wilkins Press, Baltimore*.
- Solementseva, I. M., Tuszupbaev, N. K., Bárány, S. (1980): *Ukrainszkij Khim. Zsurnal.* 46, 929. (Orosz nyelven)
- Straub, F. B. (1982): Biológiai lexikon. – *Akadémiai kiadó, Budapest*.
- Su, T., Mulla, M. S. (1999): Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex*

mosquitoes in microcosms. - *J Am Mosq Control Assoc.* 15, 356-65.

- Szmirnov, V. V., Reznik, Sz. R., Vasziljevskaja, I. A. (1986): Aerob spóráképző baktériumok – *Medicina könyvkiadó, Budapest.*
- Thanabalu, T., Hindley, J., Brenner, S., Oei, C., Berry, C. (1992): Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. - *Appl Environ Microbiol.* 58, 905-910.
- Thiery, I., Hamon, S., Gaven, B., De Barjac, H. (1992): Host range of *Clostridium bifermentans* serovar. *malaysia*, a mosquitocidal anaerobic bacterium. - *J Am Mosq Control Assoc.* 8, 272-277.
- Thomas, W. E. Ellar, D. J. (1983): *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. - *J. Cell Sci.* 60, 181-197.
- Tóth, S. (1977): Quantitative and qualitative investigations into the Culicidae-fauna of the Tisza-basin. – *Tiscia an Ecological Journal.* 12, 93-99.
- Zaritsky, A., Khawaled, K., Barak, Z., Chipman, D. M., Rabi, T. (1986): Biological control of mosquitoes by the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta endotoxin. - *Acta Microbiol Pol.* 35, 207-14.
- Zoltai, N. (1950): Szúnyog és légy elleni DDT-permetezés megszervezése és végrehajtása. – *Az Orsz. Közegészségügyi Int. tájékoztatója. Népj. Min., Budapest,* 11.
- Zoltai, N. (1957): A dunai árterek területek szúnyog-problémája és annak megoldási lehetőségei. – *Egészségtudomány.* 1, 21-30.
- Zoltai, N.; Szabó, J. B. (1968): A Duna Szob-Dunaföldvár közötti szakaszának 10 éves culicoidológiai tapasztalatai. – *Egészségtudomány.* 12, 68-74.
- Váczai, L. (1988): Orvosi mikrobiológia, immunitás, parazitológia.-*Medicina kiadó, Budapest.*
- Walther, C. J., Couche, G. A., Pfannenstiel, M. A., Egan, S. E., Bivin, L. A., Nickerson, K. W. (1986): Analysis of mosquito larvicidal potential exhibited by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. - *Appl Environ Microbiol.* 52, 650-653.
- Wan, M. T., Watts, R. G., Cheng W. (2000): Acute Toxicity of Inorganic Chloramines to *Daphnia magna* in Two Types of Dilution Water. – *Environmental Contamination and Toxicology.* 65, 147–152.
- Ward, E. S., Ellar, D. J. (1988): Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* which encode 130-kilodalton mosquitocidal proteins. - *J Bacteriol.* 170, 727-735.

Ware, G. W. (1983): Pesticides: Theory and application. - *W.H. Freeman and Co., New York.*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék hálás köszönetet mondani:

Feleségemnek Zitának, aki nagyszámú nyelvtani tanácsot adott kézírataim és előadásaim nyelvezetéhez, ezen túlmenően gyakorlatban segített a szúnyoglárva gyűjtésénél;

Lányomnak, Fanninak, aki megadta az értelmét, hogy PhD munkámat védelemmel fejezzem be, valamint sokszor lehetőséget adott a feleségemmel történő közös szúnyoglárva-gyűjtéshez;

Szüleimnek, amiért tanulmányaim, utazásaim és nemzetközi konferenciákon való részvételeim mindvégig anyagilag támogatták;

Témavezetőmnek, Prof Mécs Imrének, hogy az általa vezetett laboratóriumban lehetővé tette a munkámat, azon túl hasznos tanácsokkal, ötletekkel látott el a biotechnológiai kísérletek során, segített azok megtervezésében és az eredmények kiértékelésében, valamint optimizmussal ajándékozott meg;

Témavezetőmnek, Prof. Bárány Sándornak, hogy a Miskolci Egyetem Analitikai Kémiai Tanszékén rendelkezésemre bocsátotta a laboratóriumát, tanácsokkal látott el a flokkulációs kísérletek során, segített ezek megtervezésében és az eredmények értékelésében, a publikációk írásában és nemzetközi konferenciákra hívott meg előadóként;

