

Acta Biol. Debr. Oecol. Hung. 21: 223–232, 2010

CRY4 TOXIN VÍZI HATÁSTARTAM- ÉS LEBOMLÁSVIZSGÁLATA IMMUNOASSAY ÉS *AEDES AEGYPTI* LÁRVATESZT SEGÍTSÉGÉVEL

**TAKÁCS ESZTER – FEJES ÁGNES – FEKETE GÁBOR– DARVAS
BÉLA – SZÉKÁCS ANDRÁS**

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztály,
1022 Budapest, Herman Ottó u.15.

AQUATIC EFFECT DURATION AND DEGRADATION STUDY OF CRY4 TOXIN WITH IMMUNOASSAY AND *AEDES AEGYPTI* LARVAL TESTS

**E. TAKÁCS* – Á. FEJES – G. FEKETE – B. DARVAS – A.
SZÉKÁCS**

Department of Ecotoxicology and Environmental Analysis, Plant Protection
Institute of the HAS, Herman Ottó u. 15., H-1022 Budapest, Hungary

*Corresponding author, e-mail: teszter84@gmail.com

KIVONAT: A csípőszúnyogok elleni biológiai védekezésre a gyakorlatban a *Bti* (*Bacillus thuringiensis* pathovar. *israelensis*) tartalmú szerek használata terjedt el. E készítmények toxintartalmának meghatározása leggyakrabban biológiai hatástartam vizsgálatok segítségével történik, mivel a szúnyogállomány-gyérítés gyakorlatában jelenleg nincs rendelkezésre álló specifikus analitikai módszer az endotoxin mennyiségének kimutatására. Célunk, hogy megfelelő érzékenységgű, sorozatmérésre alkalmas eljárást dolgozzunk ki a Cry4 toxin kimutatására. Jelen munka során a Vectobac WDG granulátum (hatóanyaga Cry4 toxin) hatástartamának és lebomlásának nyomon követése volt a célunk. A laboratóriumi tesztekben a szúnyogok természetes élőhelyeinek megfelelő körülmények közt vizsgáltuk a szer hatását és megmaradó képességét. A Cry4 toxinféhrje kimutatására saját fejlesztésű enzimjelzéses immunoassay (ELISA) módszert alkalmaztunk. A toxin szúnyoglárvákra gyakorolt élettani hatását laboratóriumi biológiai tesztekkel mértük. A kapott adatokból az a következtetés vonható le, hogy a Cry4 toxin hatásosan gátolja a lárvák kifejlődését, de a hatás nagyságban függ a lárvák életkorától és a tenyésztőhelyek jellegétől. A toxin időben való lebomlását sikerült kimutatnunk részben biotesztekkel, részben direkt ELISA módszerrel. Ezen eredmények alapján következtetni lehet a kezelések ismétlésének gyakoriságára az optimális hatás elérése érdekében.

Kulcsszavak: csípőszúnyog, *Bt*-toxin, *Bacillus thuringiensis* pathovar. *israelensis*, ELISA, immunoassay, bioteszt

ABSTRACT: The widespread practice for the biological control of mosquitoes is the use of preparations containing *Bti* (*Bacillus thuringiensis* pathovar.

israelensis). The most common assays of toxin content are biological efficacy tests, as no specific analytical method is available for the present mosquito population density thinning practice to quantitative determination of endotoxin content. Our aim is to develop a detection procedure of sufficient sensitivity, suitable for serial determinations of Cry4 proteins. The aim of the present work was to monitor effect duration and degradation of preparation Vectobac WDG granulate (with Cry4 protein as active ingredient). Efficacy and durability of the preparation were examined in laboratory tests under conditions characteristic to the natural mosquito habitats. An in-house developed enzyme-linked immunoassay (ELISA) was applied for the determination of Cry4 toxin protein content. The physiological effects of the toxin on mosquito larvae were measured in laboratory biotests. It is concluded from the data is that Cry4 toxin effectively prevents larval development, but the effect is highly dependent on the age of the larvae and the breeding place characteristics. Degradation of the toxin was successfully detected partly with biotests and partly with the direct ELISA method. The results allow it to reach conclusion regarding optimal frequency of the treatments in order to reach the optimal effect.

