

# Az alkoxiszilán megelőző és antimikrobiotikus hatása az *Apis mellifera L.* nyúlós (amerikai) költésrothadását okozó *Paenibacillus larvae*-ra

Szerzők: Asli Özkirim<sup>1,2\*</sup> and Aygün Yalçinkaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Egyetem, Biológia Tanszék, Méhégészségügyi Laboratórium, 06800 Beytepe, Ankara, Törökország.

<sup>2</sup>Hacettepe Egyetem, Méh és Méhtermék Kutató és Applikációs Központ, 06800 Beytepe, Ankara, Törökország.

## Összefoglalás

Ennek a tanulmánynak a célja az volt, hogy megvizsgáljuk egy kvaterner amin tartalmú organoszilikon-só (Si-QAC) hidrolitikus termékének megelőző és antimikrobiotikus hatásmechanizmusát a nyúlós (amerikai) költésrothadás kórokozójára, a *Paenibacillus larvae*-ra, amely világszerte a méhcsaládok pusztulásának egyik fő okozója. A Si-QAC-ot 28 különböző helyi *Paenibacillus larvae* baktériumtörzsön vizsgáltuk, vegetatív és spóra-vegetatív formákon, valamint *P. larvae* ATCC 9545-baktériumtörzsön. A kísérletet négy különböző módon végeztük el a spóra és vegetatív formákon. Az eredmények azt mutatják, hogy a Si-QAC szignifikánsan gátolja a baktérium szaporodását in vitro körülmények között. A kiterjesztett vizsgálatokat zárkás kísérletekkel tettük teljessé, hogy a toxicitás mértékét megállapítsuk. Nem volt észlelhető toxicitás a méheknél, melyek közvetlen vagy közvetett kapcsolatba kerültek a Si-QAC – kal. Eredményeink azt sugallják, hogy a Si-QAC mint fertőtlenítőszer megelőző kezelésként a leghatékonyabb a *P. larvae* ellen.

## Bevezetés

A méhészet fontos mezőgazdasági ágazat nemcsak a méz és méhészeti termékek termelése miatt, hanem a mezőgazdasági területeket érintő beporzás miatt is. A mézelő méhek (*Apis mellifera L.*) egyik legsúlyosabb betegsége a nyúlós költésrothadás (American foulbrood, AFB). Előfordulása nagyon gyakori a törökországi méhcsaládoknál és alapvető veszélytényező a török méhészeti ipar számára. Az AFB kórokozója a *Paenibacillus larvae*, spórás, gram-pozitív, mikroaerofil baktérium. A *P. larvae* jelenlétét kimutatták Törökország méhcsaládjainak  $\leq 20\%$ -ánál (Özkirim and Keskin, 2002). Éveken keresztül végeztek kutatásokat az antibiotikumok kiiktatásával alternatív gyógymódokat keresve az AFB kezelésére (Lauro *et al.*, 2003, Antunez *et al.*, 2004, Özkirim and Keskin, 2005). A méhészetekben a méhek gyakran érintkeznek a lépek és a kaptár felületeivel. Kórokozókat vihetnek be magukkal a kaptárakba kintről, a nektár és pollenforrásokról, vagy más méhcsaládoktól. A kaptárak fertőtlenítése rendkívül fontos ahhoz, hogy a méhcsaládokat megvédjük a kórokozóktól, kivált a tavaszi és őszi időszakban. A lárvák és a fiatal méhek érintkeznek a lépekkel és a kaptár felületekkel, ahol kórokozóknak lehetnek kitéve.

