



**Budapesti Corvinus Egyetem**  
**Élelmiszertudományi Kar**



GYÜMÖLCSÖK ÉS ZÖLDSÉGEK ROMLÁSÁT OKOZÓ  
*PENICILLIUM EXPANSUM* GÁTLÁSA ÉLESZTŐGOMBÁKKAL

TACZMANNÉ BRÜCKNER ANDREA

Budapest, 2005

## **A doktori iskola**

- megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola
- tudományága:** Élelmiszertudományok
- vezetője:** Dr. Fekete András  
Egyetemi tanár, az MTA doktora  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar  
Fizika és Automatika Tanszék
- Témavezető:** Mohácsiné dr. Farkas Csilla  
Egyetemi docens  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar  
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2005. február 22-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

Farkas József, MHAS

**Tagjai**

Kiss István, DSc

Kovács Etelka, DSc

Dobolyi Csaba, CSc

**Opponensek**

Beczner Judit, CSc

Kollár Gábor, CSc

**Titkár**

Lehoczkiné Tornai Judit, CSc

<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>7</b>
<b>2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>9</b>
2.1. GYÜMÖLCSÖK ÉS ZÖLDSÉGEK ROMLÁSA TÁROLÁS SORÁN	9
2.1.1. Tárolás alatti veszteségek	9
2.1.2. Mikrobiális eredetű romlás	10
2.1.3. Romlást okozó penészek	11
2.2. <i>PENICILLIUM EXPANSUM</i>	12
2.2.1. <i>Penicillium expansum</i> morfológiai jellemzése	13
2.2.2. Fiziológiai tulajdonságok	14
2.2.2.1. Növekedéshez szükséges tápanyagforrások	14
2.2.2.2. Környezeti tényezők hatása a növekedésre	14
2.2.3. Anyagcsere / másodlagos metabolitok	14
2.2.3.1. Patulin	15
2.2.4. A <i>Penicillium</i> -ok okozta romlás tünetei	16
2.3. ZÖLDSÉGEK ÉS GYÜMÖLCSÖK MIKROBIOLÓGIAI ROMLÁSÁT GÁTLÓ/MEGELŐZŐ ELJÁRÁSOK	17
2.3.1. Termesztés hatása	17
2.3.2. A szüret és a betárolás hatása	18
2.3.3. Tárolás során alkalmazott eljárások hatása	19
2.3.3.1. Hűtés, hűtőtárolás	19
2.3.3.2. Szabályozott/módosított légterű tárolás	20
2.3.3.3. Vegyszeres kezelések	21
2.3.3.4. Hőkezelés	23
2.3.3.5. Egyéb kezelések	24
2.4. BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉS	25
2.4.1. <i>Biológiai védekezésről általában</i>	25
2.4.2. <i>Biológiai védekezés helye</i>	25
2.4.2.1. Termesztés	25
2.4.2.2. Tárolás	27
2.4.2.3. Feldolgozás	29
2.4.3. <i>Antagonista szervezetek által kifejtett gátlás hatásmechanizmusa</i>	30
2.4.3.1. Tápanyagért, térért való versengés	30
2.4.3.2. Antibiózis	31
2.4.3.3. Parazitizmus	32
2.4.3.4. A növény ellenállóképességének növelése	33
2.4.4. <i>Antagonista szervezetek kiválasztása</i>	33
2.4.5. <i>Antagonista hatást befolyásoló tényezők</i>	35
2.5. BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉSSSEL KOMBINÁLT KEZELÉSEK	36
2.6. BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉSSSEL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	38
2.6.1. <i>Mikroorganizmusok izolálása, antagonista szervezetek kiválasztása</i>	38
2.6.2. <i>Antagonista szervezet hatékonyságának vizsgálata</i>	39

2.6.3.	<i>Hatásmechanizmus vizsgálati módszerei</i> .....	40
2.6.3.1.	Versengés vizsgálata .....	40
2.6.3.2.	Antifungális vegyület képzésének vizsgálata .....	41
2.6.3.3.	Parazitizmus vizsgálata .....	42
2.6.3.4.	A növény ellenállóképességének javítására irányuló hatás kimutatása .....	43
2.6.3.5.	Antagonista szervezet ipari, mezőgazdasági alkalmazhatóságának vizsgálata.....	43
<b>3.</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>46</b>
3.1.	A VIZSGÁLATOKHOZ FELHASZNÁLT TÁPKÖZEGEK.....	46
3.2.	A VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT MIKROORGANIZMUSOK.....	47
3.3.	A VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK .....	48
3.3.1.	<i>Élesztőtörzsek almáról történő izolálása, identifikálása</i> .....	48
3.3.2.	<i>Penicillium expansum fejlődését gátló élesztőtörzsek kiválasztása</i> .....	49
3.3.3.	<i>Antagonista élesztőtörzsek gátló hatásának vizsgálata, és összehasonlítása</i> .....	49
3.3.4.	<i>Kluyveromyces lactis gátló hatásmechanizmusának vizsgálata</i> .....	50
3.3.4.1.	Sejtmentes szűrlet hatásának vizsgálata .....	50
3.3.4.2.	Killertoxin képzés vizsgálata.....	50
3.3.4.3.	<i>Kluyveromyces lactis</i> által termelt gáznemű anyagok hatásának vizsgálata.....	51
3.3.4.4.	Mikroszkópos vizsgálat .....	53
3.3.4.5.	<i>Kluyveromyces lactis</i> szaporodásának vizsgálata két különböző tápközegen .....	53
3.3.5.	<i>Élesztőgomba Penicillium expansum törzsek patulin termelésére kifejttet hatásának vizsgálata</i> .....	53
3.3.6.	<i>Kombinált kezelés hatásának vizsgálata</i> .....	54
3.3.6.1.	Módosított atmoszféra és antagonista élesztő alkalmazásának vizsgálata.....	54
3.3.7.	<i>In vivo kísérletek</i> .....	55
3.3.7.1.	Almás tápközegen végzett kísérletek.....	55
3.3.7.2.	Almán végzett kísérletek .....	55
3.4.	STATISZTIKAI MÓDSZEREK .....	56
<b>4.</b>	<b>EREDMÉNYEK</b>	<b>57</b>
4.1.	<i>PENICILLIUM EXPANSUM FEJLŐDÉSÉT GÁTLÓ ÉLESZTŐTÖRZSEK KIVÁLASZTÁSA</i> .....	57
4.2.	<i>ANTAGONISTA ÉLESZTŐTÖRZSEK GÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA</i> .....	58
4.2.1.	<i>Három biokontroll élesztőtörzs gátló hatásának elemzése</i> .....	58
4.2.1.1.	<i>Penicillium expansum</i> törzsek összehasonlítása a gátlás szempontjából.....	58
4.2.1.2.	Antagonista élesztő szuszpenzió koncentrációjának hatása a gátlásra .....	60
4.2.1.3.	Különböző tápközeg alkalmazásának hatása a penész gátlásra .....	61
4.2.1.4.	Antagonista élesztők gátló hatása a tárolási hőmérséklet függvényében.....	61
4.2.2.	<i>Almáról izolált és törzsgyűjteményből származó Metschnikowia pulcherrima gátló hatásának összehasonlítása</i> .....	63
4.2.3.	<i>Kluyveromyces lactis és ismert antagonista élesztőtörzsek gátló hatásának összehasonlítása</i> .....	65
4.2.3.1.	Különböző <i>Kluyveromyces lactis</i> törzsek hatékonyságának összehasonlítása .....	65
4.2.3.2.	<i>Kluyveromyces lactis</i> Y00260 hatékonyságának ismert antagonista törzsek gátló hatásával történő összevetése .....	65

4.3. A <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> <i>PENICILLIUM EXPANSUM</i> -RA KIFEJTETT GÁTLÁSÁNAK HATÁSMECHANIZMUSA ...	67
4.3.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> által termelt anyagok hatása .....	67
4.3.1.1. Antibiotikus anyagok termelése .....	67
4.3.1.2. Killertoxin képzés .....	67
4.3.1.3. Illékony és gáznemű komponensek hatása .....	68
4.3.2. Élesztősejtek jelenlétének közvetlen hatása a konidium csírázásra .....	73
4.3.3. Tápközeg összetétel befolyása <i>Kluyveromyces lactis</i> szaporodására .....	74
4.4. AZ ÉLESZTŐGOMBÁK HATÁSA <i>PENICILLIUM EXPANSUM</i> TÖRZSEK PATULIN TERMELÉSÉRE .....	75
4.5. KOMBINÁLT KEZELÉSEK ALKALMAZÁSA .....	76
4.5.1. Módosított atmoszférás tárolás és antagonista élesztő együttes hatása a <i>Penicillium expansum</i> -ra ....	76
4.5.2. A kis tárolási hőmérséklet és az antagonista élesztő együttes hatása .....	77
4.6. IN VIVO KÍSÉRLETEK ÉRTÉKELÉSE .....	78
4.6.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> és almáról izolált <i>Metschnikowia pulcherrima</i> gátló hatékonysága gyümölcsöt modellező tápközegen .....	78
4.6.2. <i>Kluyveromyces lactis</i> gátló hatékonysága almán .....	80
<b>5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK</b>	<b>82</b>
<b>6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b>	<b>86</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>87</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>88</b>
<b>1. MELLÉKLET – FELHASZNÁLT IRODALOM</b>	<b>89</b>
<b>2. MELLÉKLET – ÉLESZTŐ IZOLÁTUMOK ÉS <i>P. EXPANSUM</i> KÖLCSÖNHATÁSA</b>	<b>99</b>
<b>4. MELLÉKLET – GÁTLÁS ABSZOLÚT ÉRTÉKE</b>	<b>103</b>
<b>5. MELLÉKLET – STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS TÁBLÁZATAI</b>	<b>104</b>
<b>6. MELLÉKLET – ÉLESZTŐGOMBÁK GÁTLÓ HATÉKONYSÁGA KÉPEKBEN</b>	<b>109</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>113</b>

## 1. BEVEZETÉS

Gyümölcsök és zöldségek betakarítását követően jelentős veszteségek léphetnek fel, melyek mértékének pontos, számszerű meghatározása nehéz, mivel nagyon sok tényező komplex hatásaként alakulnak ki, valamint nincsenek általánosan elfogadott módszerek a veszteségek értékelésére (FAO, 1989). A World Resources Intsitude ezeknek az ún. postharvest veszteségeknek a mértékét 10 és 40% között határozta meg (WORLD RESOURCES, 1998), de szinte minden területen – országok, betakarítást követő fázisok, különböző termények – találunk egyedülálló példákat szélsőséges (0 vagy 100%-os) veszteségre is (FAO, 1981).

A friss termények minőségi jellemzőinek romlása, amelyek közül a termelő, a kereskedő, illetve a fogyasztó számára elsődleges a megjelenés, az állomány, az íz és az illat, valamint a tápérték (KADER, 1985), komoly gazdasági veszteséget jelent. Mindenek előtt figyelembe kell venni, hogy a postharvest veszteségekért nagymértékben felelős mikrobiális – kertészeti termények esetén főként penészes – romlás nemcsak gazdasági veszteséget okoz, hanem élelmiszer-biztonsági szempontból is kockázatot jelent.

A mikroorganizmusok okozta fertőzésekkel és romlással szembeni védekezésre a termesztés és a tárolás során különböző eszközök, eljárások állnak rendelkezésre. Ezek közül nagyon elterjedt a különböző kémiai vegyszerek (fungicid kezelések) alkalmazása. Ezekkel szemben azonban mind fogyasztói, mind tudományos téren komoly aggályok léptek fel. Ezen túlmenően, pl. az Egyesült Államokban egyes fungicid hatású vegyszereket be is tiltottak, és a későbbiekben is további vegyszerek használatának visszaszorítására, alkalmazott mennyiségének csökkentésére törekednek (WISNIEWSKI and WILSON, 1992). Ez a tendencia szükségessé tette újabb eljárások kutatását, amelyek részben vagy egészben alkalmasak a vegyszeres kezelések kiváltására.

Az utóbbi évtizedekben terjedt el a gyümölcs-, zöldség-, és gabonátárolás területén a biológiai védekezés (biocontrol) fogalma, majd gyakorlati alkalmazása, mely alapvetően olyan mikroorganizmusok – elsősorban élesztőgombák és baktériumok – felhasználását jelenti, melyek antagonista hatásuk következtében gátolják a penészgombák növekedését, szaporodását. A védekező élesztőgombák, baktériumok – a szakirodalom szerint – többnyire olyan terményekről származnak, amelyen a romlást okozó penészt gátolni kívánják. Ezáltal alkalmazásuk gyakran egy-egy gyümölcs-, vagy zöldségfajtára, földrajzi területre korlátozódik.

A biokontroll hazánkban csak a növénytermesztés területén az integrált növényvédelem részeként ismert. Élő antagonista szervezetek postharvest veszteségeket csökkentő hatásával

kapcsolatos külföldön elért biztató eredmények arra ösztönöznék, hogy a magyar gyümölcs- és zöldségtárolásban is ismertté és megvalósíthatóvá tegyük ezt az eljárást.

### Célkitűzések

1. A nemzetközi szakirodalom bemutatása gyümölcsök és zöldségek tárolás során bekövetkező romlására, a romlást akadályozó eljárásokra – különös tekintettel a biológiai védekezésre, annak vizsgálati módszereire – vonatkozóan.
2. *Penicillium expansum* növekedését, szaporodását gátló élesztőgomba kiválasztása: egyrészt „hagyományos” úton, gyümölcstről származó izolátumok; másrészt nem gyümölcstről származó élesztőgomba fajok közül.
3. A kiválasztott élesztő izolátum, vagy törzs antagonista hatékonyságának, hatásmechanizmusának és gyakorlatban (gyümölcsön, gyümölcs tárolási gyakorlatot modellező körülmények között) való alkalmazhatóságának vizsgálata.

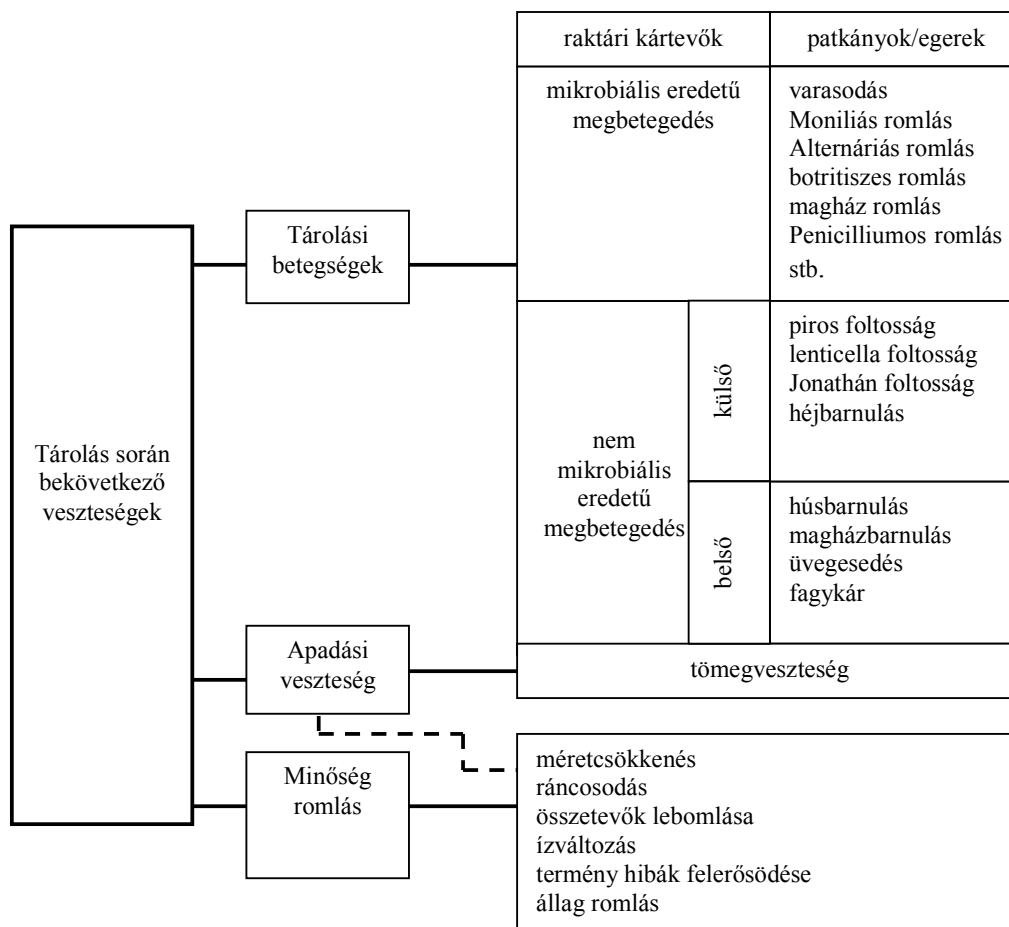


## 2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

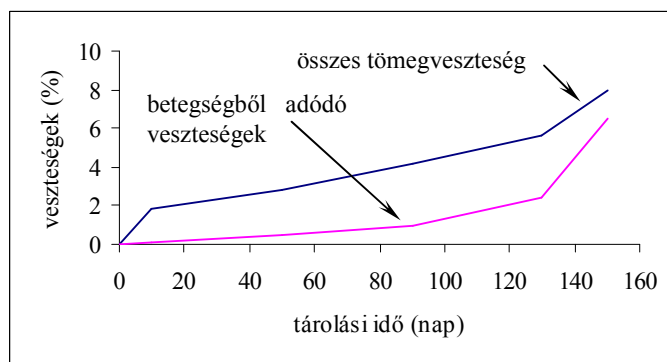
### 2.1. Gyümölcsök és zöldségek romlása tárolás során

#### 2.1.1. Tárolás alatti veszteségek

A gyümölcsök, zöldségek, egyéb termények tárolása során különböző okokból kifolyólag adódhatnak veszteségek (1. ábra). A veszteségek nagy hányadát a légzésből és párologtatásból adódó tömegveszteség adja. Ennek mértéke a tárolási idő függvényében nő. Jelentős tárolási veszteségek adódhatnak különböző mikrobiális illetve nem-mikrobiális eredetű megbetegedések miatt (2. ábra). Optimális tárolási körülmények között ez utóbbi csupán az összes tömegveszteség 20%-át teszi ki (OSTERLOH, 1996), de a világ számos helyén komolyabb – tárolási betegségekhez kapcsolódó – veszteségekről számolnak be. Ez abból is adódhat, hogy míg a tömegveszteségek egyenletesen növekednek, addig a betegségek a tárolás során gyakran hirtelen, nem ellenőrizhető módon lépnek fel, ezáltal az összveszteségek meghatározó tényezőjévé válnak (URBAN, 1996).



1. ábra Gyümölcsök tárolása során bekövetkező veszteségek csoportosítása (OSTERLOH, 1996)



2. ábra A gyümölcsök tárolása során bekövetkező veszteségek lefutása az idő függvényében (OSTERLOH, 1996).

### 2.1.2. Mikrobiális eredetű romlás

Zöldségek és gyümölcsök mikroorganizmusokkal történő megfertőződését, valamint azt, hogy a fertőzésből kialakuljanak a romlás tünetei, a növénykórokozó szervezetek virulencia faktorai és a növényi szövet természetes védekező mechanizmusa közötti bonyolult kölcsönhatás határozza meg. Két lehetőség áll fenn, miután a mikroorganizmus a termés felületére kerül: elszaporodik a gazdaszervezeten – romlást okoz, vagy a gazdaszervezet védekező mechanizmusa következtében nem okoz kárt. A legtöbb mikroorganizmus csak seben, vagy valamely nyitott csatornán (pl. légzőnyílás) keresztül tud behatolni a zöldségbe, illetve a gyümölcsbe. Néhány kivételes esetben – pl. *Botrytis cinerea* uborkán, vagy *Colletotrichum* fajok paradicsomon és paprikán – tapasztaltak csak olyat, hogy az ép kutikula rétegen képes áthatolni a patogén gomba (ADIKARAM et al., 1983; ELAD, 1988). A növénykórokozó mikroorganizmusok kutikula bontó vagy pektin bontó enzimeik segítségével képesek behatolni a gazdaszervezetbe. A növények védekező mechanizmusa egyrészt a kutikula rétegből, az epidermiszből és viasz rétegből áll, másrészt kémiai jellegű: bizonyos esetekben antimikrobás vegyületeket – pl. fitoalexineket – képeznek (HARDING és HEALE, 1980), vagy olyan fehérje inhibitor termelnek, mely a mikrobák pektináz enzimét gátolja (BROWN és ADIKARAM, 1983).

A mikrobák három fő csoportja – baktériumok, élesztőgombák és penészgombák – közül a gyümölcsökön főként penészek és élesztők, a zöldségeken penészek és baktériumok okoznak romlást (BRACKETT, 1987; SPLITTSTOESSER, 1987, LUND és SNOWDON, 2000). Ennek oka a gyümölcsök és zöldségek összetételében található meg (1. táblázat).

Elsősorban a gyümölcsök kis pH-ja ad magyarázatot arra, hogy baktériumos fertőzések nem vagy csak ritkán okoznak romlást. A nagy víz- és szénhidrát tartalom mind a zöldségek mind a gyümölcsök esetében kedvez a penészgombák növekedésének.

1. táblázat Néhány gyümölcs és zöldség összetétele és pH-ja (DEÁK és BEUCHAT, 1996)

Termék	Összetevő (%)					pH
	Víz	Szénhidrát	Fehérje	Ásványi anyag	Egyéb	
alma	84,1	14,9	0,3	0,3	0,4	3,2
barack	85,4	17,9	1,0	0,6	0,1	3,6
banán	74,8	23,0	1,2	0,8	0,2	4,6
sárgadinnye	92,1	6,9	0,5	0,3	0,2	6,3
szőlő	81,9	14,9	1,4	0,4	1,4	3,9
narancs	87,2	11,2	0,9	0,5	0,2	3,5
szamóca	89,9	8,3	0,8	0,5	0,5	4,2
sárgarépa	88,2	9,2	1,3	1,1	0,2	5,0
karfiol	91,7	4,9	2,4	0,8	0,2	5,6
uborka	96,1	2,7	0,7	0,4	0,1	5,6
zöldbab	89,9	7,7	2,4	0,8	0,2	5,6
zöld borsó	81,2	11,4	6,1	0,9	0,4	5,7
spenót	93,7	3,2	2,3	1,5	0,3	5,1
paradicsom	94,1	4,0	1,0	0,6	0,3	4,4

### 2.1.3. Romlást okozó penészek

A gyümölcsök és zöldségek, illetve a belőlük készült termékek a termelés különböző lépéseiben – termesztés, érés; betakarítás; tárolás; feldolgozás során – fertőződhetnek penészgombákkal. A szennyeződés forrásai a penészgombák különböző részei lehetnek: micélium darabka, spóra vagy konidium, illetve szkleróciumok. A micélium darabka azonnal fertőző képes, a spóra vagy konidium és a szklerócium azonban csak a megfelelő környezeti körülmények között csírázik (NGUYEN-THE és CARLIN, 2000; FILTENBORG et al., 2002). A növénykórokozó penészek, amelyek a tenyésztés során fertőzik a terményeket, a talajból és fertőzött vagy korhadó növényi részekből származnak, és a szél illetve az eső segítségével képesek az egészséges egyedekre eljutni. Tárolás során egyrészt a még a szabadföldön gyümölcsökre és zöldségekre tapadt mikroorganizmusok, másrészt a tárolótér saját mikrobiotája okozhat romlást. Ez utóbbi esetben a spórák vagy konidiumok közvetítő közege a hűtőtárolóban keringtetett levegő és a betárolást megelőző mosás vize lehet, de romlás alakulhat ki a fertőzött és egészséges egyedek közvetlen érintkezése következtében is (STOLL, 1977). ETTER és munkatársai (1990) szerint a raktári megbetegedéseket okozó gombáknak csupán kis hányada származik a szántóföldről. A raktári gombák perisztens fajok, azaz a rövid és a hosszúidejű tárolás során is képesek romlást okozni. Ez azzal magyarázható, hogy ezek a fajok általában képesek a raktárakban uralkodó viszonylag szélsőséges környezeti körülmények között is – kis szubsztráttartalom, kis hőmérséklet – elszaporodni és így a raktári mikrobióta állandó tagjaivá válni.