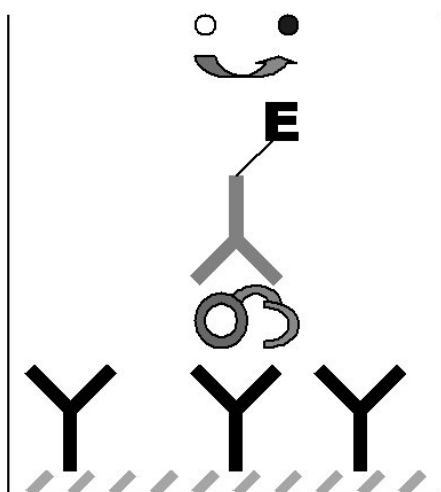
Key words: mosquitoes, *Bt*-toxin, *Bacillus thuringiensis* pathovar. *israelensis*, ELISA, immunoassay, biotest

Bevezetés

A csípőszúnyog elleni védekezésnek alapvetően két módja lehetséges: imágók elleni permetezés (főként szintetikus piretroidok alkalmazásával) a megjelenés helyén; valamint a lárváállomány csökkentése a vizes élőhelyeken. A kivitelezés ellenőrzése és a környezeti kockázatok értékelése miatt mindkét esetben alapvető fontosságú a felhasznált szerek kimutathatósága. A piretroidok, így a hazánkban jelenleg kizárólagosan alkalmazott *deltamethrin* kimutatására is jól alkalmazhatóak a gázkromatográfiás (GC; MS vagy ECD) és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) eljárások (VAYSSE et al. 1984; BAKER és BOTTOMLEY 1982), amelyek alacsony, *deltamethrin* esetén 0,33 ng/l, kimutatási határt eredményeznek (VAYSSE et al. 1984; HUSKOVÁ et al. 2008). A vizsgálatokban kimutatott vegyületek részint analitikai standardok, részint spektrumkönyvtárak (NIST, Wiley) segítségével azonosíthatóak. Szúnyoglárváállomány-gyérítésre lehetőség van egyrészt a juvenoid (juvenilhormon-analóg) *S-methoprene* hatóanyagú készítmények használatával, azonban a nem célzott (*non-target*) szervezetekre gyakorolt jelentős toxicitása miatt az e hatóanyagot tartalmazó készítményeket csak zárt rendszerekben (természetes vizekkel összeköttetésben nem álló területen) lehet alkalmazni (ERDŐS és munkatársai. 2008). A gyakorlatban a *Bti* (*Bacillus thuringiensis* pathovar. *israelensis*) tartalmú szerek terjedtek el. Ez utóbbi szereknél már a hatóanyag mennyiségének megadása is problémákat vet fel. A hagyományos szintetikus készítmények mennyiségét általában egységre vonatkoztatott tiszta hatóanyag-tartalomban lehet megadni (pl. g/l, v/v%, m/m%), míg a baktérium által termelt endotoxin esetén ezt a specifikációt sajnálatos módon már nem kívánják meg az engedélyező hatóságok. Ehelyett az elterjedt mennyiségi jelölés a nemzetközi toxinegyenértékben mért biológiai hatékonyság (International Toxic Units, ITU/mg) használata. Mindez azt jelenti, hogy a – valójában helytelenül – hatóanyagként feltüntetett baktérium mennyiségi jellemzése értelmetlen a vizsgálatok során, hiszen nem a baktérium felelős a hatásért, hanem az általa termelt toxin, így annak mennyisége jellemzi ténylegesen a készítmény várható

hatását. A hatóanyag kimutatására két lehetséges megoldás létezik: 1.) biokémiai eljárás alkalmazásával vizsgálni a Cry4 endotoxin mennyiségét; 2.) biológiai hatástesztben mérni a tényleges aktivitást, meghatározott körülmények között, standardnak tekintett csípőszúnyogfajok alkalmazásával. Mivel jelenleg a szúnyogállomány-gyérítés gyakorlatában nincs rendelkezésre álló specifikus analitikai módszer az endotoxin mennyiségének kimutatására, a meghatározás főként biotesztek segítségével történik (FEKETE és ZÖLDI 2009). Célunk, hogy megfelelő érzékenységű, sorozatmérésre alkalmas eljárást dolgozzunk ki a Cry4 toxin kimutatására.