Egyes iparágakban több mint egy évtizede használnak alkoxilánokat kapcsoló közegeként arra, hogy kívánt tulajdonságokat közvetítsenek vagy rögzítsenek különböző anyagokhoz. Ehhez járul hozzá, hogy számos enzimről ismert, hogy biológiailag aktív marad miután alkoxilánokkal szerves felületekhez kötődött (Vetter *et al.*, 2009). Aktivitásuk fennmarad ismételt lemosás után is. A 3-(trimethoxysilyl)-propyldimethyloctadecyl ammonium chloride (Si-QAC) alkoxiszilán, melynek aktivitása a membránokhoz köthető, pl.: membrán lízis, membrán enzim inaktiváció, vagy ion transzport interferencia (Lawrence, 1968). A Si-QAC antimikrobiotikus hatása a membrán funkció megzavarásának tudható be, amit a töltéssel rendelkező kémiai anyag (quaternary ammonium chloride) magas koncentrációja okoz a szubsztráton, lehetséges sejt lízis által (Vetter *et al.*, 2009). Mi

a Si-QAC-nak a *P. larvae* – ra gyakorolt antimikrobiotikus hatásmechanizmusát vizsgáltuk in-vitro és ketreces kísérletekben.

## **Anyagok és módszerek**

### **A *P.larvae* izolálása**

28 *Paenibacillus larvae* baktériumtörzset tenyésztettünk ki Törökország különböző provinciáiból származó olyan fiasításos lépekből, melyek pozitív AFB teszteredményt és a betegség klinikai tüneteit is mutatták, (1. ábra). A méhsejt mintákból vett sejt szuszpenziót két kis üveg lombikba tettük, melyek mindegyike 20ml Brain Heart Infusion Broth (BHI-B) folyékony táptalajt tartalmazott, és 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Miután aktiválódott, a *P. larvae* tenyészetből 0.1 ml-t Brain Heart Infusion Agar (BHIA) –t és Nalidixin savat (3 µg ml<sup>-1</sup>) tartalmazó kémcsőbe tettünk, majd 48 órán át 37°C-on inkubáltuk (Alippi, 1999). A kémcsöveket két napig 4° –on tárolva a *P. larvae* spóra-vegetatív formáit kaptuk.

### ***P. larvae* spóráképződés**

*P. larvae*-t tartalmazó kémcsöveket 10 napon keresztül 4°C-on tartottunk, hogy meginduljon a spóráképződés. A baktériumtenyészeteket 5 ml of BHI-B-be tettük és 10 percig 80°C-on hő kezeltük/termo sokkoltuk. Ezt ötször ismételtük. Az eljárás beindította a spóráképződést, miközben megsemmisítette a többi vegetatív formát. A *P. larvae* spóraformát tartalmazó tenyészeteket használtuk a kísérleteinkben.

### **A Si-QAC megelőző és antimikrobiotikus hatásának tesztelése**

A Si-QAC-ot (melyet az isztambuli Nanotechnology Company szolgáltatott számunkra) 28 különböző helyi *Paenibacillus larvae* baktériumtörzsen vizsgáltuk (beleértve vegetatív és spóra-vegetatív formákat is), valamint *P. larvae* ATCC 9545-baktériumtörzsen (Table 1.). Az összes baktériumtörzset BHI-B Medium (42 gl<sup>-1</sup>, Sigma) folyékony táptalajba oltottuk és egy éjszakán át inkubáltuk. Az inkubálást követően áthelyeztünk 0.1 ml-t (1 × 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) az agar (BHIA) közegbe. A Si-QAC-ot a *P. larvae*-nak mind a vegetatív, mind a spóra alakján elvégeztük. Sulbactam-ampicillint(SAM) használtunk pozitív kontrollként (Özkirim and Keskin, 2005) és három Petri csészét negatív kontrollként (kizárólag a baktériummal). Az összes csészét 48 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Ahhoz, hogy a Si-QAC *P. larvae* – ra gyakorolt megelőző/prevenációs hatásmechanizmusát mérni tudjuk, a Petri csészéket 1ml steril sóoldattal (0.9% NaCl) mostuk le majd steril vattával töröltük. Miután a baktériumtenyészetnek a sóoldatban lévő összes sejtjét a mikro-tubusba gyűjtöttük, a vattákat az oldatba tettük. Az oldatból kivettünk 0.1 ml-t, majd heamocytométerrel sejtszámlálást végeztünk és az eredményt a negatív kontrol baktériumszámával vetettük össze.