A betárolt termények romlását a raktár mikrobiotájából egy vagy több dominánssá váló penészfaj okozza, attól függően, hogy az adott tárolási körülmények mely fajok számára kedvezőek (FILTENBORG et al., 2002).

A gyümölcs- és zöldségtárolás során bekövetkező legjellemzőbb betegségeket és kórokozóit foglalja össze a 2. táblázat.

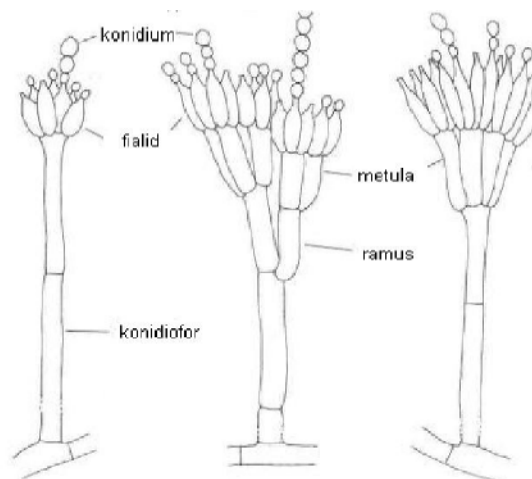
2. táblázat Gyümölcsökön és zöldségeken előforduló leggyakoribb penészes megbetegedések és a betegséget kiváltó gombafajok. (SZEPESSY, 1977; SOMMER, 1985; SASS, 1986; SCHOLBERG és CONWAY, 2002)

Betegség	Penészgomba	Termény
szürke penészes romlás	<i>Botrytis cinerea</i>	szamóca, alma, körte, sárgabarack, őszibarack, cseresznye, szilva, szőlő, füge, kivi, uborka, paradicsom, paprika, zöldborsó, zöldbab, zeller, saláta, hagyma, sárgarépa, citrom, narancs
kék penészes romlás	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium italicum</i>	alma, körte, sárgabarack, őszibarack, szilva, cseresznye, szőlő, citrom, narancs, grapefruit, füge, hagyma, fokhagyma, uborkafélék, citrom, narancs, grapefruit, szója
zöld penészes romlás	<i>Penicillium digitatum</i>	alma, körte
lenticella rothadás Alternáriás rothadás	<i>Gloeosporium album</i> <i>Alternaria spp.</i>	citrus félék, alma, körte, kivi, őszibarack, cseresznye, szilva, szőlő, burgonya, paradicsom, hagyma, káposzta
fekete/barna rothadás	<i>Monilinia fructigena</i> , <i>M. laxa</i>	alma, körte, cseresznye, meggy, nektarin, őszibarack, sárgabarack, szilva
savanyú rothadás fehérpenészes rothadás	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	citrus félék, paradicsom, őszibarack, cseresznye, szilva, szamóca, szőlő, papaya, uborka, paradicsom
<i>Mucor</i> okozta rothadás	<i>Mucor sp</i>	körte, alma, padlizsán, paprika, paradicsom

## 2.2. *Penicillium expansum*

A *Penicillium expansum*-ot, a főleg almás termésűek romlását okozó penészfajt, az imperfekt gombák (Deuteromycetes) közé, azon belül a *Penicillium* nemzetségbe sorolják. A *Penicillium* nemzetség tagjaira jellemző, hogy telepeik általában gyorsan növekednek, hifájuk szeptált, a

telep színe fehéres vagy szürke árnyalatú. A 3. ábra szemlélteti a nemzetség jellegzetes szerkezeti felépítését. Az elágazódások (ramus, branch) számának, helyének, jellegének illetve a konidiumok méretének, alakjának, színének és felületének nagy szerepe van a nemzetségbe tartozó fajok azonosításakor (SAMSON et al., 2002).



3. ábra *Penicillium* nemzetségre jellemző konidium tartó (konidiofor) szerkezete

A *Penicillium* nemzetségre jellemző, hogy nagy mennyiségű, száraz konidiumot (konidiospórát) hoz létre. Ebből adódóan a légtérben nagy gyakorisággal fordul elő *Penicillium* konidium, ami nemcsak a *Penicillium* fajokkal folytatott körültekintő labormunkára hívja fel a figyelmet, hanem magyarázatot szolgáltat arra is, hogy miért olyan nagy mértékű a *Penicillium* fajok okozta romlás a különböző termények tárolása során (MOSS, 1987).

### 2.2.1. *Penicillium expansum* morfológiai jellemzése

A *Penicillium expansum* faj alaktani leírását a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat *Penicillium expansum* alaktani leírása (ONIONS és BRADY, 1987; SAMSON et al., 2002)

Morfológiai egység	Leírás
telep	gyorsan terjedő; fakó zöld, széle fehér; hátoldala egyes törzseknél színtelen, másoknál sötét barna
konidium tartó (konidiofor)	felülete sima; elágazódások a fő tengely második vagy harmadik szintjén a fő tengelyhez lapított helyzetben; különállóan nőnek
metula	hengeres alakú, 5-8 fialidot tart
fialid	palack formájú, rövid nyakkal, 7-12 µm hosszú
konidium alakja	ellipszoid alakú, sima felületű, mérete: < 3,5 µm

## 2.2.2. Fiziológiai tulajdonságok

### 2.2.2.1. *Növekedéshez szükséges tápanyagforrások*

A *Penicillium* nemzetségbe tartozó fajok szénforrásként többnyire jól hasznosítják a mono- és diszacharidokat, a cukoralkoholokat, képesek lebontani a poliszacharidokat. Friss gyümölcsök és egyéb növényi nyersanyagok romlását okozó tulajdonságával van szoros összefüggésben pektin bontó tulajdonságuk. Több *Penicillium* faj képes a lipáz termelésre, amely lehetővé teszi a nagyobb zsírtartalmú termékeken való elszaporodást is. Egyes fajok számos szerves molekula – közöttük a szorbinsav – lebontására is képes. A szénforrások széles skáláján való növekedéssel szemben a *Penicillium* fajok nitrogén forrásként a legtöbb esetben csak a nitrátot képesek hasznosítani, ezenkívül pepton jelenlétében tapasztaltak csak gyorsabb növekedést. A szén- és nitrogén forráson kívül más tápanyagot szerves forrásokból vesznek fel. A *Penicillium* fajok többségére nem jellemző a komplex tápanyagforrások illetve vitaminok iránti igény (MOSS, 1987).

### 2.2.2.2. *Környezeti tényezők hatása a növekedésre*

A *Penicillium* fajok optimális szaporodási hőmérséklete 20-30°C. A legtöbb faj – közöttük a *Penicillium expansum* - nem képes 37°C felett növekedni. Ezzel szemben számos élelmiszer romlását okozó fajról ismert, hogy képes hűtött körülmények között – pl. 5°C – növekedni (MOSS, 1987), sőt *Penicillium expansum*-ról –6°C-os minimális szaporodási hőmérsékletet is feljegyeztek (PITT és HOCKING, 1997).

A növekedést befolyásoló tényezők közül fontos a közeg vízaktivitása. A *Penicillium expansum* konidium csírázásához és növekedéséhez szükséges minimális vízaktivitás a 0,85 és 0,82 közötti tartományba esik. Emellett figyelembe kell venni azt is, hogy a növekedés szempontjából szoros összefüggés áll fenn a hőmérséklet és a vízaktivitás között (FILTENBORG et al., 2002).

A legtöbb *Penicillium* faj széles pH tartományban (pH 3,0-8,0) képes növekedni (MOSS, 1987; FILTENBORG et al., 2002).

### 2.2.3. Anyagcsere / másodlagos metabolitok

A penészgombák anyagcsere folyamatai – hasonlóan a többi mikroorganizmushoz – alapvetően primer és szekunder folyamatokra oszthatók. A növekedés, osztódás fázisában alapvetően elsődleges anyagcsere zajlik, mely nukleinsav-, fehérje-, illetve lipid szintézissel jár. Termények tárolásakor penész okozta romlás során minden esetben megjelennek ezek a primer anyagcsere termékek, melyek íz-, szín-, szag hibával, vitamin veszteséggel járhatnak, azonban nem toxikus jellegűek.

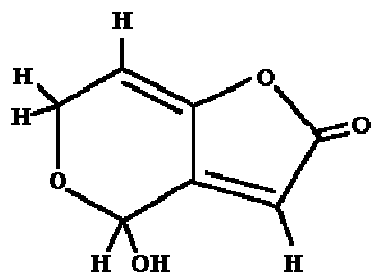
A növekedés stacioner fázisában adott körülmények között másodlagos anyagcsere folyamatok következhetnek be. A szekunder metabolitok bonyolultabb szerkezetű vegyületek. Ezek közé tartoznak a különböző mikotoxinok, melyek magasabbrendű élőlényekre kifejtett mérgező hatással (vese-, májkárosító hatás, ödéma előidézése, mutagén hatás, idegrendszerre kifejtett káros hatás) jellemezhetőek (ETTER et al., 1990).

A mikotoxin képződést jelentős mértékben befolyásolják a különböző környezeti tényezők. A primer anyagcsere folyamatokhoz szükséges kedvező feltételek megváltozása – pl. a tápanyagforrások kimerülése – a gomba anyagcsere folyamatainak módosulásához vezethet, amely többek között mikotoxinok képződésében nyilvánul meg. Egyes mikotoxinok (pl. aflatoxin B1) közel azonos hőmérsékleti- és vízáktívítási tartományban képződnek, mint amelyben az ezeket termelő penészfajok (pl. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) szaporodnak. Több mikotoxin (patulin, penicillinsav, ochratoxin A) képződésének optimális hőmérsékleti és vízáktívítási tartománya azonban kisebb, mint a termelő penészfaj (pl. *Penicillium expansum*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*) szaporodásának megfelelő tartomány. A mikotoxin termelődését befolyásoló tényezők közé tartozik még az oxigén: a kis oxigén koncentráció visszaszorítja a toxin képződését; a pH hatásával kapcsolatban pedig ismert, hogy egyes aminosavak és zsírsavak jelenléte stimulálja a mikotoxin képződést (FILTENBORG et al., 2002).

A *Penicillium* nemzetség tagjainak mikotoxin termeléséről számos adat található az irodalomban. A *Penicillium expansum* roquefortin C, patulin, penicillinsav, citrinin, viridikatumtoxin, kommunezin, ketoglobozin termeléséről ismert (MANTLE, 1987; SAMSON et al., 2002).

#### 2.2.3.1. Patulin

A patulin poliketid típusú vegyület (4. ábra), savas közegben stabil, ezzel szemben lúgos közegben, illetve szulfhidril-csoportot tartalmazó vegyületek jelenlétében gyorsan bomlik (TÉREN és NOVÁK, 1990).



4. ábra A patulin szerkezeti képlete

Vízben, alkoholban, acetonban, etilacetátban és kloroformban jól oldódik, petroléterben oldhatatlan. Vizes, metanolos közegben lassan bomlik, kloroformban, metilkloridban stabil (WILSON, 1976). A patulinról kimutatták, hogy – amellet, hogy erős antibiotikus hatást fejt ki baktériumokra – az állati sejtekre és szövetekre karcinogén és mutagén hatású lehet (DICKENS és JONES, 1961; STOTT és BULLERMAN, 1975). Ezenfelül LLEWELLYN és munkatársai (1998) kísérleti úton kimutatták, hogy tüdő- és agyvizenyő, máj-, lép- és vesekárosodás, valamint az immunrendszerre kifejtett mérgező hatás is a patulin toxikózis tüneteiként jelentkezhet állatokban.

Az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetség – pl. *Penicillium expansum* – egyes fajairól mutattak ki patulin termelést. Mivel *Penicillium expansum* az almás termésűek egyik leggyakoribb romlást okozója, a kék penésszel fertőzött almában, körtében, illetve a belőlük készült termékekben nagy valószínűséggel található patulin (4. táblázat). A patulinról kimutatták, hogy almalében és szőlőlében 22°C-on közepesen stabil. A gyümölcsleveket rövid időtartamokra 80°C-ra hevítve még mindig volt kimutatható mennyiségű patulin (SCOTT és SOMERS, 1968).

4. táblázat Almástermésűekben és azokat tartalmazó termékekben mért patulin mennyiség  
(LEGGOTT és SHEPHARD, 2001; 24/1995 (VII. 14.) NM rendelet)

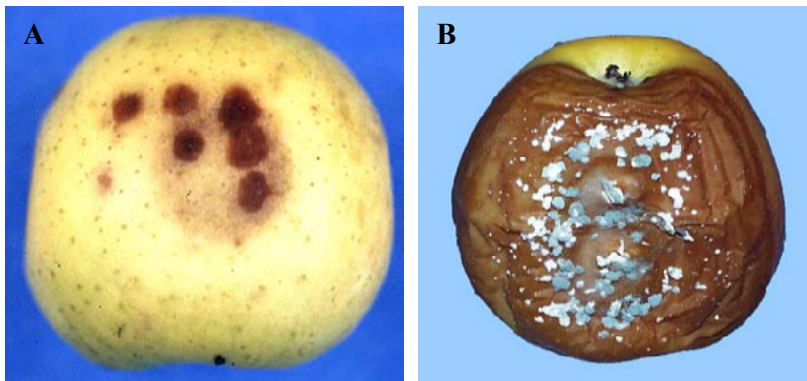
<b>Termék (vizsgált minta/pozitív minta)</b>	<b>Patulin mennyiség max. értékei (µg/kg)</b>	<b>Származási hely</b>	<b>Felmérés ideje</b>
almalé	38-56	Egyesült Királyság	1980-1984
almalé (32/5)	59-434	Egyesült Királyság	1992
almalé, almából készült termék (62/3)	>50	Egyesült Királyság	1993
alma, körte és vegyes gyümölcs termékek (328/75)	51-1130	Ausztrália	1989-1990
almalé, alma tartalmú bébiétel (107/82)	170	Spanyolország	1992
almalé koncentrátum (215/215)	7-376	Törökország	1994
alma, almából készült termékek (60/16)	5-45	Dél Afrika	1996-1998
patulin határértéke élelmiszerekben	50	Magyarország	

#### 2.2.4. A *Penicillium*-ok okozta romlás tünetei

A penicilliumos romlás kórképére jellemző, hogy a gyümölcsön illetve zöldségen barna puha-vizes jellegű romlási foltok jelennek meg (5. ábra/A). A folt felszíne lesüllyed, részben ráncosan összehúzódik. A termény romlott részén kezdetben fehér konidiumtartók jelennek meg, amelyekből a későbbiekben zöldes-kékes telep képződik (5. ábra/B). Innen származik a *Penicillium expansum* okozta kék penészes-, illetve a *Penicillium digitatum* okozta zöld penészes romlás elnevezés is. A romlott gyümölcsök dohos szagúak, az egész termény íze – a még



egészséges részé is – penészes, erjedt jellegű (URBAN, 1996). Nyolc-tíz hetes hűtő tárolás után a *Penicillium expansum* barnulási foltok átmérője elérheti a 2,5-3 cm-t. Az egyéb *Penicillium* fajok által előidézett romlás lassabban alakul ki, valamint a rothadt szöveti részek is kevésbé puhulnak, mint a *Penicillium expansum* okozta romlás esetén (JANISIEWICZ, 1999).



5. ábra Kék penészes romlás okozta tünetek almán (JANISIEWICZ, 1999)

### 2.3. Zöldségek és gyümölcsök mikrobiológiai romlását gátló/megelőző eljárások

A gyümölcsök és zöldségek útját a termesztési helyről a fogyasztóig számos olyan eljárás kísérheti, melynek többek között célja, hogy a termék minél kívánatosabb legyen a fogyasztó számára, elérhetősége ne legyen egy adott időszakhoz kötve, azaz legyen hosszabb ideig friss állapotban eltartható. Ezeknek az eljárásoknak – kezdve a növényneveléstől, a szabályozott légterű tároláson át a speciális vegyszeres kezelésektől – általában komplex hatásuk van. A tárolás során célunk, hogy a) késleltessük a gyümölcs érését; b) csökkentsük a légzésből, párologtatásból származó mennyiségi és minőségi veszteségeket; c) megakadályozzuk a termények romlását. Némelyik eljárás nem kifejezetten arra irányul, hogy a mikrobiológiai romlást gátolja, de hatásuk által a termény ellenállóbbá válhat a növénypatogénekkal szemben is. Ebben a fejezetben azonban a különböző eljárások mikroorganizmusokra kifejtett hatását kívánom csak tárgyalni.

#### 2.3.1. Termesztés hatása

A gyümölcsök és zöldségek termesztés és tárolás során bekövetkező mikrobiológiai romlása nagymértékben függ a növényi szövetek morfológiai és fiziológiai állapotától (ZAGORY, 1999). Ezért már egy fajta nemesítése, kiválasztása és termesztése során nagy körültekintéssel kell eljárni. Vannak egyes gyümölcs-, illetve zöldségfajták, amelyek egy-egy kórokozóval szemben

rezisztencia géneket hordoznak magukban, melyeket a különböző fajták keresztezése során tovább lehet adni (STOLL, 1977). A nemesítés egy másik ága azzal foglalkozik, hogy a növényi szervezet bizonyos részei – pl. a termény héja – váljanak ellenállóvá a mikrobák behatolásával szemben (STOLL, 1977; LUND és SNOWDON, 2000).

Termesztés során előnyös, ha a növények nincsenek túl szorosan egymás mellé ültetve. A megfelelő trágyázás és, ezáltal, a növények megfelelő ásványi anyag ellátottsága is fontos szempont: gyümölcsök és zöldségek esetén több, mint 30 olyan megbetegedés ismert, mely kalcium hiányból ered. Kalcium hiány következtében ugyanis megnövekszik a növények légzése, sejtfaluk pedig gyengül (STOLL, 1977).

Sok gyümölcs és zöldség esetében megfigyelték, hogy éretlen állapotban jóval ellenállóbbak mikrobiális eredetű romlással szemben, mint érett állapotban. Ez magyarázható – pl. alma esetében – azzal, hogy az érési folyamat során csökken a gyümölcs savtartalma. Az ilyen típusú rezisztenciagyengülést még a növények által az érés során termelt, penészekre toxikus hatású polifenolok mennyiségének csökkenése is okozza (STOLL, 1977; SOMMER, 1985). Ezért a betakarítás időpontjának és a megfelelő tárolási eljárások megválasztása is segíthet a mikrobiális romlás megelőzésében, illetve megakadályozásában.

Gyümölcsök és zöldségek penészes megbetegedésében a termény fiziológiai állapotán kívül fontos szerepet játszanak még a különböző fungicid kezelések (SHOLBERG és CONWAY, 2002).

### 2.3.2. A szüret és a betárolás hatása

A betakarítás során az egyik legfontosabb szempont a későbbi romlás megelőzése érdekében, hogy a termény ép maradjon, ne keletkezzenek rajta különböző sérülések, ütődések. A szüretelés legkíméletesebb módja, ha kézzel szedik a gyümölcsöt, illetve a zöldséget. Ezáltal nemcsak a sérüléseket lehet elkerülni, hanem figyelembe lehet venni a gyümölcs vagy zöldség érettségi állapotát is (LUND és SNOWDON, 2000). Az azonnal piacra kerülő, illetve az érzékenyebb gyümölcsöket szokták kézzel szedni. A mechanikai hatásokkal szemben ellenállóbb, illetve az azonnal feldolgozásra kerülő termények betakarítása gépesített úton történik (LUND és SNOWDON, 2000; MITCHELL, 1985).

A gyümölcsök, illetve zöldségek szedése után további sérülést okozhat, ha a rekeszek, tartályládák kiképzése nem megfelelő, ha ezeket túltöltik. Fizikai károsodás érheti a terményeket a szállítás és a betárolás során, valamint a különböző szempontok szerint végzett osztályozás közben (5. táblázat) (JANISIEWICZ, 1999).

5. táblázat Körtén képződött sérülések halmozódó mértéke a szürettől a betárolásig  
(MITCHELL, 1985)

Hely	Sérült gyümölcs (%)
Fa	0
Szedő edény	14
Tárolótartály a gyümölcsösben	26
Halomba rakás után	38
Osztályozás után	82

### 2.3.3. Tárolás során alkalmazott eljárások hatása

Zöldségek és gyümölcsök tárolása során többféle módszert alkalmaznak annak érdekében, hogy késleltessék az érés folyamatát, gátolják a romlást.

Az alkalmazott, illetve még vizsgált eljárások az alábbiak:

- ❖ Hűtőtárolás
- ❖ Hűtőtárolást kiegészítő eljárások
  - szabályozott, módosított légterű tárolás
  - vegyszeres kezelés
  - hőkezelés
  - biológiai védekezés (2.4 fejezet)
  - egyéb kezelések.