A Cry toxinok mennyiségi meghatározására jelenleg legalkalmasabb analitikai módszer az enzimjelzéses immunanalitikai (ELISA) eljárás, melyet több endotoxin esetén (Cry1, Cry3), megvásárolható antitest segítségével alkalmaznak (TOMLIN 2000; OESTERGAARD et al. 2007). Az ELISA rendszerek mérési alapelve az, hogy a mérendő anyaggal (célvegyülettel) szemben állati szervezetből (esetünkben nyúlészérből) nyert antitestet alkalmaznak a célvegyület szelektív felismerésére. Az immunanalitikai munka elvégzéséhez ún. direkt ELISA rendszert (1. ábra) kívántunk kidolgozni, mely során a Cry4 toxinra specifikus antitestet fizikai adszorpcióval szilárd fázison (96-üreges mikrotálca üregeinek falán) rögzítjük (érzékenyítés), erre visszük rá a mérendő anyagot (standard vagy mintaoldat formájában), amit az antitest szelektíven megköt. Ezután célszerűen megválasztott jelzőenzimmel (torma peroxidáz) jelzett antitestet (HRP-antitest konjugátumot) kötünk a lemezen megkötött mérendő komponenshez, s a megkötődött enzim mennyiségét szubsztrát (hidrogén-peroxid) és kromofór (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin vagy o-fenilén-diamin) hozzáadásával spektrofotometriás eljárással (492 nm hullámhosszon) mérjük. A módszerre optimált mérési koncentrációtartományban a mért jel (fényelnyelés) arányos a mérendő anyag mintabeli koncentrációjával.



D

C

B

A

1. ábra: A direkt *ELISA* rendszer működési elve. Az ábra 96-üreges mikrotálca egy üregét jelképezi, melybe az immunreagenseket adagoljuk. A kialakuló immunkomplex szerkezete: az üreg falán rögzített Cry4-specifikus antitest (A), Cry4 *Bt* toxin (B) a mintában, enzimjelzett Cry4-specifikus antitest (C), kolorimetriás szubsztrát (D). A szaggatott vonalak mosási lépést jelképeznek az *ELISA* meghatározás kivitelezése során.

A módszer elterjedésének azonban korlátja, hogy jelenleg egyetlen gyártó sem forgalmaz a Cry4 endotoxin kimutatására alkalmas antiszérumot, így azt a mérést végző laboratóriumnak kell előállítania, és tiszta toxin alkalmazásával tesztelni a kimutatás paramétereit. Kiszertelt készítményekből a kimutatás megbízhatóan megvalósítható direkt ELISA eljárással, és bizonyos mértékig környezeti mintákból (állóvíz) is megoldható (SZÉKÁCS és munkatársai 2006).

A szerves és szervesetlen mikroszennyezők víztest és üledék közötti megoszlását részletesen leírták és modellezték (NOWELL et al 1999, CHIOU 2002), ez képezi ezen szennyezők környezeti sorsát, biokoncentrációját és ökotoxikodinamikáját leíró elemzések alapját. Ehhez képest a fehérjék víztest és üledék közötti megoszlása a mai napig nem leírt szakterület. A fehérjék megkötődése montmorillonit kristályokon a talajtan korai időszaka óta ismeretes (ENSMINGER és GIESEKING 1939, PICK 1962). A kötődés erősségét kísérletesen is megmérték különböző fehérjékre, így a Cry4 (LEE et al 2003) és Cry1Ab lektinekre (PAGEL-WIEDER et al 2004), a ricin fehérjére (JAYNES et al 2005), illetve azt is kimutatták, hogy a talaj ásványianyag-tartalma ezen fehérjeadsorptív tulajdonságokon keresztül hatással van a talaj-mikroorganizmusok biológiai aktivitására (FILIP 1971). Ám a víz-üledék megoszlási hányadost a Cry típusú lektinekre nem határozták meg, és más fehérjékre is kevésbé írták le (DING AND HENRICH 2002). A Cry4 fehérje agyagásványhoz való kötődését gyors (30 perc alatt egyensúlyi állapotra jutó) folyamatnak találták, kaoliniton kisebb, montmorilloniton nagyobb kötőerősséggel (LEE et al 2003). A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az ásványkristályon megkötődött Cry4 toxinféhrje megőrizte larvicid aktivitását, és számottevően perzisztensebbnek is bizonyult a szabad toxinnál.