A papírkorong diffúziós módszert (Antimicrobial Disc Susceptibility Test) használtuk (NCCLS, 1997) a Si-QAC antimikrobiotikus aktivitásának mérésére (Madigan et al., 2009). Steril itató papírból készült, 35 mm átmérőjű antibiotikus korongokat használtunk. Miután beoltottuk 0.1 ml *P. larvae* oldattal, a papír korongokat a Petri csészék közepére helyeztük, majd beoltottuk 0.5 ml Si-QAC oldattal. Az összes csészét 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk.

Egy one-way ANOVA (p <0.05) tesztet használtunk a Si-QAC megelőző és antimikrobiotikus hatásmechanizmusának összehasonlítására a *P. larvae* összes formájával szemben. A Wilcoxon rank-sum tesztel határoztuk meg a CFU különbségek szignifikanciáját (p <0.05) a *P. larvae* összes formája és a kontrol csoportok között. Egy one-way ANOVA (p <0.05) és egy Duncan teszt szolgálta a Si-QAC korongok gátlási zónái közötti szignifikáns eltérések mérését a *P. larvae* összes formájánál és a pozitív kontrolnál. A korongok átmérője nem szerepelt a statisztikai elemzésekben felhasznált adatok között.

## A toxicitás mérése laboratóriumi zárkákkal

Összesen 20 zárkát használtunk, egyenként 50 fiatal méhvel. 10 zárka volt a kezeléssel, 10 zárka pedig kontrol csoportként szolgált, bármiféle vegyszer vagy fertőtlenítőszer hozzáadása nélkül. A kezeléshez használt fa alapanyagú zárkák minden oldalalára használatuk előtt Si-QAC oldatot (1% w/v) permeteztünk 10 ml Si-QAC / 200cm<sup>2</sup> felület arányban. 10 perc száradási idő eltelte után 50 fiatal méhet helyeztünk a zárkákba. A zárkákat 18 napon keresztül tartottuk megfigyelés alatt. A zárkákban lévő méheket naponta 5 ml fecskendőből adagolt cukorsziruppal és 3 g pollen lepénnyel etettük. Az elhullást 2 naponta regisztráltuk. A zárkás kísérletek célja a Si-QAC méhekre való toxicitásának meghatározása volt.

## Eredmények

### In vitro laboratóriumi kísérletek

Az in vitro laboratóriumi kísérletek kimutatták, hogy a Si-QAC-nak antimikrobiotikus hatása van és ez a hatás különbözik a *P. larvae* különböző formáinak (spóra, spóra-vegetatív, vegetatív) esetében (one-way ANOVA,  $R^2 = 0.061$ , megengedett eltérés /degrees of freedom [df] = 4,  $p = 0.02$ ). A Si-QAC-kal kezelt Petri csészékben (CFU ml<sup>-1</sup>) a sejtszámok szignifikáns eltérést mutattak a kontrol csoportokhoz képest a *P. larvae* összes formájánál (Wilcoxon rank-sum teszt,  $Z = 11.65$ ,  $p = 0.001$ ) (2. Ábra). A CFU ml<sup>-1</sup> redukciós értékei a spóra, spóra-vegetatív, és vegetatív formáknál hasonlóak voltak. Ezzel összhangban, a kísérleti csoportok között sem voltak eltérések (one-way ANOVA,  $R^2 = 0.07$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.66$ ).

A Si-QAC antimikrobiotikus hatását a korongokat körülvevő gátlási zónák analizálásával mértük. Nem találtunk különbséget a *P. larvae* három formájánál (one-way ANOVA,  $R^2 = 0.05$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.75$ ). Ezzel ellentétben a kísérleti csoportok és a pozitív kontrol (Table 3) adatait összehasonlítva a pozitív kontrol (SAM) jelentősen nagyobb antimikrobiotikus hatást mutatott a *P. larvae* vegetatív és spóra-vegetatív formáinál (one-way ANOVA,  $R^2 = 4$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.001$ , és Duncan ábra).