#### 2.3.3.1. Hűtés, hűtőtárolás

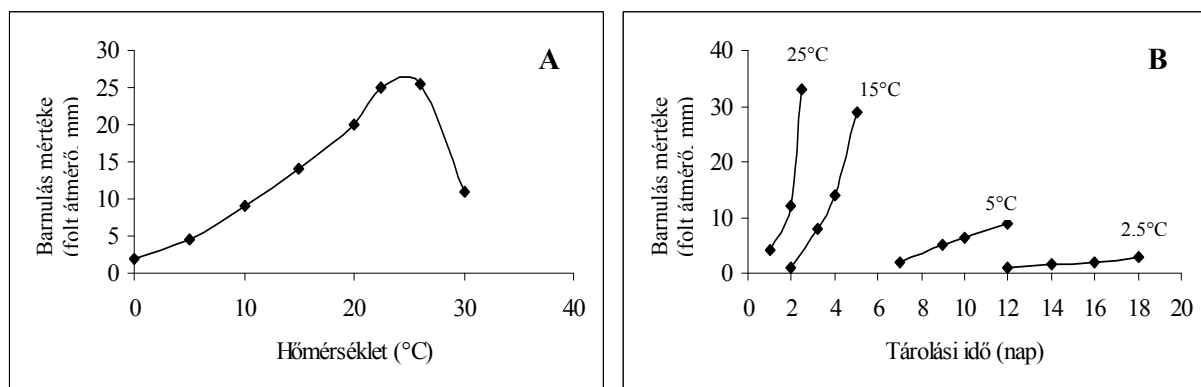
SOMMER (1985) szerint a betakarítást követő időszakban a megfelelő tárolási hőmérséklet beállítása a romlás megelőzés és gátlás legkritikusabb pontja, amely mellett az egyéb eljárások csupán kiegészítő szerepet töltenek be.

Az optimális szaporodási-növekedési hőmérsékletnél kisebb tárolási hőmérsékleten a penészek csírázása, majd hifa növekedése és ezáltal a romlási foltok képződése nagyon lelassul (6. ábra).

A szaporodás optimális hőmérsékleten néhány óráig/napig tartó lappangási fázisa hűtött viszonyok között hetekig/hónapokig nyúlhat. Ezt követően a stacioner fázis elérése is sokkal később következik be, mint az optimumhoz közeli hőmérsékleten (SOMMER, 1985).

A penészgombák kis tárolási hőmérséklettel szembeni érzékenysége különböző. A penészek egy csoportjának növekedési hőmérséklet minimuma 0°C körüli, vagy afelett van. Más penészfajok még ennél kisebb hőmérsékleten is képesek szaporodni, ezek közül kiemelkedő a főként almástermésűek és citrus félék romlását okozó *Penicillium expansum* és a szamóca, csonthéjasok, szőlő szürke penészes rothadását okozó *Botrytis cinerea*. Ezek mellett az *Alternaria alternata* (csonthéjasok, almástermésűek, szőlő, kivi) és a *Cladosporium herbarum*

(csonthéjasok, almástermésűek, szőlő) is jelentős romlást okozhat 0°C-on való tárolás mellett is. A *Monilinia fructicola* (csonthéjasok) is képes 0°C-on szaporodni, de a romlás tünetei sokkal lassabban alakulnak ki az előzőekben említettekhez képest (GRIFFIN, 1981/a; SOMMER, 1985; LUND és SNOWDON, 2000).



6. ábra *Monilinia fructicola* okozta barna rothadás hőmérséklet optimuma (A) és időbeni lefutása különböző konstans hőmérsékleteken (B) (BROOKS és COOLEY, 1928 nyomán)

A tárolási hőmérséklet megválasztásakor természetesen nemcsak a mikroorganizmusok érzékenységét kell figyelembe venni, hanem a gyümölcsök, zöldségek kis hőmérséklettel szembeni érzékenységét is, mert a túl kis hőmérséklet károkat (gyümölcshús barnulás, érési rendellenesség, állományváltozás stb.) okozhat (MITCHELL, 1985).

Az adott terménynek megfelelő tárolási hőmérséklet fenntartása mellett fontos, hogy közvetlenül a betakarítást követően gyorsan legyenek a zöldségek, gyümölcsök lehűtve. A lehűtés sebessége terményenként változó: szamóca esetében ajánlott, hogy egy órán belül, cseresznye esetében 4 órán belül következzen be (MITCHELL, 1985). Az azonnali hűtéssel a spórák csírázását is meg lehet akadályozni, így a romlás tünetei is jóval később jelentkeznek (GRIFFIN, 1981/b; JANISIEWICZ, 1999).

### 2.3.3.2. Szabályozott/módosított légterű tárolás

Gyümölcsök és zöldségek tárolása során a hűtés mellett nagyon elterjedt a tárolókban alkalmazott szabályozott légterű-, vagy kisebb csomagolási egységekben alkalmazott módosított légterű tárolás. A szabályozott légterű tárolás során a tároló termekben állandó szinten tartják az adott terménynek megfelelő, a normál légösszetételtől eltérő gázösszetételt. A módosított atmoszférás csomagolásban a kiindulási légösszetételt lehet beállítani, amely a tárolás során a gyümölcs, zöldség légzése, a csomagolóanyag áteresztőképessége hatására módosul.

A normál légösszetételtől (21% O<sub>2</sub>, 0,03% CO<sub>2</sub>) való eltérés kisebb oxigén és/vagy nagyobb széndioxid tartalmat jelent. Egyes esetekben szénmonoxidot is alkalmaznak az előbbi módosítások mellett. A 6. táblázat néhány gyümölcs és zöldség tárolása során alkalmazott szabályozott légtér gázösszetételét tartalmazza.

A szabályozott/módosított légtér elsődleges hatása, hogy csökken a termények légzése, ami késlelteti a káros fiziológiai változásokat is. Ezáltal a gyümölcs, zöldség ellenállóbb a mikrobiális romlással szemben is. A csökkentett oxigén, illetve a megnövelt széndioxid koncentrációnak közvetlen gátló hatása is van a mikroorganizmusokra (NGUYEN-THE és CARLIN, 2000). Annak ellenére, hogy a penészgombák aerob szervezetek, ez utóbbi állítást nem támasztotta alá minden ezzel kapcsolatos kutatás. Több penészgombával (*Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Alternaria sp.*) elvégzett kísérletekben a normál légösszetételtől eltérő (pl. 2,0% O<sub>2</sub>, 10,5% CO<sub>2</sub>) gázösszetételnek nem volt jelentős gátló hatása (YACKEL et al., 1971; SOMMER, 1985).

6. táblázat Termények tárolásához ajánlott hőmérsékleti és szabályozott légösszetételi paraméterek (LUND és SNOWDON, 2000)

Termény	Hőmérséklet tartomány (°C)	Szabályozott légösszetétel	
		O <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)
alma	0-4	2-3	1-2
sárgabarack	-1-0	2-3	1-2
szőlő	-1-0,5	2-5	1-3
őszibarack	-1-0	1-2	5
körte	-1-0,5	2-3	0-1
szilva	0-1	1-2	0-5
szamóca	0	10	15-20
avokádó	5-13	2-5	3-10
narancs	2-8	5-10	0-5
grapefruit	10-15	3-10	5-10
citrom	10-14	5-10	0-10
ananász	7-13	5	10
banán	13-15	2-5	2-5
paradicsom	12-15	3-5	-

### 2.3.3.3. Vegyszeres kezelések

Gyümölcsök és zöldségek betakarítását követően sokféle vegyszert – fungicidet, bakteriocidet, növény növekedésszabályzókat – használnak a termények minél hosszabb eltarthatósága és minőség megőrzése céljából. Ezeknek a kémiai vegyületeknek az alkalmazását egyrészt azzal szabályozzák, hogy milyen mértékben maradhat szermaradvány a terményben vagy a felületén. Az alkalmazás során fontos szempont továbbá, hogy elkerüljék a mikroorganizmusok rezisztenssé válását, emiatt a betakarítás és a kitérítés közötti különböző szakaszokban –

betakarítás után, betárolás előtt és után, csomagolás előtt – kívánatos az egymástól eltérő kémiai összetételű vegyszerek használata (LUND és SNOWDON, 2000). Ebből adódóan nagy választékban állnak rendelkezésre különböző vegyszerek, és emellett mindig újabb és újabb vegyületek penészekre kifejtett hatását is vizsgálják (7. táblázat).

A különböző fungicideket olykor mesterséges viaszbevonat alkotójaként juttatják a gyümölcs felületére. A mesterséges bevonat (pl. polietilén alapú) ezáltal nemcsak a termény vízvesztését gátolja, hanem egyben romlását is akadályozza (LUND és SNOWDON, 2000; KOBILER et al., 2001).

7. táblázat Gyümölcsök és zöldségek eltarthatóságát növelő néhány alkalmazott és vizsgált vegyület

Vegyület	Romlás, kórokozó	Termény	Hivatkozás
karbendazim+ metalaxil	<i>Penicillium</i> spp.	alma	LUND és SNOWDON, 2000
natrium-orto-fenil-fenát	<i>Penicillium</i> spp.	citrus gyümölcsök	
iprodion	<i>Penicillium</i> spp.	alma	
tiabendazol	<i>Penicillium</i> spp.	citrus gyümölcs, banán	
imazalil, proklaraz, iprodion	<i>Alternaria</i> okozta romlás	banán	
etakonazol, propikonazol, guazatin	<i>Geotrichum</i> okozta savanyú rothadás		
diklorán	<i>Rhizopus</i> okozta romlás		
benomil	<i>Botrytis cinerea</i>	alma, őszibarack, nektarin, szilva	SOMMER, 1985
klór	<i>Penicillium expansum</i>	alma	JANISIEWICZ, 1999
<i>kalcium propionát</i>	fekete gyökér rothadás	sárgarépa	PUNJA és GAYE, 1993
<i>nátrium hipoklorit</i>		mandarin	NAQVI, 1993
<i>benzimidazol</i>		alma	USALL et al., 2001
<i>ammónium molibdát</i>	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>		
<i>kis molekulatömegű aldehidek</i>	<i>Penicillium expansum</i>	cseresznye	MATTHEIS és ROBERTS, 1993

A penészes romlás kémiai úton történő gátlási módszerei közé tartozik még – a nem gyakran alkalmazott és nem egyértelmű hatékonysággal bíró – ózonnal való kezelés alkalmazása. PALOU és munkatársai (2002) ózonnal történő kezelés hatására annak ellenére, hogy a betegség előfordulásának mértéke nem változott szignifikánsan, számos romlást okozó penész (*Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis* és *Penicillium expansum*) hifanövekedésének és spóráképzésének gátlását érték el őszibarackon és szőlőn. Ezzel szemben PEREZ és munkatársai (1999) szamócán – számos kedvező hatás mellett – nem tudták kimutatni az ózon penészgátló hatását.

A különböző kémiai vegyületek alkalmazásával fellépő aggályok következtében a természetes vegyületek gátló hatásának vizsgálata is megkezdődött az elmúlt évtizedekben. A vizsgált természetes anyagok közé tartoznak többek között a különböző esszenciális olajok (pl. karvon, a fokhagyma kivonat egy olajos komponense), kitinázok, ecet- és propionsav, citrommag kivonat, propolisz (OPPENHEIM és CHET, 1992; NGUYEN-THE és CARLIN, 2000; KRAUSS és JOHANSON, 2000).

#### 2.3.3.4. Hőkezelés

Az utóbbi évtizedben egyre inkább elterjed a gyümölcsök, zöldségek betárolás előtti hőkezelése. A hőközlés közege lehet víz (vízbe mártás, vízzel való keféss mosás – 40°C-60°C, 30 sec-10 min), meleg levegő (43°C-54°C, 10 -60 min) illetve forró gőz (LUND és SNOWDON, 2000; SCHIRRA et al., 2000). A 8. táblázat azokat a kórokozókat foglalja magában, melyekkel szemben a hőkezelés valamely módja hatásos volt.

8. táblázat Gyümölcsök és zöldségek romlását okozó penészek gátlása betárolás előtti hőkezeléssel

Hőkezelés módja	Penészgomba	Kezelt termék	Hivatkozás
gőz	<i>Botrytis cinerea</i>	szőlő	LYDAKIS és AKED, 2003
meleg vizes keféss mosás	<i>Penicillium digitatum</i>	citrus gyümölcs	PORAT et al., 2000
	<i>Alternaria alternata</i>	mango	PRUSKY et al., 1999
	<i>Botrytis cinerea</i> ,	paprika	FALLIK et al., 1999
	<i>Alternaria alternata</i>		
meleg vizes permetezés meleg vízbe mártás	<i>Monilinia fructicola</i>	nektarin, őszibarack	KARABOLUT et al., 2002
		Galia dinnye	FALLIK et al., 2000
	<i>Penicillium digitatum</i>	narancs	OBAGWU és KORSTEN, 2003
	<i>Penicillium italicum</i>		
	<i>Monilinia fructicola</i>	cseresznye	MARQUENIE et al., 2002/b
		szamáca	GARCIA et al., 1995

A betárolást megelőző hőkezelésnek kettős hatása van: egyrészt a 40°C-60°C-os hőmérséklet önmagában gátolhatja egyes penészek spóráinak csírázását (KARABOLUT et al., 2002); másrészt ez a hőmérséklet megolvasztja a gyümölcsök, zöldségek természetes viaszrétegét, mely ezáltal egyenletesebben vonja be a felületet, eltömíti a sérüléseket, pórusokat és így megakadályozza a további fertőzéseket (SCHIRRA et al., 2000; PORAT et al., 2000).

A hőkezelésnek mindemellett hátránya is van: gyakran az a hőmérséklet, amely mikrobiológiai szempontból biztonságot nyújt, egyéb minőség károsodást okozhat a termékben (pl. puhulás,

barnulás) (MARQUENIE et al., 2002/b). A meleg levegő, illetve víz alkalmazása – hasonlóan a többi postharvest eljáráshoz – egyéb kezelésekkel együtt valóban hatékony.

#### 2.3.3.5. Egyéb kezelések

Postharvest kezelések sorába tartozik még a besugárzás, illetve a termény természetes ellenálló képességét elősegítő kezelések.

A besugárzást évtizedek óta alkalmazzák különböző iparágakban pl. orvosi eszközök, gyógyszerek sterilizésére, élelmiszer tartósításra, fűszerek mikrobiális szennyezettségének csökkentésére. Friss gyümölcs és zöldség kezelésére – elsősorban rovári kártevők hatástalanítására – is alkalmazható. Az amerikai Food and Drug Administration szabályzata szerint, „friss”-nek tekinthetők mindazon nyers élelmiszerek (pl. gyümölcsök és zöldségek), melyek ionizáló besugárzással való kezelésének mértéke nem haladja meg az 1 kGy dózist (MERMELSTEIN, 2001).

Gyümölcsök és zöldségek tárolás során bekövetkező mikrobiális romlásának besugárzással történő gátlására már korábban is irányultak kísérletek, pl. ISMAIL és AFIFI (1976) vizsgálatai szerint besugárzás hatására a sárgarépa és a szamóca megőrizte mikrobiológiai stabilitását még 12°C (szamóca) illetve 25-30°C-on (sárgarépa) való tárolás során is. KOVÁCS (2004) azonban rámutat arra is, hogy a besugárzásnak eltarthatóság növelő hatása mellett negatív hatása is van: előidézheti a termények puhulását is. A besugárzással történő kezelés ma is fontos szerepet kap a friss termények minőségének megőrzésében, illetve az erre irányuló kutatásokban (BARBAROSA-CÁNOVAS et al., 1998; NEVEN és DRAKE, 2000; FARKAS, 2001).

Ultraibolya-C ( $\lambda=254$  nm) fénnel történő kezelés hatására MARQUENIE és munkatársai (2002/a) eredményei szerint a *Botrytis cinerea* és *Monilinia fructigena* spórák elpusztultak. NIGRO és munkatársai (1998), akik szőlő *Botrytis*-es romlásával foglalkoztak, azt tapasztalták, hogy a mesterséges fertőzést megelőző UV-C sugárzás megerősíti a növény ellenállóképességét, és ezáltal csökkenti a szürke penészes romlás mértékét.

Az UV sugárzás itt említett hatása mellett számos olyan törekvés ismert, amely szintén a termény ellenálló képességének növelésére irányul. Kalcium tartalmú oldatban való áztatás hatására – amelyet általában alma esetében alkalmaznak – erősödik a gyümölcs sejtfala, és ezáltal ellenállóbb a fiziológiai hibákkal és penészes romlással szemben (CONWAY et al., 1994; JANISIEWICZ et al., 1998; KOVÁCS et al., 1988). Újabb kutatásokban a szőlőhájban megtalálható és antioxidáns hatásáról ismert transz-rezveratrol antifungális hatását vizsgálták. URENA és munkatársai (2003) sikeresen alkalmazták transz-rezveratrol kivonatot szőlőn és almán.



## 2.4. Biológiai védekezés

### 2.4.1. Biológiai védekezésről általában

A biológiai védekezés (biological control, biokontroll) fogalma eredetileg a növényvédelem körében alakult ki és alapvetően a kártevők elleni, kemikáliákat mellőző, a természetben fellelhető „erőforrásokra” (mikroorganizmusokra, rovarokra) támaszkodó védekezést jelentette (VAJNA, 1987). Ma is az integrált növényvédelem komplex rendszerének szerves része a természettechnikai védekezés, mechanikai védekezés, kémiai védekezés mellett (GILINGERNÉ és ZENTAI, 2003). A biológiai védekezést a növényvédelem területén az alábbi módon határozzák meg: „a növényállományba a kártevők természetes ellenségeit telepítjük be és biztosítjuk a felszaporodásukat, miután kialakul köztük egy olyan biológiai egyensúly, ami a károsító tevékenységét a gazdaságilag elfogadható kárszint alatt tartja” (IZBÉKI et al., 2004). Az utóbbi évtizedekben egyre inkább előtérbe került a penészgombákkal szembeni biológiai védekezés is. A fogalom ezen a területen való meghatározása több átalakuláson ment végbe: COOK és BAKER (1983) definíciója szerint a biológiai védekezés egy kórokozó inokulum mennyiségének vagy betegségokozó képességének a csökkentése, amely egy vagy több élő szervezet – kivéve az embert – hatása révén megy végbe. PETERSSON 1998-ban COOK egy későbbi (1989) megfogalmazását idézi: biológiai védekezés során egyrészt olyan természetes vagy módosított szervezeteket, géneket használnak, amelyek csökkentik a romlást okozó szervezet hatását, másrészt kedvező körülményeket teremtenek kívánatos szervezetek (termény, fa, állat, kedvező tulajdonságú rovar, mikroorganizmus) számára.

Annak ellenére, hogy a biológiai védekezés fogalma több területen is használatos, az értekezés további részében ezt a kifejezést a penészek ellen irányuló eljárás megnevezésére alkalmazom.

### 2.4.2. Biológiai védekezés helye

Biológiai védekezéssel a természetstől a fogyasztóig tartó folyamatban többször is – szabadföldön a természetés során, majd tárolás, illetve a feldolgozás során – találkozhatunk.

#### 2.4.2.1. *Termesztés*

A szabadföldi, illetve az üvegházi termesztés során különböző módokon kerülhetnek a növényekhez az antagonista szervezetek attól függően, hogy a növény melyik részét (gyökér, szár, termés) kell a patogénnel szemben védeni. A fertőzött talajba szóróvetéssel vagy a palánták mentén barázdákba juttatják a védekezéshez alkalmazott mikroorganizmusokat. Ezen módszerek közé tartozik a magok antagonista élesztő vagy élesztőszerű gomba spórával történő

bevonása is (CHET és INBAR, 1994). Amennyiben a termést, illetve a terméskezdeményt kívánják védeni, permetező eljárást alkalmaznak pl. szőlő vagy szamóca esetén (ZAHAVI et al., 2000).

9. táblázat Növénykórokozó mikroorganizmusokat gátló, kereskedelemben is megtalálható, szabadföldön alkalmazott antagonista gombát tartalmazó termékek (VRIJE et al., 2001)

<b>Antagonista gomba</b>	<b>Növénykórokozó mikroba</b>	<b>Termény</b>	<b>Termék márkaneve, származása</b>
<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>S. minor</i>	zöldség, szántóföldi termények	Contans (Prophyta, Németország)
nem patogén <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	napraforgó paradicsom, szegfű	(Oroszország) Fusaclean L és G [Fo47] (NPP, Franciaország)
<i>Gliocladium catenulatum</i>	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Didymella</i> spp.	üvegházi dísznövények és zöldségek	PreStop (Kemira Agro Oy, Finnország)
<i>Peniophora gigantea</i>	<i>Heterobasidion annosum</i>	fenyő szár és gyökér rothadása	PG szuszpenzió (Ecological Laboratories Ltd and the Forestry Commission, Egyesült Királyság), Rotstop (Kemira Agro Oy, Finnország)
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Pythium</i> spp, <i>Scerotinia</i> spp, <i>Verticillium</i> spp., különböző gombák (főleg <i>Trichoderma</i> spp)	zöldségek, gyümölcsök zöldségek, gyümölcsök	Trichodermin (Bulgária, és Oroszország) Solsain, Hors-Solsain, Plantsain (Prestabiol, Franciaország)
	<i>Pythium</i> spp, <i>R. solani</i> , egyéb talajeredetű patogének	virágok, szamóca, fák, zöldségek	Bio-Fungus (De Ceuster, Belgium)
	<i>Fusarium</i> spp, <i>P. ultimum</i> , <i>R. solani</i> , <i>S. homeocarpa</i> különböző gombák	számos termény, dísznövények, gyep dísznövények, erdei fák, borsó	Tri002, Tri003 (Asperg, Németország) Supresevit (Borregaard és Reitzel, Dánia és Fytovita, Cseh Köztársaság)
	<i>Armillaria mellea</i> (méz gomba)	fák	Harzian 20 (NPP, Franciaország)
	<i>Pythium</i> spp, <i>Sclerotinia</i> spp	zöldség és gyümölcs	Harzian 10 (NPP, Franciaország)
<i>T. harzianum</i>	talaj eredetű patogének	védett termények	Binab-T WP (Binab, Svédország)
<i>T. polysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	szamóca	Binab-T WP (Binab, Svédország)
<i>T. viride</i>	<i>Phytophthora</i> spp	dísznövények	Bip T (Lengyelország)

A 9. táblázatban látható, hogy több antagonista szervezet már forgalomban is van. A *Trichoderma* nemzetség egyes fajainak alkalmazása gyakori, több tanulmány is készült ezen mikroorganizmus hatásmechanizmusáról (CHET és INBAR, 1994, GOLDMAN et al., 1994, AIT-LAHSEN et al., 2001).

A gomba-, illetve a gombaszerű készítmények mellett baktériumok alkalmazásával – *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* fajok – is kísérleteznek a szabadföldi termesztésben (GOLDMAN et al., 1994; THOMASHOW, 1996; BACON et al., 2001).

#### 2.4.2.2. Tárolás

Tárolás során romlást okozó penészek élesztőgombával, illetve baktériumokkal való gátlásának irodalma nagyon nagy. A 10. és 11. táblázatban foglaltam össze azokat az antagonista szervezeteket, amelyekkel sikeres kísérleteket folytattak – legtöbb esetben *in vivo* körülmények között is. A gyümölcsök jellegéből (méret, keménység, természetes védelem) és a tárolási igényekből (nagy mennyiségben, hosszan tárolható) adódóan a legtöbb eredményt az almástermésűekkel, a csonthéjasokkal, illetve a citrusfélékkel érték el.