A biológiai hatásvizsgálat során a készítmények ITU-meghatározásához *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) vagy *Culex pipiens pipiens* (Linnaeus, 1758) lárvák használhatóak (DULMAGE, 1981). Az L₃, fiatal L₄ lárvákból ismétlésenként 25 egyedet kell vizsgálni, a meghatározandó minta 5 koncentrációjában. A mortalitási adatokat meghatározott aktivitású (adott ITU/mg) standard okozta pusztulással összevetve állapítható meg a célvegyület biológiai hatékonysága (WHO 2007).

Anyag és módszer

A szúnyogirtásban használt szerek közül a Cry4-toxintartalmú Vectobac WDG hatását laboratóriumi körülmények közt teszteltük az intézet saját tenyészetéből származó 3. stádiumú *Aedes aegypti* lárvákon. A kísérlet beállításakor a természetes csípőszúnyog-tenyészőhelyek körülményeinek reprodukálásához 4 db 15 literes akváriumot használtunk, amelyek közül egyikbe egy hévizi lárvatenyészőhelyről származó iszapot (sok bomló növényi részt tartalmazott) és 15 l, szintén a tenyészőhelyről származó vizet raktunk. Egy másik akváriumba a Körös folyóból származó iszapot és szintén 15 l vizet helyeztünk. A harmadik akvárium kontrollként szolgált, ebbe 15 l csapvizet tettünk. Az akváriumokban a vízhőmérséklet 25 °C, a megvilágítás 16 óra/nap volt.

Ezen kívül, ugyanezen tesztkörülmények között berendeztünk egy szúnyogok nélküli, desztillált vizet tartalmazó másik kontrollakváriumot is, melyben a toxin önálló lebomlását figyeltük meg. Erre azért volt szükség, hogy a természetes vizekben előforduló, az ELISA mérést befolyásoló mátrixhatásokat kiküszöbölhessük.

Az akváriumok berendezése után az akváriumokba – a csapvizet kontrollcsoportot kivéve – 6 mg Bt-készítmény granulátumot szórtunk. Ez a 6 mg / 15 l megfelel a szabadföldi lárváállomány-gyérítéseknél alkalmazott koncentrációnak (0,4 kg/ha). A toxin beszórása után mindhárom akváriumba 30 db L₃ stádiumú lárvát helyeztünk.

A lárvák törmelékekkel és a vízben élő mikroszkopikus szervezetekkel táplálkoztak, emellett a tenyészetben is használt eledelükből – steril, őrölt macskatáp (Whiskas®), ami kiegyensúlyozott, egyenletes ütemű fejlődést biztosít

számukra – is kaptak. A mortalitást kétnaponta ellenőriztük, az ekkor életben lévő egyedeket eltávolítottuk és elöltük. Ezután ismét 30 db L₃ stádiumú lárvát helyeztünk az akváriumokba. A mortalitás mértékét százalékos értékben határoztunk meg (M%).

Az ELISA méréshez vízmintavételre először 2 órával a lárvák és a Vectobac WDG granulátum beszórása után került sor. Minden akváriumból 3-szor 100 ml vízmintát vettünk alkalmanként. A további mintavételek kétnaponta következtek. A minta-előkészítés során minden mintavétel után a mintákat lefagyasztottuk, majd szárazra liofilizáltuk. Ezután a száraz port 1-1,5 ml desztillált vízben feloldottuk és kis műanyagcsövekbe töltöttük, majd újra szárazra liofilizáltuk. A mintákat a mérésig -20 °C-on mélyhűtőben tároltuk.

A Cry4 toxinféherje analitikai kimutatásához korábban kidolgozott ELISA módszerünket (SZÉKÁCS és munkatársai 2006) alkalmaztuk és fejlesztettük tovább. Az ELISA mérés első lépése az érzékenyítés. Ennek során az anti-Cry4 szérumot 1:500 arányban hígítottuk érzékenyítő pufferrel. A szérumot az Evirologix Ltd. cég (Portland, MN, USA) bocsátotta rendelkezésünkre kutatási együttműködés keretében. A második lépés az 1%-os zselatinoldattal történő blokkolás. A mikrotálcát ezután inkubáltattuk, majd mosópufferrel mostuk. E lépés után következett a minták felvitele: a lemez elejére a kalibráló sor került, azután a minták. Ezután a mikrotálcát inkubáltuk, majd a reagensek előntését követően mosópufferrel mostuk. Ezután vittük fel az enzimjelzett Cry4-specifikus antitesteket, majd ismét inkubáció és mosópufferes mosás következett. A kolorimetriás szubsztrátot a kromofórral közös oldatban pipettáztuk a tálcára.