### In vivo zárkás kísérletek

Az in vivo zárkás kísérletek nem mutattak statisztikailag kimutatható eltérést a Si-QAC-al kezelt, és a kontrol zárkákban észlelt elhullási ráták között (one-way ANOVA,  $R^2 = 0.6$ ,  $p = 0.43$ ). Megfigyeléseink szerint a zárkánként elhelyezett 50 fiatal méh kb. 3,5 ml cukorszirupot és 1,8 g pollen lepényt fogyasztott el naponta. A két csoport összehasonlításának eredményei azt mutatták, hogy korreláció áll fenn a grafikon ívei között. Így a Si-QAC nem mutatott toxikus hatást a mézelő méhekre (Fig. 1).

## Értékelés

Ez az első olyan publikáció, amely az alkoxiszilánok megelőző és antimikrobiotikus mechanizmusairól közöl adatokat mezőgazdasági kutatásban. Megvizsgáltuk a Si-QAC *P. larvae*-ra gyakorolt megelőző hatását, és a három csoport eredményeinek összehasonlítása azt mutatja, hogy a Si-QAC a baktérium spóra-vegetatív és vegetatív formáira van legnagyobb megelőző és antimikrobiotikus hatással. Fertőzéskor minden spóra vegetatív formává válik, ezután tudja megfertőzni a mézelő méh lárváit. Ez a folyamat a kaptáron belül játszódik le, ami a legmegfelelőbb közeg a *P. larvae* szaporodásához (Genersch, 2010). A csírázás kezdetekor kalcium-dipikolinát szabadul fel a spórafalonon. Lehetséges, hogy a spórafal e változása teszi lehetővé a Si-QAC nagyobb antimikrobiotikus hatékonyságát a *P. larvae* spóra-vegetatív és vegetatív formáira. Habár a Si-QAC hatékony a vegetatív formákra, a *P. larvae* vegetatív formái jobbra a lárvák belsejében fejlődnek (de Graaf et al., 2006), így nem

valószínű, hogy a Si-QAC ezzel a formával érintkezne a kaptárban. Az AFB gyors terjedésének legnagyobb veszélyét azonban a spóra-vegetatív formák hordozzák.

A Si-QAC-ot a *P. larvae* három formáján (spóra, vegetatív, és spóra-vegetatív) két módszerrel próbáltuk ki, amelyek a fertőzés kaptáron belüli terjedési módjainak feleltek meg. A méhészek használhatják a Si-QAC-ot a méhészetben használt felszerelések – kaptárak, műlépek, viasz, stb. - megtisztítására. Megfigyeltük, hogy a Si-QAC antimikrobiotikus hatást fejtett ki mindkét kísérleti csoport esetében. Az első csoportban a bakteriális fertőzést követően applikáltuk a Si-QAC-ot. Meggyőződésünk szerint a Si-QAC alkalmazásakor befedte a baktérium sejteket és megváltoztatta a BHI-B táptalaj kémiai összetételét és ozmotikus nyomását. Ismert, hogy a *P. larvae* microaerofil baktérium (Loncaric et al., 2009), így ezeket a változásokat nem tudta elviselni a táptalajban és nem fejlődött. A második csoportban a közeget elsődlegesen kezeltük Si-QAC-kal amerikai nyúlós költésrothadás ellen, és később oltottuk be a baktériummal. Más tanulmányok szerint a Si-QAC felületmegkötő képessége akadályozza meg a *P. larvae* spórás vagy vegetatív formájának penetrációját a BHI-B talaj felületén. Mindemellett feltételeztük, hogy a Si-QAC korlátként működik a baktérium és a közeg között. A Si-QAC jelenléte megakadályozta a *P. larvae*-t abban, hogy elérje a közeget és így táplálkozni tudjon, végső soron a baktériumok pusztulását okozva ezzel.