10. táblázat Penészeket gátló élesztő- és élesztőszerű gombák

Penészgomba	Antagonista élesztő	Termény	Hivatkozás
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	alma	SPADARO et al., 2002
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Acremonium cephalosporium</i>	szőlő	ZAHAVI et al., 2000
	<i>Aerobasidium pullulans</i>	szőlő	SCHENA et al.; 1999; CASTORIA et al., 2001
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	szőlő	ZAHAVI et al., 2000
	<i>Aerobasidium pullulans</i>	szamóca	LIMA et al.; 1997
	<i>Aerobasidium pullulans</i>	szőlő, paradicsom	SCHENA et al.; 1999
	<i>Aerobasidium pullulans</i>	alma, szőlő	CASTORIA et al., 2001
	<i>Acremonium breve</i>	alma	JANISIEWICZ, 1988
	<i>Acremonium cephalosporium</i>	szőlő	ZAHAVI et al., 2000
	<i>Candida oleophila</i>	alma	LIMA et al.; 1997; MERCIER és WILSON, 1994
	<i>Candida guilliermondii</i>	szőlő	ZAHAVI et al., 2000
	<i>Cryptococcus albidus</i>	alma	ROBERTS, 1991; FAN és TIAN, 2001
	<i>Cryptococcus flavus</i>	alma	ROBERTS, 1991
<i>Cryptococcus humicola</i>	alma	ANDERSON et al., 1997	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	alma	ROBERTS, 1990/b	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	alma	PIANO et al., 1997, SPADARO et al., 2002	
<i>Muscodor albus</i>	alma	MERCIER és JIMÉNEZ, 2004	
<i>Pichia guilliermondii</i>		CHALUTZ et al., 1988	
<i>Sporobolomyces roseus</i>	alma	FILINOW et al., 1996	

<i>Botryotinia fuckeliana</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	szőlő	CURTIS et al., 1996
<i>Monilia</i> sp.	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	alma	SPADARO et al., 2002
<i>Monilinia fructicola</i>	<i>Muscodor albus</i>	őszibarack	MERCIER és JIMÉNEZ, 2004
<i>Monilinia laxa</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	őszibarack	CURTIS et al., 1996
<i>Mucor</i> sp.	<i>Cryptococcus albidus</i>	körte	ROBERTS, 1990/a
	<i>Cryptococcus flavus</i>	körte	ROBERTS, 1990/a
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	körte	ROBERTS, 1990/a
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Aerobasidium pullulans</i>	grapefruit	SCHENA et al.; 1999
	<i>Candida famata</i>	narancs	ARRAS, 1996
	<i>Candida oleophila</i>	grapefruit	MCGUIRE és HAGENMAIER, 1996
	<i>Pichia guillermondii</i>	citrus	DROBY et al., 1993
		gyümölcs	
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Aerobasidium pullulans</i>	alma, szőlő	JANISIEWICZ et al., 2000; CASTORIA et al., 2001
	<i>Candida sake</i>	alma	USALL et al., 2000
	<i>Cryptococcus</i> spp.	alma	ROBERTS, 1991; HE et al.; 2003
	<i>Cryptococcus albidus</i>	alma	FAN és TIAN, 2001
	<i>Cryptococcus ciferii</i>	alma	VERO et al.; 2002
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	alma	SPADARO et al., 2002; JANISIEWICZ et al., 2001
	<i>Muscodor albus</i>	alma	MERCIER és JIMÉNEZ, 2004
	<i>Pichia guillermondii</i>	alma	MCLAUGHLIN et al., 1990
	<i>Sporobolmyces roseus</i>	alma	JANISIEWICZ és BORS, 1995
<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Hyphopichia burtonii</i>	árpszem	RAMAKRISHNA et al., 1996
<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Pichia anomala</i>	búzaszem	BJÖRNBERG és SCHNÜRER, 1993
<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Acremonium cephalosporium</i>	szőlő	ZAHAVI et al., 2000
<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aerobasidium pullulans</i>	szőlő, paradicsom	SCHENA et al.; 1999; CASTORIA et al., 2001
	<i>Candida guillermondii</i>	szőlő	ZAHAVI et al., 2000
	<i>Kloeckera apiculata</i>	őszibarack	MCLAUGHIN et al., 1992
	<i>Pichia guillermondii</i>	szőlő	CHALUTZ et al., 1988
<i>Spherotheca fuliginea</i>	<i>Tilletiopsis</i> spp.	üvegházi uborka	URQUHART et al., 1994

11. táblázat Penészeket gátló baktériumok

Penészgomba	Antagonista baktérium	Termény	Hivatkozás
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	cseresznye	UTKEHEDE és SHOLBERG, 1986
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	áfonya	STRETCH, 1989
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Erwinia</i> sp.	alma	DOCK et al., 1998
	<i>Pantoea agglomerans</i>	alma, körte	NUNES et al., 2002
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	alma, körte	JANISIEWICZ és ROITMAN, 1988

	<i>Pseudomonas gladioli</i>	körte	MAO és CAPELLINI, 1989
<i>Mucor</i> sp.	<i>Pseudomonas cepacia</i>	alma	JANISIEWICZ és ROITMAN, 1987
	<i>Bacillus subtilis</i>	nektarin, őszibarack, sárgabarack, szilva, cseresznye	UTKEHEDE és SHOLBERG, 1986; PUSEY és WILSON, 1984
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	citrus gyümölcs	WILSON és CHALUTZ, 1989
	<i>Bacillus subtilis</i>	citrus gyümölcs	SINGH és DEVERALL, 1984
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	alma, körte	NUNES et al., 2002
	<i>Pseudomonas syringae</i>	alma	JANISIEWICZ, 1987
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	alma, körte	JANISIEWICZ és ROITMAN, 1988
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		NIELSEN et al.; 1998
<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	őszibarack	WILSON et al, 1987

Annak ellenére, hogy az irodalomban ilyen nagy számban olvashatunk a sikeres próbálkozásokról, üzemi alkalmazásban csak néhány készítménnyel találkozunk (12. táblázat).

12. táblázat Tárolás során alkalmazott, kereskedelemben megtalálható antagonista szervezet tartalmazó készítmény (USALL et al., 2001; SPADARO et al., 2002; VERO et al., 2002)

Antagonista szervezet	Penészgomba	Termény	Márka név
<i>Candida oleophila</i>	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium</i> spp, <i>Botrytis</i> spp	citrus gyümölcs	Aspire
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Penicillium</i> spp, <i>Botrytis</i> spp	almás termésűek	BioSave 10, 11
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Botrytis</i> spp, <i>Penicillium</i> spp, <i>Mucor</i> spp, <i>Geotrichum</i> spp	almás termésűek	BioSave 100, 110, 1000
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Penicillium</i> spp, <i>Botrytis</i> spp	almás termésűek	Yield Plus

#### 2.4.2.3. Feldolgozás

Az élelmiszer feldolgozás során már ritkábban találkozunk a biológiai védekezés fogalmával, helyette inkább a starter- vagy védőkultúra alkalmazása terjedt el.

A kíméletes eljárásokkal kezelt (minimally processed) zöldségek, gyümölcsök esetén a humán patogén baktériumok (*Salmonella* spp, *Listeria* spp, *Clostridium* spp) szaporodásának gátlása a fő feladat. Erre a tejsavbaktériumok alkalmazása mutatkozik megfelelő megoldásnak, hiszen sok élelmiszer természetes mikrobiotájának alkotói, eredményesen gátolnak több kórokozót és emellett még az emberi szervezetre kedvező hatást is gyakorolnak (LEVERENTZ et al., 2003).

A söriparban a malátagyártás során a nem kívánatos anyagcsere termékeket eredményező spontán erjedést *Geotrichum candidum*-ot tartalmazó védőtenyésztéssel gátolják. Ez a védőtenyésztés ugyanakkor alkalmasnak bizonyult különböző mikotoxinokat termelő penészek (*Fusarium* spp, *Penicillium* spp és *Aspergillus* spp) gátlására is (NÁNÁSINÉ, 2001).

#### 2.4.3. Antagonista szervezetek által kifejtett gátlás hatásmechanizmusa

Penészeket gátló élesztőgombák és baktériumok keresése, gátlási hatékonyság vizsgálata mellett egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a kutatók a gátlás hatásmechanizmusának feltárására. A hatásmechanizmus ismeretének birtokában lehetőség nyílik arra, hogy az adott antagonista szervezet hatékonyságát valamilyen eljárással – pl. genetikai, fizikai, kémiai – növeljük. Ezenfelül egy adott gátló szervezet ipari, kereskedelmi alkalmazása is nehezen valósítható meg a gazdaszervezet – patogén mikroorganizmus – antagonista mikroorganizmus közötti kölcsönhatás ismerete nélkül (CASTORIA et al., 2001).

Ugyanakkor nagyon nehéz pontosan meghatározni egy adott mikroorganizmus által kifejtett gátlás hatásmechanizmusát, mivel a gátlás gyakran többféle hatás összekapcsolódásaként jön létre. A komplex gátló hatáson belül alapvetően négyféle jelenséget – tápanyagért, térért történő versengés; antibiózis; parazitizmus; növény ellenálló képességének növelése – szoktak megkülönböztetni (DROBY et al., 1991; ARRAS és ARRU, 1997; PETERSSON, 1998; SPADARO és GULLINO, 2004).

##### 2.4.3.1. *Tápanyagért, térért való versengés*

A versengés a fajok közötti antagonista kölcsönhatásának egyik megnyilvánulási formája, melynek lényege, hogy két faj egyedei valamilyen jelentős környezeti létfeltételért versengenek, mely során az egyik hátrányos helyzetbe kerül vagy kiszorul azáltal, hogy a másik gyorsabban szaporodik, vagy mindkettőjük számára fontos forrásokat – tápanyag, energia – hatékonyabban kimeríti (PETERSSON, 1998; VAJNA és JAKUCS, 2003).

Megfigyelték, hogy egyes élesztőgombák képesek nagyon gyorsan elszaporodni és bevonatot képezni a termény felületén, így mire a penészgombák spórái csírázni kezdenének, az élesztőgombák szaporodásának exponenciális fázisa már véget ért. Ehhez az intenzív szaporodáshoz tápanyagra van szükségük, amit a termény felszínéről nyernek, nem károsítva az alsóbb rétegeket. Ezáltal azonban az adott zöldség vagy gyümölcs felszíne elszegényedik a penészek számára is fontos tápanyagokban, pl. cukrokban (PETERSSON, 1998).

A versengés jelenségére gyakran közvetett úton következtetnek a kutatók (lásd 2.6.2.1. fejezet), így nem minden esetben lehet meghatározni egyértelműen azt a vegyületcsoportot, amelyért a versengés folyik (13. táblázat).

13. táblázat Tápanyagért, térért való versengéssel magyarázott kölcsönhatás romlást okozó és antagonista mikroorganizmusok között

<b>Kölcsönhatás típusa</b>	<b>Antagonista mikroorganizmus</b>	<b>Penészgomba</b>	<b>Hivatkozás</b>
tápanyagért, térért való versengés általában	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	SPADARO et al., 2003
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	ROBERTS, 1990/b
	<i>Candida sake</i> + <i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Penicillium expansum</i>	NUNES et al., 2002
	<i>Pichia guillermondii</i>	<i>Penicillium italicum</i>	ARRAS et al., 1998
nitrogén forrásért történő versengés	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium expansum</i>	JANIESIEWICZ et al., 2000
	<i>Candida guillermondii</i>	<i>Penicillium expansum</i>	ORTU et al., 2003
	<i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>C. ciferrii</i>	<i>Penicillium expansum</i>	VERO et al., 2002
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	PIANO et al., 1997
szénforrásért történő versengés	<i>Cryptococcus humicola</i> , <i>Filobasidium floriforme</i> , <i>Rhodosporidium toruloides</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	FILINOW et al., 1996
	<i>Pichia anomala</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	DRUVEFORS et al., 2003

#### 2.4.3.2. Antibiózis

Az antibiózis az antagonista kölcsönhatás olyan típusa, mely során az egyik faj a másik egyedeiben (szaporodásában, fejlődésében) okoz károsodást toxikus metabolitokkal (antibiotikumokkal, enzimekkel, illékony komponensekkel stb.) (FRAVEL, 1988; VAJNA és JAKUCS, 2003).

Tág hatásspektrum jellemzi azokat a mikroorganizmusokat, melyek antibiózis révén gátolnak. Figyelembe kell venni azonban, hogy egy-egy toxikus metabolit termelését nem a kölcsönhatásba kerülő szervezetek idézik elő, hanem főként a kémiai, biológiai környezet befolyásolja, így egy adott antagonista szervezet nem minden körülmény között képes gátolni a patogén mikroorganizmust. Emellett ismeretes, hogy a mikrobák viszonylag rövid idő alatt rezisztenssé válhatnak egy-egy számukra korábban toxikus anyaggal szemben. Ellenérzést vált ki az ilyen mechanizmussal gátló antagonistákkal szemben az is, hogy az emberi szervezetre is ártalmasak lehetnek (ARRAS és ARRU, 1997). A 14. táblázatban gyűjtöttem össze azokat az antagonista szervezeteket, melyek – többek közt – antibiózis útján fejtettek ki gátló hatást különböző penészekre.

14. táblázat Antibiózis révén gátló antagonista mikroorganizmusok

Antagonista mikroorganizmus	Abiotikus anyag	Patogén mikroorganizmus	Gátlás helye	Hivatkozás
<i>Bacillus subtilis</i>	iturin	<i>Monilinia fructicola</i>	őszibarack	PUSEY et al., 1988
	plipastatin	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>in vitro</i>	YAMADA et al., 1990
<i>Enterobacter cloacae</i>	ammónia	<i>Phythium ultimum</i>	növények	HOWELL et al., 1988
<i>Pseudomonas cepacia</i>	pirrolnitrin	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	körte, alma	JANISIEWICZ és ROITMAN, 1988
	antibiotikumok	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>P. italicum</i>	citrus gyümölcs	WILSON és CHALUTZ, 1989
<i>Epicoccum purpurascens</i>	epikorazin, flavipin	<i>Phythium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i>	<i>in vitro</i>	BROWN et al., 1987
<i>Gliocladium virens</i>	gliovirin, gliotoxin	<i>Phythium ultimum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	gyökér, magok	FRAVEL, 1988; COOK, 1993
<i>Muscodor albus</i>	illékony komponensek	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilinia fructicola</i>	alma, őszibarack	MERCIER és JIMÉNEZ, 2004
<i>Trichoderma harzianum</i>	6-pentil- $\alpha$ -piron	<i>Rhizoctonia solani</i>	saláta	CLAYDON et al., 1987

#### 2.4.3.3. Parazitizmus

VAJNA és JAKUCS (2003) meghatározása szerint a parazitizmus az antibiózistól abban különbözik, hogy „az egyik faj a másikat közvetlenül „támadja”, abból él”. Két faj között fennálló parazita kölcsönhatásnak kétféle típusa lehet: a) biotróf jellegű parazitizmus esetén a patogén szervezet csak az élő szövetben vagy sejtekben képes a gazdaszervezettel kapcsolatban maradni; b) nekrotróf parazitizmus esetén a gazdaszervezet sejtjei, szövetei elhalnak a patogén szervezet által termelt metabolitok hatására, csak ezt követően hatol be a parazita a gazdaszervezetbe.

A biológiai védekezésben alkalmazott, illetve vizsgált antagonista szervezetek közül elsősorban a *Trichoderma* fajok hatásmechanizmusa alapszik parazita kölcsönhatásra. Többen is beszámoltak arról, hogy a *Trichoderma harzianum* kitináz, illetve glukanáz enzimek termelésével okoz kárt különböző zöldségeken, gyümölcsökön (szőlő, sárgarépa, szója) megtelepedő növénykórokozó penészekben (pl. *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*) (BENHAMOU és CHET, 1993; GOLDMAN et al., 1994). A *Trichoderma* fajokhoz hasonlóan *Pichia membranifaciens*, *Aureobasidium pullulans* és *Gliocladium virens* esetében is tapasztaltak olyan enzim termelődést, mely a gomba sejtfal bontását idézi elő (GOLDMAN et al., 1994; CASTORIA et al., 2001; MASIH és PAUL, 2002). Penészekkel szemben antagonista hatást kifejtő *Rhodotorula glutinis*, *Pichia guillermondii* és *Phyrium nunn* esetében az élesztők penész



hifához való szoros tapadását is megfigyelték (ADAMS, 1990; WISNIEWSKI et al., 1991; CASTORIA et al., 1997).

#### 2.4.3.4. A növény ellenállóképességének növelése

Parazita szervezet behatolására a növények – a már létező fizikai és kémiai védekező rendszerükön kívül – további védőmechanizmus beindításával reagálnak. A legismertebb folyamat ezen belül az antimikrobás hatású fitoalexinek (fenilpropanoidok, terpenoidok, zsírsav származékok) termelése a fertőzés helyén (ARRAS és ARRU, 1997).

Penészek antagonista szervezetei is kiválthatnak a biológiai védekezés során olyan hatást, amely fitoalexin termelésre serkenti a növényt, ezáltal segítve a gazda szervezetek (pl. zöldség, gyümölcs, gabona) sérült szöveteinek behegedését, és növelve a gazdaszervezet ellenálló képességét (PETERSSON, 1998). *Pichia guilliermondii* és *Candida famata* esetén figyelték meg, hogy *Penicillium digitatum* gátlása során nemcsak a már említett versengés és parazitizmus játszott szerepet, hanem indirekt úton a gyümölcs fitoalexin termelését is indukálták (RODOV et al., 1994; ARRAS, 1996). WISNIEWSKI és munkatársai (1991) ugyancsak *Pichia guilliermondii* esetében tapasztalták, hogy grapefruiton alkalmazva növelte a gyümölcs etilén termelését, mely hormon a fenilalanin-ammónium-liáz enzim aktiválásával fenolok, fitoalexinek és lignin termelésére serkenti a gyümölcsöt.

A gyümölcsök védekező mechanizmusukkal ellentétben képesek olyan anyag kibocsátására, ami elősegíti a penészkonidium megtapadását és csírázását. Ezt a hatást képesek ellensúlyozni egyes antagonista szervezetek. FILINOW (2001) tapasztalata szerint *Sporobolomyces roseus* és *Cryptococcus laurentii* antagonista élesztők jelenlétében a szürke penészes rothadást okozó *Botrytis cinerea* konidiuma nem tudta tápanyag forrásként hasznosítani az alma által kibocsátott butil-acetátot, mely *in vitro* körülmények között növelte a konidium felszínhez való kötődését és kicsírázását.

#### 2.4.4. Antagonista szervezetek kiválasztása

Egy antagonista szervezet kiválasztásához, ipari alkalmazásához hosszú út vezet: többek között figyelembe kell venni a gátlás hatékonyságát, a gazdaszervezetre és közvetve az emberre kifejtett hatását, nagy mennyiségben történő előállítását, forgalomba hozás lehetőségeit. WISNIEWSKI és WILSON (1992) összegyűjtötték azokat a tulajdonságokat, amelyeknek egy „ideális antagonista szervezetet” jellemezni kellene:

- genetikailag stabil
- kis koncentrációban hatékony; jól adagolható

- nincs nagy tápanyag igénye; szélsőséges környezeti tényezők mellett is életképes
- a penészgombák széles skálájára hatékony különböző zöldségek és gyümölcsök esetén
- nem támadja meg a gazdanövényt; nem termel az emberi szervezetre káros termékeket
- rezisztens a rovarirtókkal szemben
- jól irányítható a szaporodása nem költséges táptalajon.

A 10. és 11. táblázat alapján látható, hogy a tárolás során alkalmazott, illetve vizsgált antagonisták szervezeteinek többsége élesztőgomba. Az élesztőgombák alkalmazásának elsődleges előnye a baktériumokkal szemben, hogy többnyire nem termelnek antibiotikumokat, toxikus vegyületeket, amely az emberi és állati szervezetet közvetlen vagy közvetett úton károsíthatná. Az élesztők biológiai védekezésre való felhasználását támasztják alá még az alábbi jellemzők (PETERSSON, 1998):

- nem termelnek allergén spórákat,
- általában nem emberi és állati kórokozók,
- kis vízáktivitású körülmények között is jól szaporodnak,
- extracelluláris poliszaharidokat termelnek, mely elősegíti a megtapadást,
- tápanyagok széles skáláján nagyon gyorsan képesek szaporodni,
- kis parciális oxigénnyomás mellett is képesek szaporodni,
- takarmány adalékként is használják köszönhetően nagy fehérje, esszenciális aminosav és vitamin tartalmuknak.

Az élesztők gátló hatásmechanizmusa nagyon gyakran a tápanyagért illetve a helyért történő versengéssel magyarázható. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az élesztőgomba sejtek gyorsan elszaporodnak a sérülések felszínén (PETERSSON, 1998), ezáltal elfoglalják a helyet más mikroorganizmusok előtt. Továbbá több szerző is beszámol arról, hogy összefüggés áll fenn az élesztősejt koncentrációja és gátló hatékonysága között: nagy sejtszámú ( $10^7$ - $10^8$  sejt/ml) élesztő szuszpenzió esetén nagyobb mértékben tapasztalható gátlás (MCLAUGHLIN et al., 1990; PIANO et al., 1997).

Újabb kutatási terület az élesztő killertoxinok gátló hatásának vizsgálata a penészgombákra (PETERSSON, 1998; BJÖRNBERG és SCHNÜRER, 1993). WALKER és munkatársai (1995) megfigyelése szerint *Saccharomyces cerevisiae* és *Pichia anomala* fajok antifungális hatást fejtenek ki több növény- illetve humán patogén gombára.

#### 2.4.5. Antagonista hatást befolyásoló tényezők

A gátló mikroorganizmusok hatását egyrészt meghatározzák az alapvető környezeti tényezők (a termés tulajdonságai, származása, a tárolás körülményei), másrészt az antagonista szervezet alkalmazásának módja.

Az alapvető környezeti tényezők egy része (gyümölcsre, zöldségre jellemző tápanyag összetétel, ipari gyakorlatban alkalmazott tárolási hőmérséklet, légösszetétel) egy-egy termés esetén adott. Némi módosítással – pl. az antagonista szervezetek közvetlen kémiai környezetének kedvezőbbé tételével – növelni lehet a gátló hatást (SPADARO és GULLINO, 2004). Egyes cukrok, cukor analóg vegyületek vagy nitrogén vegyületek adagolásával jelentős mértékű antagonista hatás növekedést értek el PIANO és munkatársai (1997), valamint JANISIEWICZ (1994), ez azonban a tápanyagért való versengéssel is szoros összefüggésben van. Egyes ionok, pl. vas (HE et al., 2003), kalcium sók (MCLAUGHLIN et al., 1990), illetve vitaminok, pl. biotin (JANISIEWICZ et al., 2001) hozzáadásával is javítható a gátló hatékonyság.