Amennyiben a minta tartalmazott Cry4 *Bt*-toxint, úgy sárgás színreakciót tapasztaltunk a szubsztrátreakció terméke és a kromofór közötti reakció eredményeképpen. E lépés után behelyeztük a lemezt a spektrofotométerbe (iEMS Reader. LabSystems, Helsinki, Finnország) és ötpercenként mértük az optikai elnyelést (abszorbanciát) 450 nm hullámhosszon egészen addig, amíg a standardsorban a maximális abszorbancia 1-1,5 OD-érték fölé nem emelkedett. Ekkor az enzimreakciót 4 N kénsavoldat hozzáadásával leállítottuk. Ezután a mikrotálcát visszahelyeztük a spektrométerbe, 15 percig állni hagytuk, majd 492 nm hullámhosszon mértük a minták abszorbanciáját. A mérés eredményeit Microsoft Excell® programcsomag segítségével értékeltük ki.

Eredmények és értékelésük

Az ELISA mérés továbbfejlesztése során optimalizáltuk a mérést megelőző minta-előkészítési lépést az abban alkalmazott oldásfokozók és segédanyagok tekintetében. Az alkalmazott hatóanyag-standardokat, valamint a liofilizálásnak alávetett vízminták szárított maradékát desztillált vízben, lúgos pufferben és antioxidáns oldásfokozót tartalmazó pufferben egyaránt extraháltuk, majd – semlegesítést követően – ELISA eljárásnak vetettük alá. Emellett a korábbi, Vectobac WDG granulátumkészítményre 0,17 µg/ml kimutatási határ (KH) értéket jelentősen javítottuk, 0,08 ± 0,02 µg/ml értékre. A desztillált vizes és tóvízzel készített mintákból a liofilizációs minta-előkészítési eljárás után nyert betöményített oldatokkal elvégzett ELISA vizsgálatok kimutatták, hogy az alábbi bemérési referenciakonzentrációkon a *Bt*-toxint a vizes mintából meg tudtuk határozni. Az 1. táblázatban feltüntetett adatokból az látszik, hogy a tóvízből készített referenciamintákban a granulált készítményt 0,4 µg/ml koncentráción, sikeresen meg tudtuk mérni. A mérések során csak 22-28%-os kimutatási visszanyerést

sikerült elérni, ez a hatékonysági tényező azonban közel állandónak bizonyult, ezért korrekciós faktorként figyelembe vettük.

Az iszapmintákban a toxin jelenlétét nem tudtuk kimutatni a jelenlévő egyéb szerves alkotók okozta mátrixhatás miatt. A vízből való visszanyerés hibája ugyanakkor tartalmazza az iszapban a fehérje megkötődése által okozott veszteséget, mely a toxinnak a víz-üledék rendszer között beállt gyors (30 perc) egyensúlya miatt állandónak tekinthető. Alacsony visszanyerési hatékonyságot okoz továbbá, hogy a toxinfohérje vélhetően erősen kötődik a liofilizálás után a mintában megmaradt szárazanyag-tartalomhoz, és onnan nehezen oldható vissza.

1. táblázat A liofilizált desztilláltvíz- és tóvízminták visszanyerési paraméterei a direkt *ELISA* mérés eredményei alapján.

Mátrixtípus	Vectobac WDG granulátum		
	Bemérési koncentráció [µg/ml]	Mért koncentráció [µg/ml]	Visszanyerés [%]
Desztillált víz	0,4	0,092 ± 0,023	23 ± 6,6
Desztillált víz	0,2	0,060 ± 0,014	30 ± 10,5
Tóvíz	0,4	0,096 ± 0,012	24 ± 3,9