Hogy megvizsgáljuk a Si-QAC gyakorlati alkalmazásának méhészeti módszereit kipróbáltuk a permetezési és az elkenési eljárásokat. Ezeket összehasonlítva úgy találtuk, hogy 1 mL Si-QAC oldat hatásosabb, ha permetezve van. Feltételezésünk szerint a permetezés a felületeket apró cseppekkel vonja be, ami gyors száradást tesz lehetővé. Ráadásul az oldat így eléri a kaptár minden félreeső pontját is, növelve a megelőző és antimikrobiotikus hatást.

A Si-QAC antimikrobiotikus hatásmechanizmusát a korong diffúziós módszerrel (NCCLS, 1997; Madigan et al., 2009) is vizsgáltuk. A korong körüli gátlási zóna megjelenése a termék antimikrobiotikus hatását tanúsítja melynek erőssége a zóna átmérőjén alapszik (Black, 2008). Ez a tanulmány támogatja a hipotézist, mely szerint a Si-QAC antimikrobiotikus hatása a membrán funkció megzavarásának tudható be, amit a töltéssel rendelkező kémiai anyag (quaternary ammonium chloride) magas koncentrációja okoz a szubsztráton, lehetséges sejt lízis által (Vetter et al., 2009). A legnagyobb mértékű antimikrobiotikus hatást a *P. larvae* vegetatív formáinál találtuk. Amíg a Si-QAC a legnagyobb hatást a vegetatív formákra gyakorolta, a fertőzést a spóraformák terjesztik (Gillard et al., 2008). Így a zóna átmérőknek a pozitív kontrollal (SAM) való összehasonlítása alapján a Si-QAC kezelés az AFB antibiotikus kezelésének alternatívájaként nem jöhet számításba.

A zárkás kísérleteknél az 1% (w/v) Si-QAC oldattal való közvetlen érintkezés nem okozott toxicitást a méheknél. Ez a tanulmány hangsúlyozta, hogy a Si-QAC a bakteriális szaporodást csíraölő/biocid és biofizikai hatásmechanizmusával csak közvetlenül azokon a helyeken akadályozza, ahova felhordták (Vetter et al., 2009). Másrészt az eredmények azt mutatják, hogy a Si-QAC-nak fontos szerepe lehet a *P. larvae* szaporodásának megakadályozásában. Bár akár egyetlen spóra önmagában is képes szaporodni, a Si-QAC használata az AFB fertőzés kialakulásának esélyét csökkenti a kaptárokban. Továbbá, közölt adatok szerint, organoszilikonos kezeléssel a fa páratartalommal kapcsolatos alakváltozása kiküszöbölhető (Vetter et al., 2009), ami a Si-QAC gombásodást gátló hatását is sugallja a világon általánosan használt fa alapanyagú kaptároknál. Feltételezhető, hogy Si-QAC 1% (w/v) oldat alkalmazásával, főleg tavasszal és ősszel, védelmet lehet nyújtani a méhcsaládok számára a kaptárakban lévő magas páratartalom által okozott bakteriális és gombás megbetegedések ellen. Bár ilyen kísérleteket még nem végeztek, ebből kifolyólag valószínű, hogy a Si-QAC nagyobb hatékonyságot mutatna terepen. Mindemellett más tanulmányok kimutatták, hogy a Si-QAC oldat antimikrobiotikus hatással rendelkezik más gyakori baktériumokra is (Lawrence et al.,

1968). A Si-QAC megelőző jellegű, preventív fertőtlenítőszerként való használata a méhészetben a széleskörűen használt antibiotikumok ellen rezisztenssé vált kórokozók ellen és a méhészeti termékek szermaradvány tartalmának csökkentése miatt fontos.