A termények tágabb értelemben vett adottságai is befolyásoló tényezők. A gyümölcsök érettségi állapota – melynek előrehaladásával párhuzamosan módosul a tápanyag összetétel, és csökken a termés patogén gombákkal szembeni ellenálló képessége – is módosítja az antagonista hatást (WSZELAKI és MITCHAM, 2003). KARABOLUT és munkatársai (2002) figyelték meg, hogy a gyümölcsök, zöldségek eredeti mikrobiális szennyezettsége sem közömbös a biológiai védekezés szempontjából: minél kisebb mértékű a szennyezettség, annál jobb a gátló hatékonyság. A termés felületére nagy mennyiségben felvitt antagonista mikroorganizmus az eredeti mikrobiota összetételét megváltoztathatja: egyes, eredetileg gátolni nem kívánt mikroorganizmusok eltűnhetnek, minek hatására mások felszaporodhatnak (PETERSSON és SCHNÜRER, 1995). Ez eredményezhet az antagonista mikroorganizmussal együtt szinergista hatást, ugyanakkor ennek ellenkezője is valószínűsíthető.

Az antagonista szervezet alkalmazási módjának gátlást befolyásoló tényezői közül az egyik legfontosabb az alkalmazott inokulum koncentráció. Az irodalomban számos helyen utalnak arra a tényre, hogy az antagonista élesztőgombát vagy baktériumot tartalmazó szuszpenzió sejtsűrűségének növelésével közel lineáris mértékben nő a gátló hatékonyság *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt (ROBERTS, 1990/b; BJÖRNBERG és SCHNÜRER, 1993; FAN és TIAN, 2001).

Laboratóriumi körülmények között a minták romlást okozó és antagonista mikroorganizmussal való beoltása között eltelt időnek is hatása van a biológiai védekezés hatékonyságára. ARRAS (1996) közvetett úton, illetve HE és munkatársai (2003) közvetlenül jutottak arra a

megállapításra, hogy – amennyiben a gátló élesztőgombával való beoltás megelőzi a patogén penésszel történő fertőzést – a biológiai védekezésre használt élesztőgomba gátló hatása egyenes arányban nő az antagonista kölcsönhatásban lévő mikroorganizmusokkal történő beoltás között eltelt idővel. Azonban ROBERTS (1990/b), hasonló jellegű kísérletei során, nem tapasztalt ilyen típusú összefüggést. A hatékonyság befolyásoló tényezőinek vizsgálata során a mikroorganizmusok beoltási sorrendjével és a beoltások között eltelt idővel kapcsolatban felvetődik az a kérdés, hogy mit kívánunk modellezni: (1) azt a betárolási módszert, mely szerint a beérkező terményt először mossák – ezáltal eltávolítva róla a szabadföldről, gyümölcsösből származó fertőzési forrásokat, majd biokontroll mikroorganizmussal kezelik, mely a tárolótérből származó szennyeződések ellen védi a terményt; vagy (2) egy olyan rendszert, ahol az eredeti szennyeződések eltávolítása nem lehetséges teljes mértékben, illetve, ahol fennáll az a gyakorlati probléma, hogy az antagonista szervezet nem kerülhet közvetlenül a mosást követően a termény felületére, pl. Dél Afrikában (OBAGWU és KORSTEN, 2003).

Néhány utalás található az irodalomban arra vonatkozóan, hogy az antagonista felviteli módja (pl. védő viasz rétegbe keverve, vagy a viaszréteg felvitelét megelőzően) (SPADARO és GULLINO, 2004), illetve az antagonista szer formája (eredeti sejtszuszpenzió, visszanedvesíthető szárított és porított alak) (USALL et al., 2001) is befolyásolhatják a gátló mikroba hatékonyságát.

## 2.5. Biológiai védekezéssel kombinált kezelések

Egy-egy tárolás során alkalmazott eljárás önmagában gyakran nem fejt ki olyan mértékű hatást, mely minden igényt kielégítene. Ezért sok esetben az eljárásokat együttesen alkalmazzák. Forró vízbe való mártás és szabályozott légterű tárolás kombinálásakor WSZELAKI és MITCHAM (2003) azt állapították meg, hogy a két eljárás kiegészíti egymást: a hőkezelés a tárolás kezdetén mintegy fertőtlenítette a szamóca szemeket, ezáltal kezdetben visszaszorította a romlást, míg a szabályozott légtér megemelt széndioxid és csökkentett oxigén szintje a tárolás egész időtartama alatt fejtett ki gátló hatást. Gyümölcs és zöldség tárolás esetén különböző mértékű hűtőtárolást mindig alkalmaznak. Emellé társítják az egyéb módszereket, pl. szabályozott légterű tárolás, vegyszeres kezelés.

A kombinált kezelések vizsgálata azért is fontos, mert így komplexebb és a valós alkalmazásnak megfelelő képet kapunk az antagonista szervezet alkalmasságáról. Ugyanakkor nem elhanyagolható a különböző kezelések illetve kombinációik alkalmazásának gazdasági vonzata sem, hiszen mindezen eljárások többletköltséget jelentenek, ami a fogyasztók számára a minőség és biztonság mellett szintén fontos szempont.

Mint egyik eljárás sem, a biológiai védekezés sem elég hatékony önmagában. A 15. táblázatban azokat a kombinált eljárásokat gyűjtöttem össze, melyekben a romlást többnyire hatékonyabban gátolta az antagonista szervezet és valamely más eljárás együttes alkalmazása.

15. táblázat Biológiai védekezéssel kombinált eljárások

Kombinált kezelés	Antagonista szervezet(ek)	Penészgomba	Megjegyzés	Hivatkozás
kevert tenyészet + (hűtőtárolás)	<i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Sprobolomyces roseus</i>	<i>Penicillium expansum</i>	alma, 22°C, azonos koncentrációjú tenyészetek 50:50% arányban összekeverve	JANISIEWICZ és BORS, 1995
	<i>Candida sake</i> + <i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	alma, körte, 20°C, 1°C 2×10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> :8×10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> cfu/ml ( <i>C.s:P.a</i> ) 50:50% arányban összekeverve	NUNES et al., 2002
biol. véd. + SzL, MA tárolás + hűtőtárolás	<i>Candida sake</i>	<i>Penicillium expansum</i>	almán, 1°C 3% O <sub>2</sub> – 3% CO <sub>2</sub> , 1% O <sub>2</sub> -1% CO <sub>2</sub>	USALL et al., 2000
	<i>Pichia anomala</i>  <i>Pichia guillermondii</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>  <i>Botrytis cinerea</i>	nedves takarmány búza 14 hónapon át való tárolása, változó hőmérséklet, és gázösszetétel szamóca, 5-14 napig 5°C + 2 nap 20°C, 15 % CO <sub>2</sub> +18 % O <sub>2</sub> +67 % N <sub>2</sub>	DRUVEFORS et al., 2002  WSZELAKI és MITCHAM, 2003
biol. véd. + kémiai kezelés + (hűtőtárolás)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>P. italicum</i>	narancs, 10°C, 1-5% nátrium bikarbonát	OBAGWU és KORSTEN, 2003
	<i>Candida</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Penicillium expansum</i>	alma, 24°C 1-2% kalcium klorid	MCLAUGHLIN et al., 1990
	<i>Candida oleophila</i> (Aspire)	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Monilinia fructicola</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	alma, őszibarack, 20-22°C, 2% nátrium bikarbonát	DROBY et al., 2003
	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Penicillium expansum</i>	alma, 23°C, 90-180 mM kalcium klorid, 50 ppm iprodion	FAN és TIAN, 2001
	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Sprobolomyces roseus</i> (mutáns)	<i>Penicillium expansum</i>	alma, körte, 22°C 1-4 mg/ml 2-dezoxi-D-glükóz	JANISIEWICZ, 1994
biol. véd. + hőkezelés	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>P. italicum</i>	narancs, 10°C, 45°C-os vízfürdő, 2 percig	OBAGWU és KORSTEN, 2003
	<i>Pichia guillermondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	szamóca, 5-14 napig 5°C + 2 nap 20°C, 63°C-os vízfürdő	WSZELAKI és MITCHAM, 2003

Az irodalomban a kombinált kezelések kevésbé sikeres alkalmazásával is találkozhatunk: DOCK és munkatársai (1998) alma szürkerothadását kísérelték meg gátolni módosított atmoszférás csomagolással, antagonista baktériummal és a kettő együttes alkalmazásával. A két eljárás külön-külön hatékonynak bizonyult, azonban a biológiai védekezésre használt *Erwinia* törzs nem volt képes antagonista hatást kifejteni a kis oxigén / nagy széndioxid koncentrációjú légtérben. KARABOLUT és munkatársai (2002) is bizonytalan eredményeket értek el *Candida* sp. és forró vízzel való kefézés kombinációjával, mellyel őszibarack és nektarin *Penicillium expansum*, illetve *Monilinia fructicola* okozta romlást kívánták megelőzni.

## 2.6. Biológiai védekezéssel kapcsolatos vizsgálati módszerek

### 2.6.1. Mikroorganizmusok izolálása, antagonista szervezetek kiválasztása

Mikroorganizmusok izolálásának és a feltehetően antagonista szervezetek kiválasztásának (screenelés) többféle módjával is lehet találkozni az irodalomban. A legegyszerűbb eljárás az adott termény mikrobiotájának feltérképezéséhez a gyümölcs vagy zöldség steril vízben történő mosása, a mosófolyadék hígítása majd szélesztése táptalajra. Ezt követi az izolátumok elkülönítése a szemrevételezés útján megállapítható morfológiai tulajdonságok alapján, majd az egysejt tenyészetek készítése (WILSON és CHALUTZ, 1989; ZAHAVI et al., 2000). Egyes kutatásokban nemcsak a terményre jellemző mikroba populációt izolálják, hanem hasonló eljárásnak vetik alá az egyéb növényi részeket – szár, levél, virág – is (STRECH, 1989; ROBERTS, 1990/b; ARRAS, 1996). Az izolálást követően a terményre, illetve a növényre jellemző mikroba populációból a gátló élesztő vagy baktérium kiválasztását általában magán a terményen végzik. A gyümölcsöt, zöldséget lemosásuk esetleg vegyszeres úton fertőtlenítik, majd miután megszárad pontszerűen (steril túvel) sebeket ejtenek a termény különböző pontjain. Ezeket a sebeket oltják be először adott koncentrációjú élesztő, illetve baktérium szuszpenzióval, majd bizonyos idő elteltével (30-120 perc) a penészspóra szuszpenzióval (WILSON és CHALUTZ, 1989; ROBERTS, 1990/b; ARRAS, 1996). A mesterségesen fertőzött gyümölcsöt, zöldséget 10-14 napig inkubálják szobahőmérsékleten. Az adott élesztő vagy baktérium gátló hatását a romlási foltok előfordulásában és átmérőjében mérik. Ettől kis mértékben tér el STRECH (1989) módszere, aki fekete és vörös áfonyán vizsgálta élesztők és baktériumok antagonista hatását: a gyümölcs méretéből kifolyólag az áfonyát belemártotta az antagonista szuszpenzióba, majd a szár részénél oltotta be *Alternaria*-val.

WILSON és munkatársai (1993) egy új módszert fejlesztettek ki, amellyel antagonista mikroorganizmusokat izolálnak, vagyis gyakorlatilag összevonják az izolálás és screenelés

lépéseit. Ennek értelmében a gyümölcsöt először steril vízben mossák, majd ezzel a mosófolyadékkal oltják be a gyümölcsön mesterségesen ejtett sebeket. Ezután következik a patogén penésszel való beoltás. Tíz napos, 21°C-on való inkubálást követően steril eszközzel kivágnak azokat a sebeket, amelyeknél nem mutatkozott romlás, steril hígítóban mossák, majd ebből szélesztenek szilárd tápközeg felületére. A továbbiakban az izolálás szokásos lépéseit hajtják végre.

#### 2.6.2. Antagonista szervezet hatékonyságának vizsgálata

A vizsgált élesztőgomba illetve baktérium penészgombával szembeni gátló hatását leggyakrabban *in vivo*, azaz valamely gyümölcsön vagy zöldségen vizsgálják. Ez a módszer (romlási foltok előfordulási arányának, átmérőjének mérése) gyakorlatilag megegyezik az előző alfejezetben ismertetett screeenesi eljárással, azzal a különbséggel, hogy a statisztikai értékelhetőség érdekében nagyobb mintaszámmal dolgoznak (ROBERTS, 1990/b; WILSON et al., 1993; USALL et al., 2000).

Az antagonista szervezet által kifejtett gátló hatékonyság *in vitro* vizsgálata is ismert. BJÖRNBERG és SCHNÜRER (1993) fejlesztettek ki egy olyan módszert, mely szerint a még folyékony tápközegbe kevernek adott koncentrációjú élesztőszuszpenziót, ezzel lemezöntést végeznek, majd a megszilárdult antagonista-tápközeg keverék felszínére cseppentenek penész spóra, illetve konidium szuszpenziót. Az antagonista hatást a penésztelep átmérőjének változásával mérik. PIANO és munkatársai (1997) az élesztő szuszpenziót csupán szélesztették a táptalaj felszínén, majd erre cseppentették rá a penész konidium szuszpenziót. Ilyen körülmények között gondot okozhat a szubsztrát hifa növekedés nyomon követése. Ennek kiküszöbölésére DRUVEFORS (személyes közlés) kivágja a penésztelepet, leolvasztja róla a tápközéget majd szárítást követően a biomassza tömegét méri. PETERSSON és SCHNÜRER (1995) úgy módosította korábbi módszerét, hogy mintáikat steril peptonvízben homogenizálták, majd cikloheximidet tartalmazó táptalajra szélesztették megfelelő hígításban, annak érdekében hogy penésztelep-képző egységet határozzanak meg.

Agarlyuk diffúziós eljárást alkalmaztak HE és munkatársai (2003): *Penicillium expansum* szuszpenziót szélesztettek szilárd tápközeg felületére. Négy 6,5 mm átmérőjű lyukat fúrtak a tápközegbe, melybe az antagonista élesztő szuszpenzióját adagolták.

Az *in vitro* és *in vivo* módszerek közötti átmenetet képezi DOCK és munkatársai (1998) megoldása: mikrotiter lemez bemélyedéseinek aljába először tápközéget adagoltak, majd ennek felületére egy kis darab almát helyeztek. Az almadarabkát steril fogpiszkáló segítségével sértették meg, majd a sebeket beoltották antagonista és/vagy patogén szervezet szuszpenziójával.

*In vitro* és *in vivo* körülmények között is gyakran vizsgálják az antagonista hatékonyságot befolyásoló tényezők hatását: különböző hőmérsékleten és/vagy légszűrő nélküli környezetben való tárolással, különböző sejtsűrűségű ( $10^3$ - $10^8$  sejt/ml) élesztő/baktérium szuszpenzió alkalmazásával, illetve egyéb kombinált kezelésekkel (forró vizes mosás, vegyszeres kezelés).

Egy adott antagonista szervezet hatékonyságát több esetben egy adott – az iparban alkalmazott – vegszerrel való összehasonlítás útján állapítják meg: ROBERTS (1990/b) a *Cryptococcus laurentii* hatását az almástermésűek szürke rothadásának megelőzésére alkalmazott benomillal hasonlította össze. Hasonlóan járt el FAN és TIAN (2001) *Cryptococcus albidus* esetében, melynek gátló hatását különböző koncentrációjú iprodion kezeléshez viszonyították. OBAGWU és KORSTEN (2003) *Bacillus subtilis* hatékonyságát imazalil és guazatin keverékének hatásával vetették egybe. A kereskedelemben lévő fungicidekkel történő összehasonlításnak két módja fordul elő: az egész gyümölcsöt belemártják az adott vegszert tartalmazó mosóvízbe, vagy csupán a mesterségesen készített sebekbe adagolnak vegszert tartalmazó oldatot.

### 2.6.3. Hatásmechanizmus vizsgálati módszerei

#### 2.6.3.1. *Versengés vizsgálata*

Azt, hogy a tápanyagért, illetve térért való versengés az adott antagonista szervezet által kifejtett hatás magyarázata, gyakran csak közvetett úton tudják bizonyítani a kutatók. ROBERTS (1990/b) a *Cryptococcus laurentii* és *Botrytis cinerea* közötti szén- és nitrogénforrásért való versengést az alapján feltételezi, hogy az adott élesztő gyorsan képes a gyümölcs sebben elszaporodni, illetve, hogy a szürke penészes rothadás okozójáról ismeretes, hogy konidium csírázását jelentős mértékben befolyásolja a közvetlen környezet szénhidrát és nitrogén ellátottsága. FAN és TIAN (2001) hasonló következtetést von le az alapján, hogy *Cryptococcus albidus* hatékonyság vizsgálata során kétféle élesztősejt-szuszenzióval dolgoztak. Kisebb volt annak a szuszpenzióknak a hatékonysága, melyben az élesztősejtek az eredeti táplevesben voltak, ahhoz a szuszpenzióhoz képest, mely az eredeti tápleves eltávolításával majd vízzel történő helyettesítésével készült.

A tápanyagért való versengés vizsgálatának elterjedt módszere, hogy többlet szén-, illetve nitrogénforrást juttatnak az antagonista-patogén rendszerbe. Ez történhet cukrok, sók formájában, de gyakran alkalmaznak természetes anyagot, pl. almalevet, szőlőlevet. Ennek hatására kétféle jelenséget figyeltek meg:



- ❖ egyes többlet szén vagy/és cukor forrás hatására a patogén számára elegendő tápanyag áll rendelkezésre, így a versengést kiváltó antagonista szervezet már nem gátló tényező (LIMA et al., 1997; CASTORIA et al., 2001);
- ❖ a többlet tápanyag forrás hatására nagyságrendekkel nő az antagonista populáció nagysága, mely növeli a gátló hatékonyságot (VERO et al., 2002). PIANO és munkatársai (1997) ezzel szemben azt tapasztalták, hogy az általuk alkalmazott nitrogén forrás gátolta élesztő izolátumaik gátló hatékonyságát, a feleslegben adagolt fruktóz pedig a penész növekedést szorította vissza.

Ezen eredmények alapján úgy tűnik, nem lehet ezzel a módszerrel sem egyértelmű magyarázatot szolgáltatni a hatásmechanizmus okára.

JANISIEWICZ és munkatársai (2000) fejlesztettek ki egy új vizsgálati módszert, mely egyrészt lehetőséget nyújt a tápanyagért és térért való versengés elkülönítésére, másrészt pontos információt szolgáltat a nitrogénforrásban bekövetkező változásokról. Ezt oly módon oldják meg, hogy egy mikrotiter lemez és a bemélyedésekbe illeszkedő alulról membránnal határolt betét segítségével ugyan térben elválasztják egymástól az antagonista és a patogén szervezetet, azonban a tápanyagforrást szolgáltató tápleves mindkét szervezet számára hozzáférhető marad. Az inkubálás végén a tápleves szűrletéből HPLC technika segítségével meghatározzák az aminosavak mennyiségében bekövetkező változásokat, az antagonista által konidium csírázásra kifejtett gátló hatást mikroszkóppal követik nyomon.

#### *2.6.3.2. Antifungális vegyület képzésének vizsgálata*

Az antagonista mikroorganizmus által képzett penészgombákra toxikus hatású anyag kimutatására általában az élesztőgomba vagy baktérium rázatott tenyészetének sejtmentes felülúszóját, vagy szűrletét használják. A sejtmentes felülúszóval, szűrlettel hasonlóképpen járnak el, mint az élő sejteket tartalmazó szuszpenzióval a hatékonyság vizsgálat során. Amennyiben a sejtmentes oldatoknak nincs gátló hatása – ami az élesztőgombák esetében általában fennáll –, azt feltételezik, hogy az adott mikroorganizmus nem termel antibiotikumot (LIMA et al., 1997; PIANO et al., 1997; CASTORIA et al., 2001; FAN és TIAN, 2001).

JANISIEWICZ és munkatársai (2000) agarlyuk diffúziós teszttel ellenőrizték izolátumaik által esetlegesen termelt fungicid hatású vegyületek jelenlétét. A kísérlet megerősítéseként almalevet tartalmazó szilárd tápközeg felületén „kettős tenyészetet” készítettek különböző módon: egymást keresztező vonalakat húztak a konidium szuszpenzióval és az élesztő szuszpenzióval; ugyanezt megismételték azzal az eltéréssel, hogy az élesztő vonal meghúzása két nappal megelőzte az öt keresztező penész konidiumot tartalmazó vonal készítését; valamint egymással párhuzamos

vonalat is szélesztettek a táptalaj felületére. Hasonlóan jártak el VERO és munkatársai (2002) is.

Antifungális komponens kimutatásakor egyes esetekben találkozhatunk élesztőgombák által kifejtett killer hatás vizsgálatával is. JANISIEWICZ és munkatársai (2001) agarlyuk diffúziós módszert alkalmaztak: szilárd tápközeg közepére lyukat fúrtak, melybe sejtmentes felülúszót adagoltak, majd 24 óra elteltével killer érzékeny törzset oltottak a lemez felületére. Megfelelő inkubációt követően a gátlási zóna átmérőjét határozták meg. FREDLUND és munkatársai (2002) élő sejtek által okozott színátcsapást eredményező reakciót használtak ki egy *Pichia anomala* törzs killertoxin termelésének kimutatására HODGSON és munkatársai (1994) leírása alapján.

#### 2.6.3.3. Parazitizmus vizsgálata

Antagonista szervezetek – főként élesztő- vagy élesztőszerű gombák – és patogén penészek közötti közvetlen kölcsönhatás vizsgálatát pásztázó elektron mikroszkóp segítségével lehet a leglátványosabb módon kimutatni. Ezt a módszert alkalmazva mutatta ki: CHET és INBAR (1994) a *Trichoderma* fajok és a talaj eredetű növénykórokozó *Sclerotinia sclerotiorum* közötti micoparazita jellegű kölcsönhatást; ARRAS és munkatársai (1998) *Pichia guillermondii* sejtek *Penicillium italicum* hifához; valamint CASTORIA és munkatársai (2001) *Rhodotorula glutinis* sejtjeinek *Botrytis cinerea* hifához való tapadását.

SPADARO és munkatársai (2002) antagonista élesztő *Botrytis cinerea* konidium csírázásra kifejtett hatását vizsgálták. Az élesztő sejteket és a penész konidiumokat folyékony tápközegben rázatták, majd fénymikroszkóp segítségével határozták meg a kicsírázott konidiumok arányát. Vizsgálatai során figyelték meg az élő *Metschnikowia pulcherrima* sejtek penész konidiumok körüli koncentrációját és adhézióját.