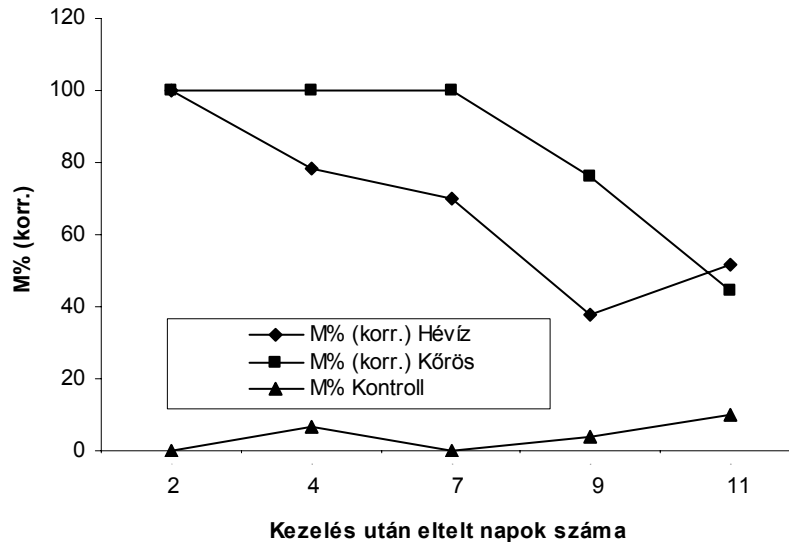
A referenciakonzentrációk méréseinek figyelembevételével, az *ELISA* mérés alapján, valamint a lárvamortalitások alapján a *Bt*-toxint tartalmazó Vectobac WDG granulátum viselkedését a 2. táblázat szemlélteti. A kísérletben azt vártuk, hogy a lárvák mortalitása az első ellenőrzéskor lesz a legmagasabb, mert ekkor a legmagasabb a Cry4 toxin szintje a vízben. A toxin időben való lebomlására, vagy az iszapban való eltemetődésére számítottunk, és ezzel párhuzamosan a mortalitás csökkenését feltételeztük.

A desztillált vizet tartalmazó akváriumban a fő cél az volt, hogy a *Bt*-toxin lebomlását nyomon kövessük, és kimutassuk a toxin időben való lebomlását az *ELISA* módszerrel. A csapvizet kontrollcsoportba nem juttattunk a toxinból, így abban kizárólag a csípőszúnyogok kezelés nélküli mortalitását mértük. Figyelembe kell venni, hogy a rendszer bonyolultsága miatt kezelésenként csak 1-1 akváriumot tudtunk berendezni, ezért a csípőszúnyog lárvák mortalitási adatai önmagukban nem tekinthetők megbízhatónak. Célunk az volt, hogy a toxinn mérési adatokhoz kiegészítő információként biológiai hatástani adatokat tudjunk hozzárendelni, valamint megállapítható legyen az analitikai vizsgálatok szükséges időtartama. Az analitikai mérés jelentős költségigénye, valamint a gyakorlati felhasználás igényeit figyelembe véve a vizsgálatokat 50% alatti mortalitás eléréséig érdemes végezni.

A körösi vizet és iszapot tartalmazó akváriumban is egészen a beállítást követő 9. napig 100% volt a mortalitás, de utána elkezdett nőni a túlélő egyedek száma, és ez az érték az utolsó napra elérte az 50%-ot. A hévízi vizet és avart tartalmazó akváriumban, már a beállítást követő 5. napra 80%-ra csökkent a mortalitás, és ez az érték a beállítás utáni 10. napra 40%-ra csökkent. Az utolsó ellenőrzéskor kapott 57% mortalitást befolyásolhatta, hogy a víz felszínén vastag baktérium-filmréteg alakult ki, ami gátolta a lárvák levegőhöz jutását.

2. táblázat. Az akváriumi tesztek és a direkt ELISA méréssel kapott szerkoncentrációk időbeli alakulása. (* Az alkalmazott Vectobac WDG granulátum koncentrációja a vizes oldatban a mért Cry4 toxinkoncentrációk alapján. ** A legkisebb meghatározható szerkoncentrációt az ELISA módszer kimutatási határa (KH) és a minta-előkészítési lépésben elérhető visszanyerések határozzák meg. KH-közeli vagy KH alatti érték. Zárójelben a biológiai tesztek alapján extrapolált adatok szerepelnek.)