Barátomnak és munkatársamnak, Dr. Balázs Jánosnak, hogy a szakmai kapcsolatai révén új lehetőségeket nyitott meg munkám során, és hogy hasznos tanácsai, ötletei nélkül nem jöhetett volna létre ilyen formában ez a dolgozat;

Varga Tamásnak, hogy rengeteg számítógépes problémámat mindig nagy nyugalommal végighallgatta, és azonnal megoldotta őket;

Prof. Alföldi Lajosnak, hogy értékes tanácsokkal segítette munkámat;

Dr. Ábrahámné Gulyás Magdolnának az értekezésem kritikus olvasásáért és értékes tanácsaiért;

Zsedényi Sárának, Zsurka Ferencnének, Ambrus Erzsébetnek és Szilágyi Lajosnénak, akiknek a laboratóriumi segítsége nélkül a kísérletek nem készülhettek volna el;

az önzetlen segítségért a szúnyogok adatgyűjtésében segítő társaimnak,

az önzetlen adatszolgáltatásokért Nagy L. Zsoltnak (ATiKöFe), az Alsó-Tisza Vidéki Vízügyi Igazgatóságnak és az Országos Meteorológiai Szolgálatnak;

Skvarla Jirinek (Kassai Műszaki Egyetem Eljárástechnikai és Környezetvédelmi Tanszék) a Bti-baktérium ζ -potenciál méréseiért;

Dr. David Durhamnek a publikációk angol nyelvi lektorálásért;

Prof. Pungor Ernőnek és Prof. Biacs Péternek, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány volt főigazgatóinak, hogy tanulmányaimhoz ösztöndíjat biztosítottak;

Dr. Kálmán Miklósnak, a Bay Zoltán Alkalmazott kutatási Alapítvány Biotechnológia Intézete igazgatójának, hogy kutatásaimhoz a laboratóriumi körülményeket biztosította;

A Bay Zoltán Alkalmazott kutatási Alapítvány Biotechnológia Intézete és a Szegedi Tudományegyetem valamennyi munkatársának, akik munkám sikeréhez bármilyen formában hozzájárultak, különösen azoknak, akik hozzájárultak, hogy használhassam a laborjukban levő számítógépet.

8 TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK:

Megjelent vagy közlésre elfogadott publikációk:

- (1.) Szepesszentgyörgyi, Á., Bárány, S., Mécs, I. (2003): Flocculation of *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis suspension by polyelectrolytes. - microCAD 2003 International Scientific Conference. Proceedings, Ed. University of Miskolc, pp. 101-109. [IF: 0]
- (2.) Szepesszentgyörgyi, Á., Bárány, S. (2003): Flocculation of *Bacillus thuringiensis* suspension and its role in formulation as anti-mosquito agent. - CEREKO '2003. International Scientific Conference. Proceedings, Ed. University of Miskolc, pp. 203-214. [IF: 0]
- (3.) Szepesszentgyörgyi, Á., Bárány, S., Mécs, I. (2005): Flocculation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis suspension and its efficacy against mosquito larvae. - Acta Biologica Hungarica, 56, 1, - 2003, Közlésre elfogadva [IF: 0,416]
- (4.) Bárány, S., Szepesszentgyörgyi, Á.: Flocculation of cellular suspensions by polyelectrolytes. - Advances in Colloid and Interface Science, - 2004, Közlésre elfogadva [IF: 3,311]
- (5.) Szepesszentgyörgyi, Á., Bárány, S., Mécs, I., Skvala, J.: *Bacillus thuringiensis* szuszpenzió flokkuláltatása polielektrolitokkal és tenzidekkel. - Magyar kémiai folyóirat, - 2004, Közlésre elfogadva [IF: 0]

Elbírálás alatt levő kézirat:

- (6.) Szepesszentgyörgyi, Á., Otgonchimeg, Rentsendorj.: Seasonal changes in the mosquito fauna (Diptera, Culicidae) in the city of Szeged in 1999. - Tiscia an Ecological Journal, - 2004, Elbírálás alatt [IF: 0]

Poszterek:

- (1.) Szepesszentgyörgyi, Á., Mécs, I.: *Bacillus thuringiensis* (Bti) fermentáció - szúnyoggyérítés (1998-1999. eredmények). – Budapest, Bay Zoltán Napok, 1999. 11. 12.
- (2.) Szepesszentgyörgyi, Á., Mécs, I.(2000): Szúnyogvizsgálat, *Bacillus thuringiensis* (Bti) fermentáció (1998-2000. eredmények). – Szeged, Bay Zoltán Napok, 2000. 05. 05.
- (3.) Szepesszentgyörgyi, Á., Mécs, I.(2000): *Bacillus thuringiensis* (Bti) fermentáció – szúnyoggyérítés (1999-2000. eredmények). – Budapest, Bay Zoltán Napok, 2000. 11. 03.
- (4.) Szepesszentgyörgyi, Á., Mécs, I.(2001): *Bacillus thuringiensis* (Bti) fermentáció – szúnyoggyérítés (2000-2001. eredmények). – Budapest, Bay Zoltán Napok, 2001. 11. 02.
- (5.) Szepesszentgyörgyi, Á., Mécs, I.(2002): *Bacillus thuringiensis* (Bti) fermentáció – szúnyoggyérítés (2001-2002. eredmények). – Budapest, Bay Zoltán Napok, 2002. 10. 11.

Előadások:

- (1.) Szepesszentgyörgyi, Á., Bárány, S. (2003): Flocculation of *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis suspension by polyelectrolytes. - microCAD 2003 International Scientific Conference. University of Miskolc, Miskolc, March 7-8, 2003.
- (2.) Szepesszentgyörgyi, Á. (2003): A gyálai Holt-Tisza Feketeparti szakaszának csípőszúnyog faunája - Csongrád Megyei Természetvédelmi Egyesület. Szeged, Március 20, 2003.

(3.) Szepesszentgyörgyi, Á., Bárány, S., Mécs, I. (2003): Flocculation of *Bacillus.thuringiensis* suspension and its role in formulation as anti-mosquito agent. - CERECO '2003. International Scientific Conference. Miskolc, April 28-30, 2003.

(4.) Bárány, S., Szepesszentgyörgyi, Á. (2003): Flocculation of cellular suspensions using polyelectrolytes. - XVI. European Chemistry at Interfaces Conference, Vladimir, Russia, 14-18 July, 2003.

(5.) Bárány, S., Szepesszentgyörgyi, Á. (2003): Flocculation of cellular suspensions using polyelectrolytes. - 77th American Chemical Society Colloid and Surface Science Meeting, Atlanta, USA, June 15-18, 2003.

9 SUMMARY

After the springtime flood, there is a humid period along the River Tisza. When the temperature reaches the minimum necessary for the development of mosquitoes (in May), the larvae hatch out from the eggs. In general, the progress of the flood coincides with an increase in daily average temperature. Few mosquito species are present in the flood area. Far from the River Tisza, the local conditions may result in a more diverse mosquito species composition. I found numerous woods-favouring *Aedes sticticus* species and salt-favouring *Aedes dorsalis* species besides *Aedes vexans* species. The salt-tolerant *Aedes dorsalis* species was observed at all sampling sites. The degree of alkaline character of the breeding sites is a feature of this phenomenon. In the middle of summer, the individuals of the *Theobaldia* genus appeared in lower numbers. Few individuals from the *Anopheles* genus could be collected with the human-trap method. I suggest that the individuals of this genus prefer the blood of animals to human blood.

After the stabilization of the optimum temperature, the *Culex* genus individuals emerged in force in the middle of June. The number of their individuals became dominant during the dry summer. *Culex pipiens molestus* dominated at nearly all sampling sites. This result can be explained by the impact of urbanization (the presence of communal waste, the application of chemical fertilizers, the presence of polluted water, weekly chemical anti-mosquito treatment, etc.). In the changed environment, the dominant species appeared at all collecting sites.

Fewer individuals of *Anopheles hyrcanus* were collected in Szeged. In earlier faunistical examinations, this species was not observed in the Tisza basin, but it has recently been found in the mosquito assemblage of the Tisza Lake.

An environmentally-friendly method was applied to study protection against mosquitoes. I studied the fermentation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) bacteria. The possibilities of breeding and spore-forming of Bti bacteria were investigated on a synthetic and a monocomponent culture medium. I optimized the

main component of the synthetic medium. The composition of the synthetic culture medium was supplemented with materials necessary for biosynthesis and with a microelement solution to promote spore formation. A small increase in Bti cell number was observed after the omission of added peptone. Optimization of the carbohydrate component resulted in increased spore formation. The efficacies of Bti biosynthesis and Bti spore formation were not increased by added peptone or by added microelement solution, respectively.