Antagonista mikroorganizmusok enzim tevékenységen alapuló gátló hatásának kimutatását többek között LORITO és munkatársai (1994), valamint DI PIETRO és munkatársai (1993) írták le. Folyékony tápközegbe növénykórokozó penész konidium-, illetve spóra szuszpenzióval oltanak be, majd olyan tiszta enzim, vagy enzimkeverék oldatot adagolnak, mely megfelel az antagonista szervezet által termelt enzimeknek. 24-30 órás inkubációt (25°C) követően meghatározzák a kicsírázott konidiumok %-os arányát, és mérik a hifa hosszát.

#### 2.6.3.4. A növény ellenállóképességének javítására irányuló hatás kimutatása

A gazdanövény által termelt „védekező vegyületek” mennyiségi és minőségi meghatározása kromatográfiás eljárásokkal valósítható meg. ARRAS (1996) mutatott ki és határozott meg narancs epikarp részéből fitoalexinokat vékonyréteg (TLC) és nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiás (HPLC) eljárással. A vizsgálat szerint az antagonista *Candida famata* izolátum hatására megtöbbszöröződött az epicarp szkoparon és szkopoletin szintje a kontroll mintához képest.

#### 2.6.3.5. Antagonista szervezet ipari, mezőgazdasági alkalmazhatóságának vizsgálata

Hatékonyságuk alapján megfelelőnek mutató antagonista szervezetek üzemi, szabadföldi alkalmazásához hosszú út vezet a laboratórium és fülüzemi kísérletektől.

Fontos lépés az adott gátló élesztőgomba vagy baktérium törzs általános jellemzőinek – tápanyag igény, hőmérséklet, pH, vízáktivitás hatása a szaporodásra – feltérképezése. A tápanyagigény meghatározásához általában minimál tápközeget egészítenek ki egy-egy tápanyagforrással (szénhidrát, nitrogén, szerves sók, vitaminok stb.). Mivel ily módon nagy számú minta keletkezik, a legalkalmasabb eljárásnak a mikrotiter lemezek alkalmazása bizonyult, melyben a folyékony – különböző összetételű – tápközegben a szaporodó sejtek okozta turbiditást mérik (JANISIEWICZ és BORS, 1995; JANISIEWICZ et al., 2001; FREDLUND et al., 2002). Ehhez hasonló módon lehet meghatározni a különböző vízáktivitású és pH-jú tápközegek hatását az antagonista szervezet szaporodására (FREDLUND et al., 2002).

A különböző hőmérsékleten való tárolás, illetve kezelés antagonista szervezetre kifejtett hatásának vizsgálatának több szempontból is van jelentősége. Fontos megállapítani, hogy az antagonista szervezet az ipari gyakorlatban alkalmazott kis tárolási hőmérsékleti tartományban (terménytől függően kb. 0-10°C) is kifejti-e gátló hatását (ROBERTS, 1990/b; BJÖRNBERG és SCHNÜRER, 1993; SPADARO et al., 2004). Mivel a gyümölcsök és zöldségek felületén alkalmazott biokontroll mikroorganizmusok a fogyasztó szervezetébe kerülhetnek, egyes esetekben vizsgálták a gátló élesztő vagy baktérium 37°C-on való szaporodását (JANISIEWICZ et al., 2001; USALL et al., 2001). A nagyobb hőmérséklettel (50°C) szembeni érzékenységet figyelembe kell venni abban az esetben, ha betároláskor hőkezelést alkalmaznak, hiszen ennek függvényében lehet meghatározni az egyes kezelések (antagonista szervezet felvitele, hőkezelés, mosás) sorrendjét (SPADARO et al., 2004). A hőmérséklet antagonista mikroorganizmus szaporodását, élettevékenységét befolyásoló hatásának megállapításához a gátló élesztő vagy baktérium tenyésztését különböző hőmérsékleten végzik, és adott idő elteltével vizsgálják a szaporodás mértékét (FREDLUND et al., 2002).

Az antagonista mikroorganizmusok alkalmazhatósága attól is függ, hogy az adott gyümölcsön, illetve zöldségen mennyire tud elszaporodni. Ennek vizsgálata során az élesztőgomba, vagy baktérium mesterségesen ejtett sérülésekben kialakuló szaporodás dinamikáját figyelik meg. A sérülésekbe adott sejtsűrűségű antagonista szuszpenziót adagolnak, majd különböző hőmérsékleten inkubálják. A tárolási hőmérséklet függvényében kialakított időközönként mintát vesznek: a beoltott sebeket a terményből kivágják, steril hígítóban, puffer oldatban rázatással a mikroorganizmusokat kimossák, majd valamely élősejtszám meghatározási módszer segítségével meghatározzák a gátló élesztő vagy baktérium telepkepző egységeinek számát (ROBERTS, 1990/b; JANISIEWICZ és BORS, 1995; PIANO et al., 1997; NUNES et al., 2002). A sérülésekben való elszaporodás ismerete alapján azonban még nem lehet egyértelmű következtetést levonni arra vonatkozóan, hogy a terményt antagonista szuszpenzióba mártva, vagy azzal permetezve hogyan szaporodik a gátló mikroorganizmus a gyümölcs, illetve zöldség egész felületén (WSZELAKI és MITCHAM, 2003). USALL és munkatársai (2001), valamint SCHENA és munkatársai (1999) végeztek olyan kísérleteket, amelyben alma egész felületén végeztek a korábbiakhoz hasonló kísérletet.

Egy adott antagonista szervezet engedélyezésének alapvető feltétele, hogy az emberi szervezetre ártalmatlan legyen. A kutatók általában korábbi ismeretekre támaszkodnak: sok mikroorganizmusról ismert, hogy milyen veszélyességi csoportba sorolható. PETERSSON és munkatársai (1999), valamint FREDLUND és munkatársai (2002) is felhívják arra a figyelmet, hogy annak ellenére, hogy az általuk alkalmazott *Pichia anomala* nem, vagy csak ritkán okoz humán megbetegedést, körültekintő veszélyelemzésre van szükség. A korábbiakban említettek szerint: toxikológiai szempontból döntő tényezőnek tekintik a gátló mikroorganizmus 37°C-on való szaporodását. ARRAS és munkatársai (1999) végeztek toxicitási vizsgálatokat kísérleti állatokon (tengeri malacon, egéren). Eredményeik alapján a máj, lép, vese és a tüdő nem mutatott kóros elváltozást *Pichia guillermondii*, *Candida oleophila* és *Rhodotorula glutinis* hatására.

A gyümölcsök és zöldségek romlási veszteségeinek elkerülésére gyakran alkalmaznak betároláskor fungicid kezelést. Feltételezve, hogy kombinált kezelés esetén – kisebb mennyiségben ugyan –, de szükség van a fungicid hatású vegyszerre, szükséges az antagonista mikroorganizmus vegszerrel szembeni érzékenységét is vizsgálni. Erre a célra az irodalomban több módszer található. LIMA és munkatársai (1997), valamint FREDLUND és munkatársai (2002) a tápközegbe keverték a különböző koncentrációjú fungicideket. A két kutatócsoport módszere abban különbözik, hogy az előbbiek szilárd tápközéget használtak és az antagonista

mikroorganizmus telepkepző egységét határozták meg, ezzel szemben FREDLUND és munkatársai folyékony tápközegben az élesztősejtek szaporodása következtében az optikai denzitás változását mérték az inkubáció során. Ezekről eltérő módszert alkalmaztak USALL és munkatársai (2001): az antagonista *Candida sake*-t előzetesen 30 percig különböző koncentrációban fungicid és antioxidáns tartalmú oldatban tárolták, majd a kezelést követően határozták meg hagyományos módszerrel az élősejtszámot.

Mikroorganizmusok gyakorlati alkalmazását megelőző lépés – nemcsak gyümölcsök, zöldségek tárolása során, hanem más iparágakban is – a laboratóriumi léptéket meghaladó félüzemi, üzemi kísérletek, melyek egyrészt kiterjednek magára a terményre/termékre, de a mikroorganizmus nagyléptékben történő előállítására is. Félüzemi kísérleteket végeztek PETERSSON és munkatársai (1999) gabonával: 160 kg búzát tartalmazó silókat készítettek olyan környezeti tényezőknek kitéve, melyek a valós tárolás során is kialakulnak (hőmérséklet-ingadozás 13 hónapon keresztül, légmentes zárás következtében kialakuló légösszetétel változás). USALL és munkatársai (2001) antagonista élesztővel kezelt almával végeztek félüzemi és üzemi tárolási kísérletet, az utóbbi esetben a biokontroll kezelést nemcsak hűtéssel, hanem vegyszeres kezeléssel és szabályozott légterű tárolással is társítva. LIMA és munkatársai (1997) szamócát nemcsak betakarítás után, hanem azt közvetlenül megelőzően, illetve még a virágzási szakasz alatt is permetezték gátló élesztő szuszpenzióval.

Kifejezetten biológiai védekezésre használt mikroorganizmus nagyléptékben történő előállításáról kevés adat található az irodalomban. Ez azzal is magyarázható, hogy a megfelelő paraméterek ismeretében, nagymennyiségű élesztőgomba, illetve baktérium szuszpenzió előállítása nem különbözik a más iparágakban erre a célra kifejlesztett módszerektől. VRIJE és munkatársai (2001) írják le részletesen *Coniothyrium minutans* nagyléptékben történő készítését. Ez a gátló élesztőgomba nem szaporodik jól folyadék fázisban, ezért szilárd fázisú fermentációt alkalmaztak ipari mértékű tenyésztésére. A nagymennyiségű biomassza előállítását követően szárítás következik. A porított, liofilezett, de visszanedvesíthető forma a tárolhatóság céljának megfelel, azonban a könnyebb és biztonságosabb felhasználhatóság érdekében a biokontroll mikroorganizmust granulátum vagy szuszpenzió formájában hozzák forgalomba (JANISIEWICZ és JEFFERS, 1997; VRIJE et al., 2001).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. A vizsgálatokhoz felhasznált tápközegek

A különböző szilárd és folyékony tápközegek összetevőinek mennyisége – ha másképp nem jelöltem – 1000 ml tápközegre vonatkozik.

- Maláta-glükóz tápközeg (MG)
  - 17 g maláta kivonat (MERCK 1.05397)
  - 5 g glükóz (REANAL 01010-08-38)
  - 20 g agar agar (MERCK 1.11925) (szilárd tápközeg esetén)
- Burgonya kivonatos tápközeg (Potato dextrose agar – PDA)
  - 39 g burgonya glükóz agar (MERCK 1.10130)
- Élesztőkivonat-pepton-glükóz tápközeg (YEPD)
  - 5 g élesztő kivonat (MERCK 1.11926)
  - 5 g pepton (MERCK 1.11931)
  - 10 g glükóz (REANAL 01010-08-38)
  - 20 g agar agar (MERCK 1.11925) (szilárd tápközeg esetén)
  - (A kívánt pH beállítása 0,1n HCl oldattal történt.)
- Metilénkék tápközeg
  - a) 500 ml puffer a kívánt pH érték beállításához
    - 0,1 M citromsav 1-hidrát ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) (REANAL 03125-1-38)
    - 0,2 M di-nátrium-hidrogén-foszfát 2-hidrát ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) (REANAL 04112-1-38)

<b>Puffer pH</b>	<b>0,1 M citromsav (ml)</b>	<b>0,2 M <math>Na_2HPO_4</math> (ml)</b>
<b>3,6</b>	339	161
<b>4,0</b>	307	193
<b>4,2</b>	294	206
<b>5,0</b>	243	257
<b>5,6</b>	210	290
<b>6,2</b>	169	331

b) 500 ml agaros rész:

- 5 g élesztő kivonat (MERCK 1.11926)
- 10 g pepton (MERCK 1.11931)
- 10 g glükóz (REANAL 01010-08-38)
- 25 g agar agar (MERCK 1.11925)

c) metilénkék törzsoldat (100 ml):

3 g metilénkék (REANAL 20951-1-99)

10 ml etanol (REANAL 09473-2-08-65)

90 ml desztillált víz

Az agaros részt és a puffert külön-külön kell sterilizálni, majd 60°C-ra visszahűtve kell egymással elegyíteni. Ezt követően kell 1 ml metilénkék törzsoldatot a tápközegbe csöppenteni.

- Almás tápközeg

850 ml 100%-os almalé (Hohes C, Happy Day)

16 g agar agar (MERCK 1.11925)

150 ml desztillált víz

Az agar agart a desztillált vízben feloldva illetve az almalevet külön kell sterilizálni (az almalé kis pH-ja miatt), majd 50°C-ra való visszahűtés után lehet összeönteni.

- Bengál rózsza – kloramfenikol tápközeg (RBC)

32,2 g bengál rózsza kloramfenikol agar (MERCK 1.00467)

- Hígító

8,5 g NaCl

1 g pepton (MERCK 1.11931)

- Tween-es hígító

8,5 g NaCl

1 g pepton (MERCK 1.11931)

2 g Tween 80

- Lágy agar (100 ml-re vonatkoztatva)

0,9 g NaCl (REANAL 24640-1-08-38)

0,2 g agar agar (MERCK 1.11925)

### 3.2. A vizsgálatok során alkalmazott mikroorganizmusok

A vizsgálatok során alkalmazott, törzsgyűjteményből származó mikroorganizmusokat – néhány kivételtől eltekintve – a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (NCAIM) bocsátották rendelkezésemre.

a) Penészgombák

*Penicillium expansum* NCAIM F00811

*Penicillium expansum* NCAIM F00601

A két penésztörzset MG ferde agaron, 25°C-on tenyésztettem, az egyes kísérletekhez 6-8 napos tenyészet konidiumait használtam. A konidium szuszpenzió sűrűségét Bürker-kamra segítségével határoztam meg, illetve állítottam be.

b) Élesztőgombák

*Kluyveromyces lactis* NCAIM Y01080, NCAIM Y0258, NCAIM Y00260

*Metschnikowia pulcherrima* NCAIM Y00681

*Sporobolomyces roseus* NCAIM Y00693

*Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman (J121) Dr. J. Schnürer ajándéka (Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden)

*Saccharomyces cerevisiae* S6 killerérzékeny törzs

A megnevezett élesztőgombákon kívül (részletes felsorolás a 2. mellékletben illetve a 19. táblázatban):

- 17 különböző hazai és külföldi törzsgyűjteményekből származó ismert élesztőtörzs
- Tokaji borból 29 és aszúszemekről származó 19 a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék munkatársai által izolált élesztőtörzs
- 23 almáról izolált élesztőtörzs.

Az élesztőtörzseket MG ferde agaron, 25°C-on tenyésztettem, az egyes kísérletekhez 2 napos tenyészet sejtjeit használtam. A szuszpenzió sejtsűrűségét Bürker-kamra segítségével határoztam meg, illetve állítottam be.

### 3.3. A vizsgálatok során alkalmazott módszerek

#### 3.3.1. Élesztőtörzsek almáról történő izolálása, identifikálása

Két Fejér megyéből és két Pest megyéből származó almafajtáról izoláltam élesztőtörzseket. Származási helyenként 3-3 alma felületéről külön-külön mostam le a mikroorganizmusokat 40 perces, 100 ml Tween-es hígítóban való rázatás során. Az alaphígításból kéttagú hígítási sort készítettem, melynek minden tagjából 100-100 µl-t szélesztettem RBC szilárd tápközeg felületére. A lemezeket 25°C-on 48 óráig inkubáltam. Az inkubációs idő elteltével kifejlődött – szemrevételezés alapján – különböző telepeket egyenként YEPD lemezek felületére szélesztettem egysejt tenyészet készítése céljából. Az RBC és YEPD lemezekon fejlődött telepeket morfológiai tulajdonságaik alapján csoportokba osztottam. A további vizsgálatokat a csoportok egy-egy kiválasztott tagjával folytattam. A későbbi vizsgálatok során ígéretesnek mutakozó élesztőtörzsek azonosítására API ID 32 C jelű identifikációs tesztet használtam.



### 3.3.2. Penicillium expansum fejlődését gátló élesztőtörzsek kiválasztása

*Penicillium expansum* F00811 és/vagy F00601 törzsének tenyészetéből  $10^6$  konidium/ml sűrűségű szuszpenziót készítettem. A szuszpenzióból 100-100 µl-t MG, illetve PDA tápközeg felületére szélesztettem. A beoltott lemezek felületére az élesztőtörzsek/izolátumok tenyészetéből kaccsal vonalenyészetet készítettem. A lemezeket 5 napig, 25°C-on inkubáltam. A lemezek kiértékelését szemrevételezéssel végeztem, mely alapján a vizsgált élesztőtörzseket csoportokba soroltam.

### 3.3.3. Antagonista élesztőtörzsek gátló hatásának vizsgálata, és összehasonlítása

45-50°C-ra visszahűtött tápközeg (MG/PDA) 5 ml-ébe 1 ml élesztő szuszpenziót kevertem. Az élesztő szuszpenzió sejtsűrűsége  $10^7$ ,  $10^5$  illetve  $10^3$  sejt/ml volt. A tápközeg – élesztő keveréket a fenti táptalajjal megegyező (MG/PDA) lemezek felületére öntöttem. Miután a tápközeg – élesztő keverék megdermedt, a lemez felületére 3 helyre 10-10 µl penész konidium szuszpenziót (sűrűség:  $10^5$  konidium/ml) cseppentettem. A kontroll minták nem tartalmaztak élesztőkeveréket. A vizsgálatokat két-két párhuzamos mintával végeztem. A lemezeket 25°C és 15°C-on 9 napig, illetve 5°C-on 14 napig inkubáltam. A 16. táblázat szemlélteti, hogy mely élesztőtörzsek hatását vizsgáltam az egyes penésztörzsek esetében.

16. táblázat: Az antagonista élesztőtörzsek gátló hatásának vizsgálata során alkalmazott penésztörzs – élesztőtörzs kombinációk áttekintése

<b>Penésztörzs</b>	<b>Gátló élesztőtörzs</b>
<i>Penicillium expansum</i> F00811	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Y00681 <i>Sporobolomyces roseus</i> Y00693 <i>Pichia anomala</i> (Hansen) Kurtzman (J121) <i>Kluyveromyces lactis</i> Y00260 <i>Kluyveromyces lactis</i> Y0258 <i>Kluyveromyces lactis</i> Y01080 Almáról izolált törzs (C jelű)
<i>Penicillium expansum</i> F00601	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Y00681 <i>Sporobolomyces roseus</i> Y00693 <i>Pichia anomala</i> (Hansen) Kurtzman (J121) <i>Kluyveromyces lactis</i> Y00260 Almáról izolált törzs (C jelű)

Az értékelés szemrevételezéssel, valamint a penésztelepek átmérőjének mérésével történt. A mérés során megkülönböztettem az egész telep (léghifát + szubsztrát hifát képző rész) és a telep konidium képző részének méretét.

### 3.3.4. Kluyveromyces lactis gátló hatásmechanizmusának vizsgálata

#### 3.3.4.1. *Sejtmentes szűrlet hatásának vizsgálata*

##### *Sejtmentes szűrlet készítése*

100 ml YEPD levest beoltottam egy oltókacsnyi *Kluyveromyces lactis* Y00260 törzssel, és 30°C-on 2 napig rázattam (180 rpm). A rázatás végén a tenyészet koncentrációja  $10^8$  sejt/ml volt. A rázatott tenyészetet 5 percig 4000 rpm sebességgel centrifugáltam, a felülúszóból 4×15 ml-t Petri csészébe adagoltam és -18°C fagyasztottam. Hasonlóan jártam el 15-15 ml steril YEPD levestel.

##### *Koncentrált sejtmentes szűrlet készítése*

A fent leírt módon elkészített sejtmentes szűrletet (2 sejtmentes szűrlet, 2 YEPD leves) Leybold GT-2 liofilező berendezéssel (Leybold GMBH, Németország) 45°C-on koncentráltam. A fagyasztva szárított mintákat 1,5-1,5 ml steril desztillált vízben vettem fel.

MG/PDA tápközegre külön-külön *Penicillium expansum* F00811 és F00601 törzs konidium szuszpenzióját (100 µl,  $10^6$  konidium/ml) szélesztettem.

3 helyen 6 mm átmérőjű lyukat fúrtam, melybe 100-100 µl-t pipettáztam a 1. fagyasztott és felengedett sejtmentes szűrletből; 2. a koncentrált sejtmentes szűrletből; 3. a koncentrált YEPD levestől. A liofilezett YEPD leves kontrollként szolgált, mellyel ellenőriztem, hogy a koncentrált tápanyagok (pl. sók) nem okoznak-e önmagukban gátlást. A lemezeket 22°C-on inkubáltam egy hétig. A lyukak körüli penészgomba növekedést vizsgáltam.

#### 3.3.4.2. *Killertoxin képzés vizsgálata*

Előtenyészetet készítettem *Kl. lactis* Y00260 törzssel 50 ml YEPD levesben, 30°C-on való rázatással (180 rpm). 24 óra elteltével az élesztő szuszpenzió sűrűsége  $10^8$  sejt/ml volt. Az előtenyészet 1-1 ml-ével 100-100 ml YEPD levest (pH 3,5; 4; 4,2; 5; 5,3; 6,2) oltottam be. A tenyészeteket 48 óra hosszat, 25°C-on, rázógépen (180 rpm) inkubáltam.

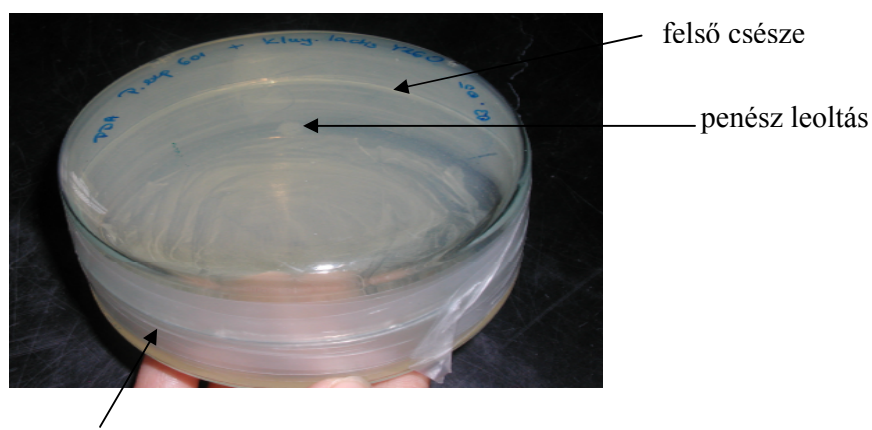
A tenyésztés 24. és 48. órájában 1,5-1,5 ml mintát vettem ki Eppendorf csövekbe. Centrifugálást (14.000 rpm, 5 min) követően a vizsgálat további részéhez a sejtmentes felülúszót használtam.