Akvárium / Ellenőrzés	Hévíz	Körös	Csapvizes kontroll	Desztillált vizes kontroll
Kezelés után eltelt napok	15 l víz + iszap	15 l víz + iszap	15 l csapvíz	15 l desztillált víz
0. nap				
Telepítés	30 db lárva	30 db lárva	30 db lárva	–
Mért szerkoncentráció * (µg/ml)	0,39 ± 0,05	0,39 ± 0,09	–	0,40 ± 0,04
2. nap				
Túlélő egyed (db)	0	0	30	–
M%	100	100	0	–
Mért szerkoncentráció * (µg/ml)	0,34 ± 0,05	0,37 ± 0,06	–	0,39 ± 0,05
Újratelepítés	30 db lárva	30 db lárva	30 db lárva	–
4. nap				
Túlélő	6	0	28	–
M%	80	100	6,67	–
Mért szerkoncentráció * (µg/ml)	0,22 ± 0,06	0,32 ± 0,07	–	0,37 ± 0,09
Újratelepítés	30 db lárva	30 db lárva	30 db lárva	–
7. nap				
Túlélő	9	0	30	–
M%	70	100	0	–
Számított szerkoncentráció * (µg/ml)	~ KH ** (0,14)	~ KH ** (0,16)	–	–
Újratelepítés	30 db lárva	30 db lárva	30 db lárva	–
9. nap				
Túlélő	18	7	29	–
M%	40	76,67	4	–
Számított szerkoncentráció * (µg/ml)	< KH ** (0,07)	< KH ** (0,07)	–	–
Újratelepítés	30 db lárva	30 db lárva	30 db lárva	–
11. nap				
Túlélő	13	15	27	–
M%	56,7	50	10	–
Számított szerkoncentráció * (µg/ml)	< KH ** (0,06)	< KH ** (0,06)	–	–



2. ábra. Kontroll mortalitással korrigált mortalitási adatok időbeli ábrázolása. (Mivel a mortalitásméréseket vízközegeként egy-egy akváriumban végeztük, az egyes időpontokhoz szórási adat nem rendelkezhető.)

A mortalitási adatokat összesítve az a következtetés vonható le, hogy a szer hatásosságát jelentősen befolyásolja a vízben található növényzet és szerves anyagok mennyisége. Ilyenkor valószínűleg a lárvák a bőségesebben rendelkezésre álló táplálék miatt kevesebbet fogyasztanak el a toxinból, mint a tápanyagban szegényebb vizekben, és ezáltal kisebb mértékű a szer hatásossága is. Az adatokból kitűnik, hogy többek közt ezen okok miatt van szükség a biológiai védekezés alapos megtervezésére, a tenyészhelyekben található lárvák mennyiségi és minőségi adatainak felmérésére, és a tenyészhely adottságainak felmérésére, mert csak ezeket figyelembe véve számítható ki az adott területen ható vegyszer mennyisége és a kezelések ismétlésének szükséges gyakorisága.

A Cry4 toxin bomlását direkt ELISA módszerrel meghatározva a 2. táblázatban látható eredményeket kaptuk. Az adatok mutatják, hogy a Vectobac WDG granulátum – Cry4 *Bt*-toxintartalom alapján meghatározott – vízbeli koncentrációja a kezdeti 0,4 µg/ml ($0,39 \pm 0,07$ µg/ml) koncentrációról a beállítást követő 2. npra 9,3%-kal, a 4. npra 24,3%-kal csökkent. A 7. napon a toxinkoncentráció az analitikai standard görbe alapján még éppen a KH közelében volt, ám a minta-előkészítési lépésre meghatározott visszanyerések alacsony volta ($25,7 \pm 8,9\%$) miatt ezen KH-közeli értékeket már nem tekintettük megbízhatónak. Ezt követően pedig már a toxinkoncentrációk is az ELISA rendszer kimutatási határa alá estek. A csípőszúnyog-lárvák mortalitási adatai alapján látható, hogy a toxinkoncentráció az ezt követő időszakban is tovább csökken (Az ezen adatok alapján számított koncentrációk dőlt betűvel szerepelnek a táblázatban).

A fentiekből következik, hogy az ELISA módszer által mért koncentrációadatok annak KH értéke alatt is tovább becsülhetők a toxicitási teszt segítségével. Ennek értékelésénél azonban figyelembe kell venni, hogy a szúnyoglárvákon tapasztalható toxicitás nem – vagy nem feltétlenül – arányos a *Bt*-toxin vízbeli koncentrációjával, hiszen a lárvák a toxint az iszapréteg felszínéről is felvehetik az aljzaton való táplálkozásuk során. Ezen tényezőket figyelembe véve

megállapítható, hogy a módszer alkalmas a toxin kimutatására, de környezeti mintákból csak bizonytalansággal terhelve valósítható meg a kimutatás, ezért a módszer további fejlesztésre szorul.

Köszönetnyilvánítás: Jelen munka a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség ÚMFT (GOP-1.3.1-07/1-2008-0049 sz. pályázat) támogatásában részesült. A szerzők köszönetüket fejezik ki Bruce Fergusonnak (EnviroLogix Inc.; Portland, MN, USA) az ELISA kivitelezéséhez szükséges immunreagensekért.