Bti bacteria may be bred in HL culture (Beef-extract nutrient culture) medium with an efficacy of 6.9×10^7 cells/ml. In this case, all the amino acid was utilized. The available amino acids were probably transformed into essential ones.

I developed and studied a culture medium (T_{20}), which from all aspects was optimum. The number of Bti bacteria increased with appropriate efficacy ($3\text{--}5 \times 10^7$ cells/ml) in this medium, and the vegetative cells formed toxic spores (99.9-100 %) without an exogenous component in a short time. An advantage of this medium is that it can be produced through use of an industrial by-product at a relatively low price.

Sugar and free amino acids could not be demonstrated in the T_{20} medium. Bti bacteria probably possess collagen activity besides protein activity. Thus, the amino acids formed from the decomposition of collagen are utilized by the Bti bacteria for biosynthesis in this medium.

The sterile T_{20} medium is alkaline (pH=9.06). At the beginning of fermentation the pH decreases, but after a 16-hour fermentation the pH is increased (pH=9.11). It is presumed that the pH decrease is caused by the organic acid produced by fermentation. The later pH increase in the T_{20} medium is most likely caused by the decomposition of amino acids by desamination or alkaline fermentation of the Bti bacteria.

Concentration of the Bti bacteria fermented in the medium is required for practical application. By measuring the intensity of the scattered laser beam in a flowing system, it has been shown that dilute suspensions of Bti bacteria (that are fermented microbiologically) can be effectively flocculated and concentrated by using different cationic (SNFH528, Percol 1697 and DS grade) and anionic (SNFH 149, SNFH 57, Magnafloc 351 and Magnafloc 1011) polyelectrolytes that are necessary for its formulation. It has also been demonstrated that a maximum and constant (within 7-8 minutes) degree of aggregation can be reached within a 1-2-minute period of contact of the added macromolecules with the cells. The optimum flocculant dosage necessary to reach the maximum degree of flocculation

substantially decreases on increase of the suspension concentration; it ranges between several tenths of 1 mg polymer/million cells to several mg polymer/million. This feature is explained by the influence of kinetic factors and the adsorbed polymer layer structure on the efficiency of flocculation. It has also been observed that adding the optimum polymer dosage in two equal portions enhances the flocculation activity of the flocculant as compared with one-step addition, and the more concentrated (0.1%) polyelectrolyte solution possesses higher flocculation efficiency as compared with the more diluted one (0.01%). Flocculation of cellular suspensions by polymers is a complicated process that can be explained by the adsorption of negatively or positively charged macro-ions on the cell surface with a mosaic structure involving both positive and negative functional groups, taking into account the kinetics of polymer adsorption and the kinetics of aggregation of cells having adsorbed polymers, as well as the possible charge neutralization and polymer bridging mechanisms. It has been shown that cationic polymers accelerate, while anionic polymers decelerate the sedimentation of non-diluted Bti suspensions.

The degree of toxicity for biting mosquito larvae of flocculated Bti suspensions was found to be in the same range as in non-flocculated suspensions, and comparable with the effect of commercial VECTOBAC 12 AS. Flocculation is an effective method for the industrial production of domestically fermented Bti preparation.

The Bti suspension was studied in a form bound on a support. The Bti spores quickly separate from the smooth carrier, and this product is just as toxic for 3rd instant larvae of *Aedes vexans* as the product with free cells.

The toxicity of the Bti spores was compared with that of Bti vegetative cells. The Bti spores were 2600 times more toxic than the vegetative cells for 3rd instant larvae of *Aedes vexans*. The vegetative Bti cells contain only the genetic code of δ -endotoxin, and the vegetative Bti cells are therefore not toxic.

The sensitivities of biting mosquito larvae (*Aedes vexans*) of different ages were compared in biological tests. The 3rd instant larvae were 3 times more sensitive than 4th instant larvae to the Bti spores, and 7.6 times more resistant than 2nd instant larvae.

The toxicity of the Bti spores was also investigated for the *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) species. This species is not related to *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae) systematically. The *Daphnia magna* species was 1500 times more resistant than the biting mosquito larvae to the Bti spores.