Az élesztőtörzs killertoxin képzését agarlyuk diffúziós próbával vizsgáltam. A *Kl. lactis* fent leírt tenyésztési körülményeivel közel azonos pH-jú metilénkék lemezeket készítettem (pH 3,6; 4; 4,2; 5; 5,6; 6,2). S6 killer érzékeny élesztőtörzs szuszpenziójának ( $10^7$  sejt/ml) 100-100 µl-ét szélesztettem a metilénkék lemezekre, melyeken a szuszpenzió száradását követően 6 mm átmérőjű lyukakat fúrtam. A lyukakba a közel azonos pH-jú YEPD levesben tenyésztett *Kl. lactis* Y00260 sejtmentes szűrletének 100-100 µl-ét pipettáztam. A lemezeket 22°C-on 2 napig inkubáltam. Az értékelés során a lemezekbe fúrt lyukak körüli S6 élesztőtörzs növekedését figyeltem.

### 3.3.4.3. *Kluyveromyces lactis* által termelt gáznemű anyagok hatásának vizsgálata

#### Illékony komponens által kifejtett gátlás vizsgálata

Az élesztőtörzsek illékony komponensének gátló hatását két olyan egymással szembe fordított Petri csésze segítségével vizsgáltam, melyben az alsó csészében az antagonista élesztő tenyészetet, a felsőben pedig a gátló kívánt penész tenyészetet oltottam (7. ábra). Az alsó csészében a tápközeg felületére 48 órás élesztőtenyészetből készített  $10^7$  sejt/ml sűrűségű szuszpenzióból 100  $\mu$ l-t szélesztettem. A felső csészében a tápközeg felületére  $3 \times 10$   $\mu$ l penész konidium szuszpenziót ( $10^5$  konidium/ml) cseppentettem. A konidium szuszpenziót lágyagarral készítettem. Két-két csészét egymással szembe fordítottam, és oldalukat több rétegben bevontam parafilmmel. Ily módon a tenyészetek egy légtérben voltak, de egymással nem érintkeztek. A kontroll mintában az alsó csészét nem oltottam be élesztővel. A kísérletet MG és PDA tápközegen végeztem a két *Penicillium expansum* és a három *Kl. lactis* törzs összes lehetséges kombinációjával, két-két párhuzamos mintával. A lemezeket 22°C-on 16 napig, 5°C-on 23 napig inkubáltam. A gátlás mértékét a penésztelep átmérője alapján állapítottam meg. Az itt leírt módszert a Swedish University of Agricultural Sciences Mikrobiológia Tanszékén Dr Johann Schnürer és munkatársai dolgozták ki.



alsó csésze: élesztővel beoltva

7.ábra Illékony komponensek hatásának vizsgálata egymással szembe fordított Petri csészékkel

#### Főbb illékony komponensek azonosítása, és hatásuk vizsgálata

A *Kl. lactis* által termelt illékony vegyületek főkomponensei egymással szembe fordított Petri csészék közötti légtérből gázkromatográfiás (GC/MS) módszerrel kerültek azonosításra a Budapesti Corvinus Egyetem Központi Laboratóriumában. A mérések HP 5890A (Hewlett-Packard Company, Avondale, PA) típusú gázkromatográfal készültek, mely közvetlen

interfészsel kapcsolódik egy VG TRIO-2 (VG Masslab Ltd., Altrincham, UK) típusú kvadrupol tömegspektrométerhez. A mérések paramétereit a 17. táblázat foglalja magába. Az adatokat PDP 11/53 adatrögzítő gyűjtötte.

Az illékony komponensek vizsgálatát a szilárd fázisú mikroextrakció (SPME) egészítette ki. Az adszorbens szál 100 µm polidimetil-sziloxánnal bevont szál (Supelco, Bellefonte, PA). Az adszorpció 60°C-on 30 percen keresztül zajlott.

Az egyes komponensek azonosítása a standardok retenciós ideje és az egyes tömegszámoknál mért ionáram intenzitás arányok alapján történt.

A GC/MS vizsgálatokhoz az alábbi mintákat készítettem elő:

- egymással szembe fordított Petri csészék – az alsó lemez *Kluyveromyces lactis* Y00260 10<sup>7</sup> sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával beoltva,
- vak minta I.: egymással szembe fordított Petri csészék – két, csak steril MG tápközeget tartalmazó lemez
- vak minta II.: két egymással szembe fordított steril, üres Petri csésze.

17. táblázat A GC/MS mérés paramétereit

<b>Gázkromatográfiás paraméterek</b>	
kapilláris oszlop	25 m × 0,2 mm Ultra-2, 0,33 µm metilszilikon bevonattal (Hewlett-Packard Company, Avondale, PA)
hőmérséklet program	60°C 2 perc izoterm felfűtési sebesség 15°C/perc 280 °C-ig 15 perc hőntartás
injektor és interfész hőmérséklet	280°C
<b>Tömegspektrometriás paraméterek</b>	
ionforrás hőmérséklete	280°C
üzemmód	EI scan üzemmód, EE=70eV
	szelektív ion üzemmód (SIR)
tömegszámok	m/e 70, 71, 73

Az egyes azonosított komponensek *Penicillium expansum* F00601-re kifejtett hatását a fejezetben többször alkalmazott módszerrel vizsgáltam oly módon, hogy a szembe fordított Petri csészék felső lemezére oltottam penészt (3×10µl, 10<sup>5</sup> kon/ml), az alsó lemezre az azonosított komponensek kereskedelemben kapható változatának 1% és 10%-os hígítású oldatát (100 µl) szélesztettem.

### *Kluyveromyces lactis* által termelt széndioxid mennyiségének mérése

Vizsgáltam *Kl. lactis* Y00260 törzs anyagcsere folyamatai következtében a két Petri csésze által közrezárt térben megváltozó gázösszetételt. A kísérlet során csak az alsó csészét oltottam be az élesztő  $10^7$  sejt/ml sűrűségű szuszpenziójával (100  $\mu$ l). A 25°C-on való tenyésztés 2. és 5. napján Combi Check 9800-1 (PBI DANSENSOR) gázelemző készülékkel mértem a CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> összetételt. Ehhez a gázelemző mintavevő tűjét beszúrtam a két Petri csésze közé, és a légtérből 30 ml mintát vettem. A kísérletet 5 párhuzamos mintával végeztem.

#### 3.3.4.4. *Mikroszkópos vizsgálat*

A penész-élesztő kölcsönhatás mikroszkópos vizsgálatához tárgylemez tenyészetet készítettem. Steril tárgylemezre 0,5-1 ml 45°C-os – még folyékony – MG tápközeget szélesztettem. Miután a tápközeget megszilárdult, *Kl. lactis* Y00260 sejt szuszpenziójának ( $10^7$  sejt/ml) és *P. expansum* F00601 konidium szuszpenzió ( $10^6$  konidium/ml) keverékének 10  $\mu$ l-ét cseppentettem rá. Kontrollként csak penész konidiumot tartalmazó szuszpenziót ( $10^6$  konidium/ml) alkalmaztam. A tárgylemezeket steril Petri csészébe helyeztem, és a megfelelő nedvességtartalom biztosítása mellett 25°C-on inkubáltam. A penész konidium csírázását és hifa növekedését fénymikroszkóppal kísértem figyelemmel.

#### 3.3.4.5. *Kluyveromyces lactis szaporodásának vizsgálata két különböző tápközegen*

*Kluyveromyces lactis* Y00260 és Y0258 törzs tenyészetéből készített  $10^3$  sejt/ml sűrűségű szuszpenzió 100-100  $\mu$ l-ét MG és PDA lemezre szélesztettem. A lemezeket 25°C és 5°C-on inkubáltam. A 25°C-os tárolás 1., 2., 5. és 9. napján (az Y0258 törzs esetében a 2., 6. és 9. napján), az 5°C-os tárolás 8. és 14. napján kezelésként 2 párhuzamosan egy-egy lemezt homogenizáltam 50 ml hígítóval Stomacher (BAGMIXER, INTERSCIENCE) készülékben 1 percig. Az így elkészített szuszpenzió hígítási tagjaiból lemezöntéssel állapítottam meg egyes lemezeken jelenlevő élesztősejtek számát. A lemezöntést YEPD táptalajjal végeztem, a lemezeket 30°C-on 2 napig inkubáltam.

#### 3.3.5. Élesztőgomba *Penicillium expansum* törzsek patulin termelésére kifejtett hatásának vizsgálata

A penészgomba törzsek patulin termelésének vizsgálata két lépésben történt: (1) nyomon követtem a két *P. expansum* törzs által termelt patulin mennyiségének változását az idő függvényében, illetve (2) vizsgáltam két élesztőgomba (*M. pulcherrima*, *Kl. lactis*) hatását *P. expansum* F00811 törzs patulin termelésére.

A patulin mennyiségének időbeni változásához 250-250 ml MG folyékony tápközeget 1-1 ml  $10^5$  kon/ml sejtsűrűségű *P. expansum* F00811, illetve F00601 konidium szuszpenzióval oltottam be. A tenyészeteket 20-22°C-on rázattam, az inkubálás 3., 6. és 9. napján mintát vettem.

Az élesztőgomba mikotoxin termelésre kifejtett hatásának vizsgálatához szintén MG folyékony tápközeget oltottam be a következőképpen:

- a) kontroll – *P. expansum* F00811 ( $10^5$  kon/ml);
- b) *P. expansum* F00811 ( $10^5$  kon/ml) + *M. pulcherrima* szuszpenzió ( $10^6$  cell/ml);
- c) *P. expansum* F00811 ( $10^5$  kon/ml) + *Kl. lactis* szuszpenzió ( $10^6$  cell/ml).

A tenyészeteket 20-22°C-on 6 napig rázattam.

Mindkét esetben a mintákat 0,2  $\mu$ m pórus átmérőjű membránszűrőn szűrtem, majd a további vizsgálatig fagyaszttva tároltam (-18°C).

A mikotoxin kimutatás nagyhatékonyságú folyadék kromatográfias módszerrel (HPLC) történt, Spectra Physics (Spectra Physics, USA) készüléken végeztük a Konzervipari Kutató-, Fejlesztő és Minőségvizsgáló Kht-ban, a 18. táblázatban feltüntetett paraméterek szerint.

18. táblázat Folyadékkromatográfias vizsgálat körülményei

oszlop	LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m) endcapped, 250×4 mm, cartridge rendszerű (MERCK)
előtét oszlop	LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m) endcapped, 4×4 mm (MERCK)
eluens	víz/acetonnitril (90/10)
áramlási sebesség	1 ml/min
injektált térfogat	10 $\mu$ l
detektálás hullámhossza	276 nm
módszer kimutatási határa	10 $\mu$ g/kg

### 3.3.6. Kombinált kezelés hatásának vizsgálata

#### 3.3.6.1. *Módosított atmoszféra és antagonisták élesztő alkalmazásának vizsgálata*

A 3.3.3. fejezetben leírt módszerrel megegyező módon készítettem el mintáimat. A vizsgált penészgomba a *P. expansum* F00601 volt, az alkalmazott antagonisták pedig *Kl. lactis* Y00260 és *M. pulcherrima* Y00681 voltak.

Az előkészített Petri csészéket tartályokba helyeztem el, melyeknek külön-külön állítottam be a széndioxid koncentrációját. A kívánt széndioxid koncentráció (6%, 22% CO<sub>2</sub>) beállításához Wösthoff pumpát használtam, mely levegő-CO<sub>2</sub> keveréket juttatott a tartályokba. A tartályba

bejuttatott széndioxid mennyiségét a CO<sub>2</sub> palack szabályzójával végeztem, a tartályok légösszetételét Combi Check 9800-1 (PBI DANSENSOR) gázelemző készülékkel ellenőriztem. A kísérletekben egy-egy tartály légösszetétele a levegőével megegyező volt, ez szolgált kontrollként. Az egyes mintavételek után a kívánt légösszetételt újra beállítottam. A lemezeket a tartályokban 20°C-on 2 hétig inkubáltam.

Az értékelés szemrevételezéssel, valamint a penésztelepek átmérőjének mérésével történt. A mérés során megkülönböztettem az egész telep (léghifát + szubsztrát hifát képző rész) és a telep konidium képző részének méretét.

### 3.3.7. In vivo kísérletek

#### 3.3.7.1. *Almás tápközegen végzett kísérletek*

Almás tápközeggel a 3.3.3. fejezetben leírt módon lemezeket készítettem. A penészgomba törzsek *P. expansum* F00811 és F00601 voltak, a vizsgált antagonista élesztőtörzsek *Kl. lactis* Y00260 és egy almáról izolált (C jelű) törzs volt.

#### 3.3.7.2. *Almán végzett kísérletek*

Kereskedelemből, illetve gyümölcsösből származó nyári almát (Goldstar, pH 3,5-4) hideg vízben mostam, majd szárazra töröltem. A gyümölcs három különböző pontján 4 mm átmérőjű, kb. 5 mm mély lyukakat fúrtam. A lyukakat az alábbi módon oltottam be:

- a) külön-külön 10 µl 10<sup>5</sup> konidium/ml sűrűségű *P. expansum* F00811, illetve F00601 szuszpenzióval;
- b) külön-külön 10 µl 10<sup>7</sup> sejt/ml *M. pulcherrima* Y00681, valamint *Kl. lactis* Y00260 szuszpenzióval
- c) 10-10 µl *P. expansum* + élesztő szuszpenzióval;
- d) nem oltottam be.

A kísérletet ugyanezen körülmények között hűtőtárolóból származó almával (Jonathan, pH 3,9-4,0) az F00811-es penésztörzsszel és *Kl. lactis* Y00260, valamint az általam almáról izolált (C jelű) élesztőtörzsszel is elvégeztem.

Az almákat 25°C illetve 8°C-on tároltam 20 napig. Az értékelést a fűrt lyukak körül kialakuló – penészes romlásra utaló – barnulási foltok mérésére alapoztam.

### 3.4. Statisztikai módszerek

A kísérletek értékelése során a vizsgált tényezők (pl penésztelep átmérő) időbeni változásának szemléltetésekor a Microsoft Excel táblázat kezelő program statisztikai függvényeit (átlag-, szórás számítás) alkalmaztam.

Több tényező (pl. különböző élesztőgombák) meghatározott paraméter szerinti összehasonlításakor STATGRAPHICS 5.1 statisztikai programmal számított Duncan-féle t-próbát (95%-os valószínűségi szinten) vettem figyelembe. Az oszlop diagramokon a szignifikáns differenciát az ABC betűivel jeleztem.

*Kluyveromyces lactis* törzsek hatékonyságának összehasonlítása során 4 tényezős varianciaanalízist végeztem a STATGRAPHICS 5.1 statisztikai programmal. Az adatok könnyebb kezelhetősége és értékelése érdekében, külön-külön végeztem el a 4 tényezős varianciaanalízist a három tárolási hőmérséklet adataira. Ezen felül a 4 tényezős varianciaanalízist két lépcsőben kellett kivitelezni. Elsőként egy adott hőmérsékleten nyert adatokkal egytényezős varianciaanalízist hajtottam végre oly módon, hogy a különböző tényezők (táptalaj/alkalmazott élesztőtörzs/élesztő szuszpenzió sejtűrűsége/tárolási idő) kombinációjához tartozó 6-6 párhuzamos adatot egy csoportba soroltam és azonos kóddal láttam el. Az adatok előkészítését úgy módosítottam, hogy az egytényezős varianciaanalízishez a 0 szórású csoportokat kihagytam. Ezt követően harmonikus átlagot számítottam az alábbi módon:

$$h = \frac{\text{összes csoport száma}^*}{(1/6)x + (1/5)y + (1/4)z + \dots}$$

\*0 szórásúakkal együtt

x, y, z azt fejezi ki, hogy a csoportok közül hány db olyan van, amelyben 6 vagy csak 5, 4 vagy kevesebb párhuzamosan leoltott telep volt mérhető.

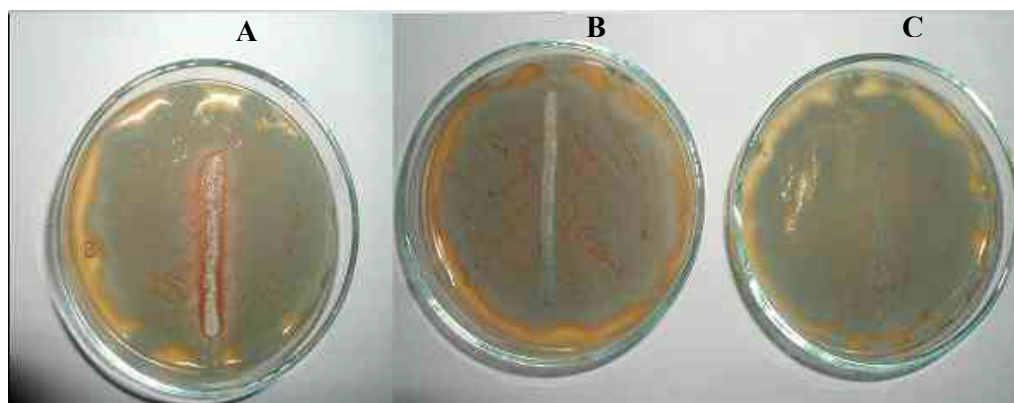
A csoporton belüli (maradék) átlagot osztva a harmonikus átlaggal a maradék szórás értékéhez jutunk. Az adatelemzés második lépéseként a különböző tárolási hőmérsékleten felvett adatok 6-6 párhuzamosának átlagértékével dolgoztam, és ezekkel végeztem el a négytényezős varianciaanalízist. Ennek varianciaanalízis táblázatában a maradék négyzetösszeg, szabadsági fok illetve szórás értéke 0. A további számításokhoz ide az egytényezős varianciaanalízis során számolt maradék (csoporton belüli) négyzetösszeget, szabadsági fokot illetve maradék szórást helyettesítettem be. A szignifikáns differencia számítását a Scheffe próba szerint végeztem.



## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. *Penicillium expansum* fejlődését gátló élesztőtörzsek kiválasztása

Az izolálási eljárás során a négy különböző származási helyű és fajtájú almáról 58 élesztő izolátumot 23 – morfológiai tulajdonságaik alapján különböző – csoportba soroltam. A 23 csoport egy-egy kiválasztott tagjának, valamint aszúszemről, tokaji borból izolált élesztőtörzsek, illetve törzsgyűjteményből származó ismert élesztőtörzsek gátló hatását vizsgáltam *Penicillium expansum* két törzsére. Az élesztő-penész kölcsönhatás szempontjából az élesztőtörzseket három csoportra lehetett osztani: (A) a penész benőtte a lemezt, de az élesztőtörzs vonaltenyészetét körül teljes és/vagy részleges gátlás volt tapasztalható; (B) a penész benőtte a lemezt és szorosan körülötte az élesztőtörzs vonaltenyészetét; (C) a penész teljesen benőtte a lemezt és az élesztőtörzs vonaltenyészetét. Részleges gátlás esetén a penész konidium fejlődésében mutatkoztak eltérések, teljes gátlás esetén nemcsak a konidium képzést, hanem a hifa növekedést is visszaszorította az adott élesztőtörzs egy keskeny zónában (8. ábra). Az ily módon három kategóriába sorolható élesztőtörzsek/izolátumok csoportosítását a 19. táblázat és a 2. melléklet a), b), c) és d) része mutatja be.



8. ábra Screenelés során tapasztalt penész-élesztő kölcsönhatások (A: részleges/teljes gátlás; B: a penész szorosan körülnövi; C: a penész teljesen benövi az élesztő vonaltenyészetét)

A későbbi vizsgálatok szempontjából azokat az élesztőtörzseket és izolátumokat helyeztem előtérbe, melyek körül gátlási zóna alakult ki. Ezért az almáról izolált élesztő csoportok közül az A, C, F, H, K jelűeket azonosítottam (19. táblázat). Az API identifikációs teszt alapján a C, F, H, K jelű törzsek *Metschnikowia pulcherrima* fajhoz tartoznak. Az A jelű törzset az API teszttel nem lehetett azonosítani.

19. táblázat *Penicillium expansum* törzseivel szemben teljes és/vagy részleges gátlást kifejtő élesztőtörzsek, -izolátumok

Penész-törzs	Táptalaj	Törzsgyűjteményből származó törzsek	Almáról származó izolátumok	Aszúszemről, tokaji borból származó izolátumok
<i>P. expansum</i> F00811	MG	<i>Kluyveromyces lactis</i> Y00260 <i>Kluyveromyces lactis</i> Y0258 <i>Kluyveromyces lactis</i> Y00251 <i>Pichia anomala</i> J121 <i>Geotrichum candidum</i>	C, F, H	-
	PDA		A, C, F, H	-
<i>P. expansum</i> F00601	MG		C, H, K	-
	PDA		A, C, H, K	-

#### 4.2. Antagonista élesztőtörzsek gátló hatásának vizsgálata.

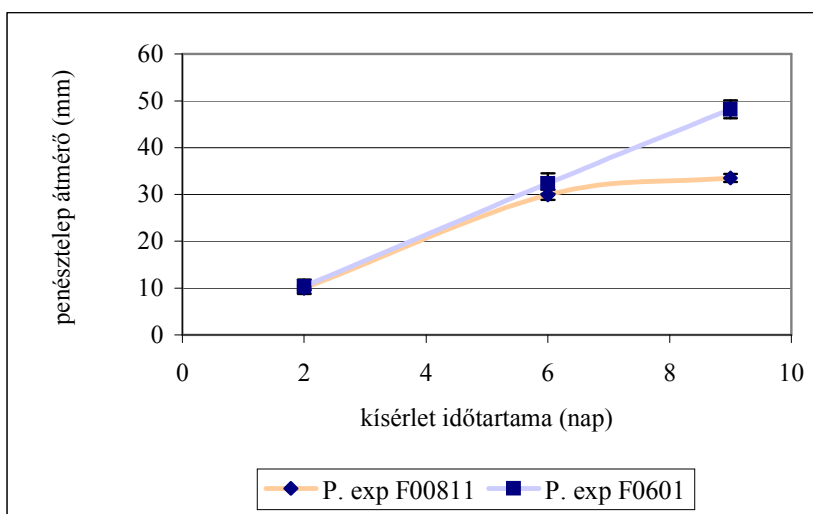
##### 4.2.1. Három biokontroll élesztőtörzs gátló hatásának elemzése

A szakirodalomból biokontroll élesztőgomba fajként ismert *M. pulcherrima*, *Sp. roseus* és *Pich. anomala* gátló hatását különböző kutatóhelyeken más-más módszerrel vizsgálták. Ahhoz, hogy további – gátló hatásuk tekintetében ismeretlen – élesztőtörzsek vizsgálatához megfelelő alapot képezzenek, egy adott módszerrel kellett hatásukat elemezni. A kiválasztott három élesztőtörzs penészekkel szembeni viselkedése egymáshoz képest hasonló volt, de a hatásukat a választott körülmények befolyásolták. Ezért a gátló hatást a választott *P. expansum* törzs, az antagonista élesztő szuszpenzió koncentrációja, az alkalmazott táptalaj illetve a hőmérséklet függvényében elemeztem (3., 4. és 6. melléklet). A tárolási hőmérséklet befolyásoló hatására részben a Kombinált kezelések hatása c. fejezetben is ki fogok térni (4.4. fejezet).