Felhasznált irodalom

- BAKER, P.G. – BOTTOMLEY, P. (1982): Determination of residues of synthetic pyrethroids in fruit and vegetables by gas – liquid and high-performance liquid chromatography. – *Analyst* 107: 206–212.
- CHIOU, C.T. (2002): Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems. – John Wiley & Sons Inc., New York, 257 pp.
- DING, X. – HENRICHS, S.M. (2002): Adsorption and desorption of proteins and polyamino acids by clay minerals and marine sediments. – *Marine Chemistry* 77(4): 225–237.
- DULMAGE, H.T. (1981): Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: BURGESS, H.D. (ed.): *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*. – Academic Press, New York, pp. 193–222.
- ENSMINGER, L.E. – GIESEKING, J.E. (1939): The adsorption of proteins by montmorillonitic clays. – *Soil Science* 48(6): 467–474.
- ERDŐS, GY. – SZLOBODNYIK, J. – ZÖLDI, V. (2008): Tájékoztató az engedélyezett irtószerekről és az egészségügyi kártevők elleni védekezés szakmai irányelveiről. – OEK, Budapest, 324 pp.
- FEKETE, G. – ZÖLDI, V. (2009): A csípőszúnyogok elleni szervezett védekezésben használható készítmények laboratóriumi és szabadföldi vizsgálati módszerei. In: KENYERES, Z. (szerk.): *Pannónia Füzetek 3.: Csípőszúnyogok gyérítésének gyakorlata Magyarországon*. – Pannónia Központ Szakértői és Tanácsadói Koordinációs Kft., Keszthely, pp. 51–56.
- FILIP, Z. (1971): Clay minerals as a factor influencing the biochemical activity of soil microorganisms. – *Folia Microbiologica* 18(1): 56–74.
- HUSKOVÁ, R. – MATISOVA, E. – KIRCHNER, M. (2008): Fast GC-MS pesticide multiresidue analysis of apples. – *Chromatographia Supplement* 68: S49–S55.
- JAYNES, W.F. – ZARTMAN, R.E. – GREEN, C.J. – SAN FRANCISCO, M.J. – ZAK, J.C. (2005): Castor toxin adsorption to clay minerals. – *Clays and Clay Minerals* 53(3): 268–277.
- LEE, L.N. – SAXENA, D. – STOTZKY, G. (2003): Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. – *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 4111–4115.
- NOWELL, L.H. – CAPEL, P.D. – DILEANIS, P.D. (1999): *Pesticides in stream sediment and aquatic biota: distribution, trends, and governing factors*. – Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- PAGEL-WIEDER, S. – GESSLER, F. – NIEMEYER, J. – SCHRÖDER, D. (2004): Adsorption of the *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) on Na-montmorillonite and on the clay fractions of different soils. – *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167(2): 184–188.
- PINCK, L.A. (1962): Adsorption of proteins, enzymes and antibiotics by montmorillonite. – *Clay and Clay Minerals* 9: 520–529.
- OESTERGAARD, J. – VOSS, S. – LANGE, H. – LEMKE, H. – STRAUCH, O. – EHLERS, R.-U. (2007): Quality control of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* products based on toxin quantification with monoclonal antibodies. – *Biocontrol Science and Technology* 17(3): 295–302.
- SZÉKÁCS, A. – JURACSEK, J. – ZÖLDI, V. – FEKETE, G. – FERGUSON, B. (2006): Bti készítmények hatóanyagának kimutatása környezeti mintákból. In: SZÉKÁCS, A. (szerk.): Környezetbarát védekezési technológiák csípőszúnyogok ellen. – MTA-NKI, Budapest, pp. 12–15.
- TOMLIN, C.D.S. (Ed.) (2000): The e-Pesticide Manual 2000-2001 (12th Edition). – The British Crop Protection Council
- VAYSSE, M. – GIUDICELLI, JC. – DEVAUX, P. – L'HOTELLIER, M. (1984): Decis. In: ZWEIG, G. – SHERMA, J. (eds.) Analytical methods for pesticides and plant growth regulators. vol 13. – Academic Press, New York, p. 53.
- WHO (2007): Specifications and evaluations for public health pesticides; *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* strain AM65-52. – World Health Organization, Geneva