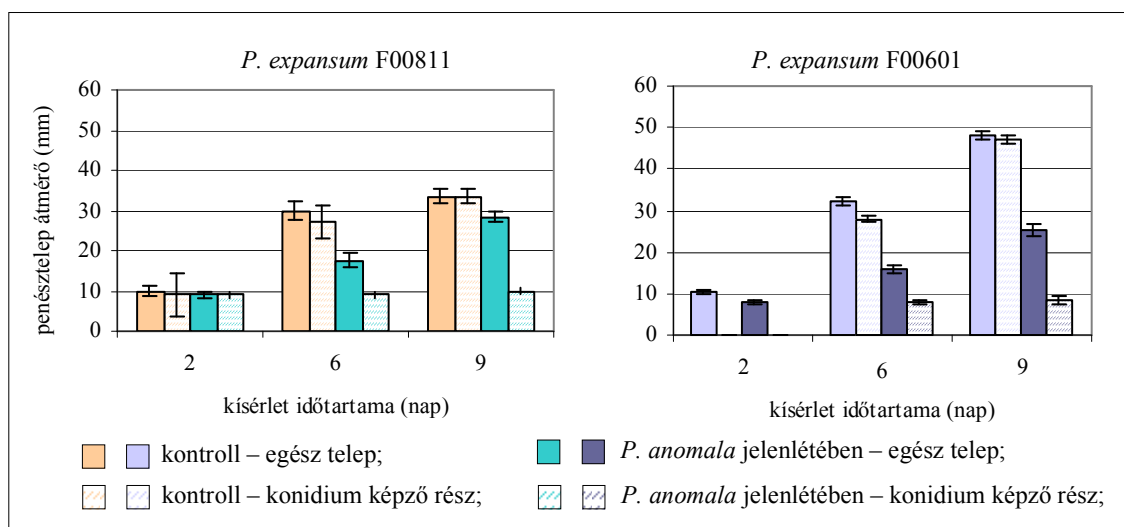
##### 4.2.1.1. *Penicillium expansum* törzsek összehasonlítása a gátlás szempontjából

A két vizsgált *P. expansum* törzs telepei az idő függvényében különböző növekedést mutattak. Az F00811 penésztörzs kontroll telepeinek növekedése 25°C és 15°C-on a tárolás 5. napjától kezdve lassult, majd stacioner fázisba lépett át. Ebben a szakaszban a telepek átmérői 30 és 40 mm közé estek. Ezzel szemben az F00601 *P. expansum* törzs kontroll telepei ugyanezen körülmények között a vizsgált időben végig állandó növekedést – exponenciális fázist – mutattak

(9. ábra). A telepek átmérői a 9. napon 40 és 65 mm közé estek, táptalajtól és hőmérséklettől függően. 5°C-on mindkét törzs esetében 6-7 napos lappangási szakaszt követően lehet a növekedés exponenciális fázisát felismerni, mely még a kísérlet lezárásakor is – a 14. napon – folyamatban van. A penésztörzsek kontroll telepeinek ilyenfajta különbözősége mindkét táptalajon megfigyelhető volt.



9. ábra *Penicillium expansum* törzsek kontroll telepeinek növekedése 25°C-on, MG táptalajon



10. ábra *Pich. anomala* ( $10^5$  sejt/ml) által kifejtett gátló hatás a két különböző *P. expansum* törzs egész telepére (léghifa+szubsztrát hifa) és a penésztörzsek konidium képző részére, 25°C-on, MG táptalajon.

A két *P. expansum* törzs antagonista élesztő jelenlétében is eltérő viselkedést mutatott. Ez a 10. ábrán és a 20. táblázatban követhető nyomon. Az alkalmazott élesztőtörzsek az F00811 törzs telepeit kisebb mértékben tudták gátolni, mint az F00601 penésztörzs telepeit, ha az egész telep (léghifa+szubsztrát hifa) átmérőjét vettem figyelembe. Egyes esetekben „negatív gátlás” volt megfigyelhető, azaz kis sűrűségben jelenlevő antagonista élesztő serkentette a penésztelep növekedését.

*P. expansum* F00811 törzs léghifás és szubsztrát hifás részét ugyan nem minden esetben lehetett a vizsgált élesztőgombákkal hatékonyan gátolni, a konidium képző rész mérése során azonban mindkét penésztörzs esetén jelentős mértékű gátlás volt megfigyelhető.

#### 4.2.1.2. Antagonista élesztő szuszpenzió koncentrációjának hatása a gátlásra

Az antagonista élesztő szuszpenzió koncentráció növelésének hatását a 20. táblázat szemlélteti.

20. táblázat Növekvő koncentrációban és különböző táptalajon alkalmazott antagonista élesztőtörzsek által kifejtett gátló hatás mértéke a 25°C-on mért kontrollhoz viszonyítva a három tárolási hőmérséklet (25°C, 15°C és 5°C) figyelembevételével, a kísérlet végén.

<i>P. exp.</i>	Táptalaj	élesztő szuszpenzió koncentrációja (sejt/ml)								
		<i>M. pulch</i> (Y00681)			<i>Sp. roseus</i> (Y00693)			<i>Pich. anomala</i> (J121)		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
F00811	MG	-4-40%	-4-58%	12-80%	32-40%	47-59%	27-59%	-12-23%	12-34%	70-78%
	PDA	-4-35%	26-64%	5-84%	13-35%	42-65%	63-79%	-20-9%	21-29%	66-79%
F00601	MG	64-81%	54-84%	72-100%	78-82%	82-86%	83-85%	38-71%	49-80%	66-79%
	PDA	54-85%	42-88%	55-100%	76-82%	85-86%	81-87%	53-74%	85-87%	85-88%

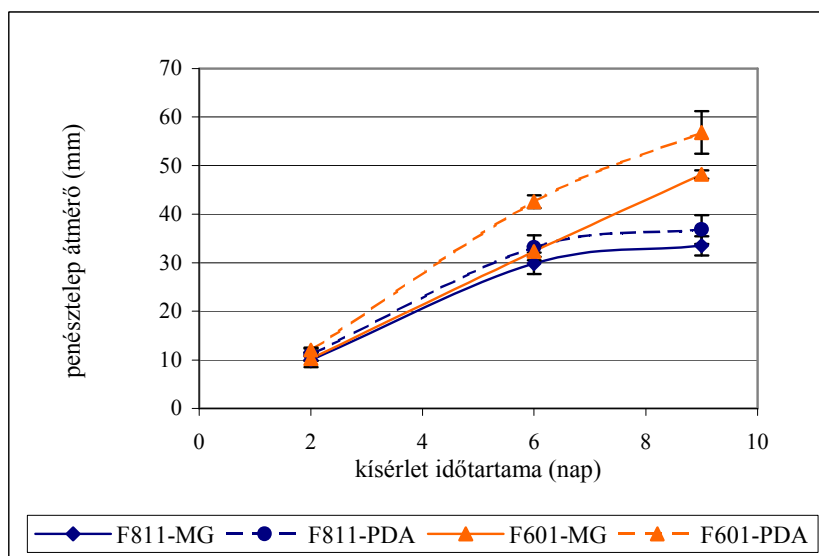
Egy adott élesztőtörzs sejtsűrűségének növelésével a legtöbb esetben növekvő gátlás volt megfigyelhető. A fokozódó gátlás tendenciájától két különböző jellegű eltérés volt tapasztalható: a) *M. pulcherrima* illetve *Pich. anomala* alkalmazásakor egyes esetekben a 10<sup>3</sup> és 10<sup>5</sup> sejt/ml sejtsűrűség kisebb mértékű gátlást, a 10<sup>7</sup> sejt/ml koncentráció ellenben jóval nagyobb mértékű

gátlást okozott; b) *Sp. roseus* alkalmazásának egyes eseteiben a  $10^3$  és  $10^5$  sejt/ml sejtsűrűség lineáris mértékben fokozódó gátlást eredményezett,  $10^7$  sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót alkalmazva viszont nem nőtt a gátlás mértéke.

Az antagonista élesztőtörzs hatékonyságának koncentráció függőségét vizsgálva, az is megfigyelhető, hogy kis sejtsűrűséget alkalmazva *Sp. roseus* bizonyult hatékonyabbnak, ezzel szemben  $10^7$  sejt/ml koncentrációjú élesztő szuszpenziót alkalmazva *Pich. anomala*-nak volt erősebb gátló hatása.

#### 4.2.1.3. Különböző tápközegek alkalmazásának hatása a penész gátlásra

Mindkét penésztörzs kontroll leoltásainak vizsgálatakor tapasztalható volt az a jelenség, hogy ugyanazon körülmények között PDA tápközegen nagyobb átmérőjű telepek fejlődtek (11. ábra), de ez statisztikailag csak az F00601 *P. expansum* törzs esetében volt igazolható.



11. ábra Két *Penicillium expansum* törzs kontroll telep növekedésének összehasonlítása MG és PDA táptalajon, 25°C-on.

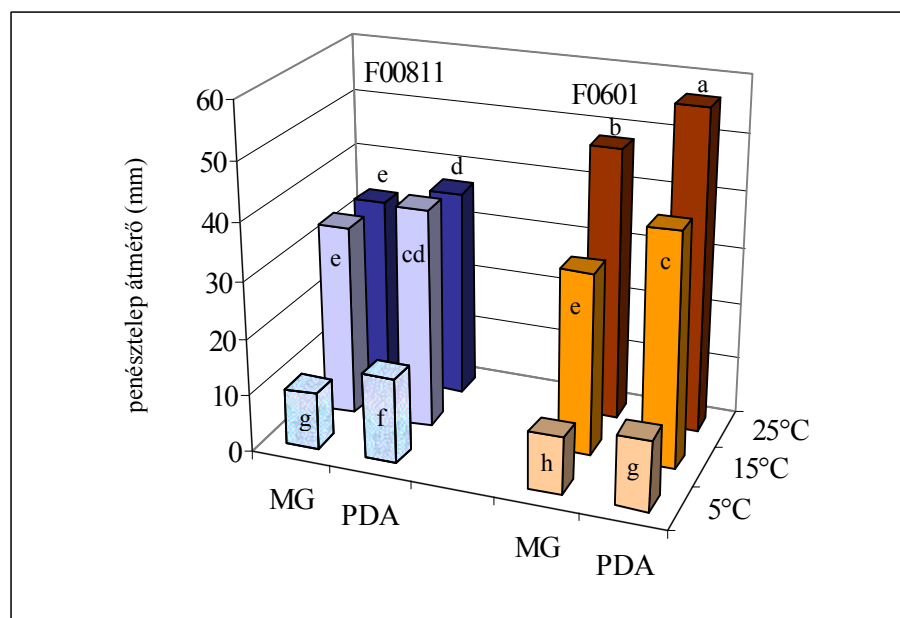
A táptalajok közötti különbség az antagonista élesztővel történő gátlás során is megjelent. A 20. táblázatról leolvasható, hogy ugyanazon penésztörzs esetén PDA táptalajon az egyes élesztőtörzsek nagyobb mértékű gátló hatást fejtettek ki, mint MG táptalajon.

#### 4.2.1.4. Antagonista élesztők gátló hatása a tárolási hőmérséklet függvényében

Különböző tárolási hőmérsékletet alkalmazva is megfigyelhető volt a vizsgált *P. expansum* törzsek közötti különbség. A 25°C-on és 15°C-on való tárolás során az F00811 penésztörzs

kontroll telepeinek átmérője között nem mutatkozott szignifikáns különbség. Erre a penésztörzsre az 5°C-os tárolás fejtett ki jelentős gátló hatást. A *P. expansum* F00601 törzs esetében mindhárom különböző tárolási hőmérséklet hatása egyértelműen észlelhető volt a kontroll telepek átmérőinek különbségében (12. ábra).

A penésztörzsek kontroll telepeinél megfigyelt jelenség az antagonista élesztők jelenlétében növekvő telepeinél is tapasztalható volt (21. táblázat). Az F00811 törzs esetében 15°C-on közel azonos mértékű a gátló élesztők hatása, mint 25°C-on. *M. pulcherrima* és *Sp. roseus* alkalmazásakor még az is előfordult, hogy az antagonista élesztő által kifejtett gátló hatás mértéke kisebb volt 15°C-on, mint 25°C-on, de figyelembe véve, a %-ban kifejezett gátlás valós értékét, ez a különbség a legtöbb esetben nem jelentett gyakorlati szempontból jelentős eltérést. 5°C-on való tárolás hatására az élesztők által kifejtett gátlás jelentős mértékben fokozódott. Ez magyarázható azzal, hogy a kis hőmérséklet – mint környezeti tényező – önmagában is jelentősen gátolja a *P. expansum* növekedését. Ennek ellenére, mint minden tárolási hőmérséklet esetén, a táblázatból itt is egyértelműen leolvasható az élesztők antagonista hatása.



12. ábra *P. expansum* törzsek kontroll telepeinek fejlődése a hőmérséklet függvényében a kísérlet 9. napján. Az azonos betűjelű kezelések között nincs szignifikáns differencia ( $P=0,05$ )

Az F00601 penésztörzs telepeinek fejlődésén az antagonista élesztők jelenléte mellett is érzékelhető volt a 25°C és 15°C illetve a 15°C és 5°C tárolási hőmérsékletek közötti különbségek hatása. 5°C-on való tárolás esetén a kis hőmérséklet dominánsabbnak tűnik az antagonista élesztőtörzsek gátló hatásánál, mivel 5°C-on a kontrollhoz képest kisebb volt az élesztők hatékonysága, mint 25°C és 15°C-on.

21. táblázat Antagonista élesztőtörzsek gátló hatása (%) a hőmérséklet függvényében. 25°C-on tárolt kontroll telepek átmérőihöz viszonyítva,  $10^5$  sejt/ml koncentrációjú élesztő szuszpenzió esetén.

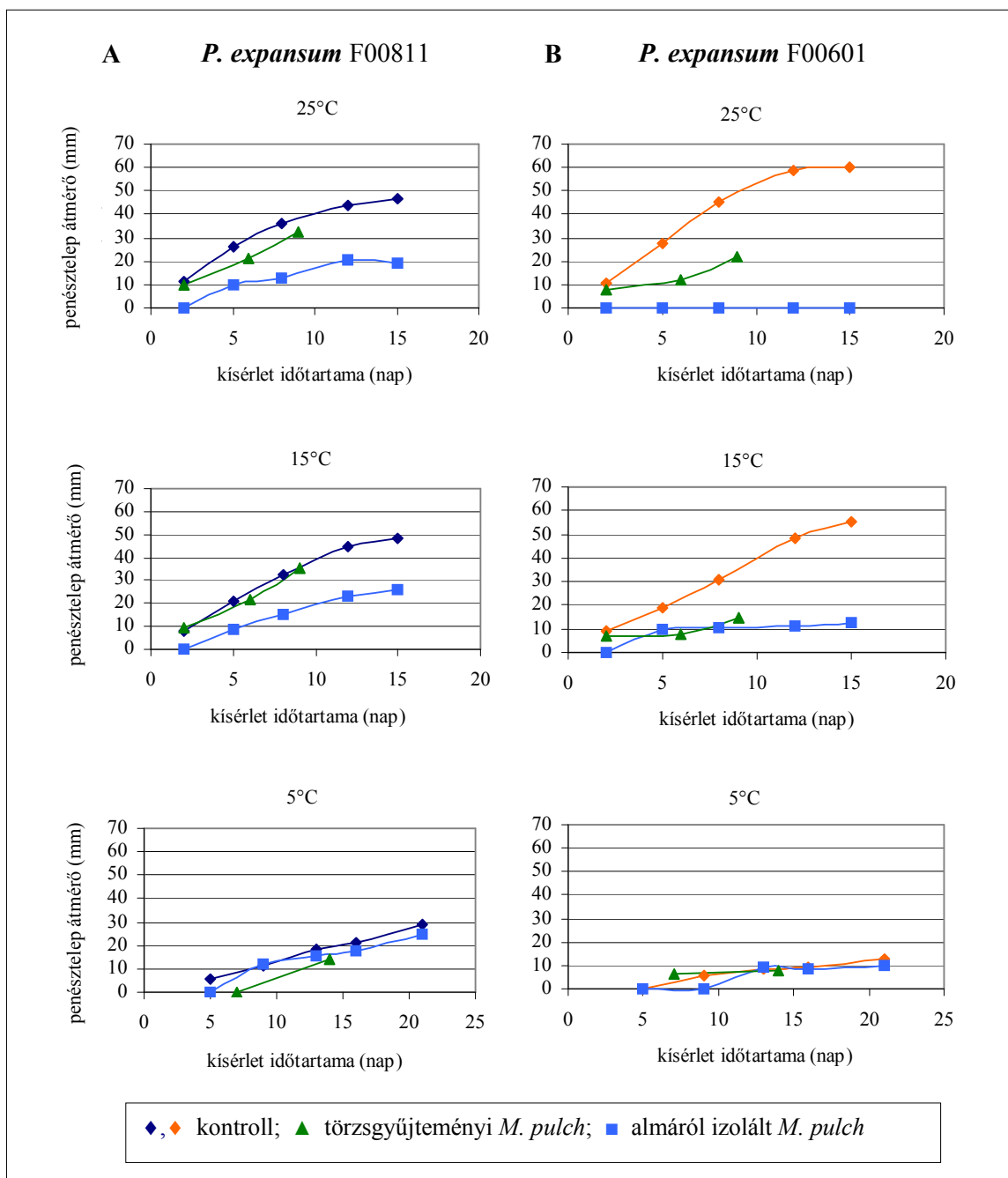
Penésztörzs	Táptalaj	Hőmérséklet	Penész kontroll	<i>M. pulcherrima</i>	<i>Sp. roseus</i>	Penész kontroll	<i>Pich. anomala</i>
F00811	MG	25°C	0	4%	51%	0	12%
		15°C	-4%	-4%	47%	8%	15%
		5°C	40%	58%	59%	29%	34%
	PDA	25°C	0	30%	53%	0	22%
		15°C	-6%	26%	42%	-5%	21%
		5°C	30%	64%	65%	20%	29%
F00601	MG	25°C	0	54%	82%	0	49%
		15°C	25%	70%	82%	50%	80%
		5°C	74%	84%	86%	66%	80%
	PDA	25°C	0	42%	85%	0	85%
		15°C	17%	58%	85%	48%	86%
		5°C	68%	88%	86%	62%	86%

#### 4.2.2. Almáról izolált és törzsgyűjteményből származó *Metschnikowia pulcherrima* gátló hatásának összehasonlítása

Az almáról izolált *M. pulcherrima* törzs gátlási hatékonyságának vizsgálata során a különböző tényezők – *P. expansum* törzs, élesztő szuszpenzió sejt-sűrűsége, hőmérséklet, táptalaj – gátlást befolyásoló hatása ugyanúgy jelentkezett, mint a törzsgyűjteményből származó *M. pulcherrima*, *Sp. roseus* és *Pich. anomala* esetében. A kétféle *M. pulcherrima* törzs antagonista hatékonyságának összehasonlítását szemlélteti részben a 13. ábra.

A két *M. pulcherrima* törzs gátló hatása között jelentős különbség mutatkozott 25°C és 15°C-on. Az almáról izolált élesztőtörzs a legtöbb esetben nagyobb mértékű gátló hatást mutatott, mint a törzsgyűjteményből származó törzs. Kis koncentrációjú élesztő szuszpenziót alkalmazva a penésztelepek átmérői a kontroll telepekhez hasonlóan az idő függvényében – kisebb mértékben ugyan – lineárisan növekedtek, így a tárolás 10-12. napjáig volt jelentős gátlás tapasztalható (3. melléklet).  $10^5$  illetve  $10^7$  sejt/ml koncentrációjú élesztő szuszpenziót alkalmazva a tárolás egész időtartama során jelentős gátlást fejtett ki az almáról izolált élesztőtörzs. 5°C-on való tárolás

során a két *M. pulcherrima* törzs hatása nem vált el egymástól, de a kontrollhoz képest sem mutatkozott jelentős gátlás, mivel a kis hőmérséklet önmagában nagy mértékben gátolta a penésznövekedést.



13. ábra Almáról izolált és törzsgyűjteményi *M. pulcherrima* törzsek *P. expansum* penésztörzsekre kifejtett gátlási hatékonyságának összehasonlítása különböző tárolási hőmérsékleten, MG táptalajon,  $10^5$  sejt/ml koncentrációjú élesztő szuszpenziót alkalmazva.



#### 4.2.3. Kluyveromyces lactis és ismert antagonista élesztőtörzsek gátló hatásának összehasonlítása

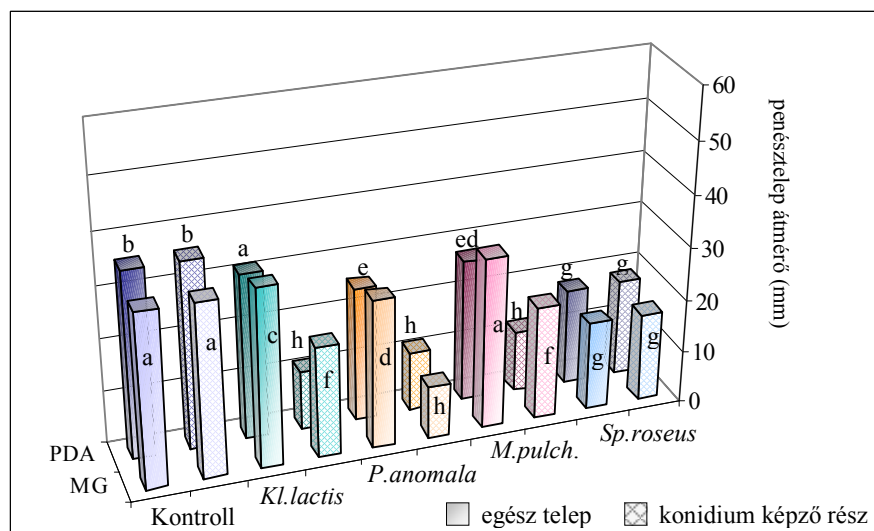
##### 4.2.3.1. Különböző Kluyveromyces lactis törzsek hatékonyságának összehasonlítása

*Kl. lactis* Y00260, Y0258 és Y01080 törzseinek hatékonyságát négytényezős varianciaanalízissel hasonlítottam össze. A varianciaanalízis eredményeit szemléltető táblázatok a 5. mellékletben találhatóak. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a három *Kl. lactis* törzs gátló hatása között 25°C-on nem volt, 15°C-on és 5°C-on volt statisztikailag szignifikáns differencia, azonban ez utóbbi sem mondható jelentősnek a gyakorlatban, ugyanis csupán 1-2 mm-nyi telep átmérő eltérést jelent.

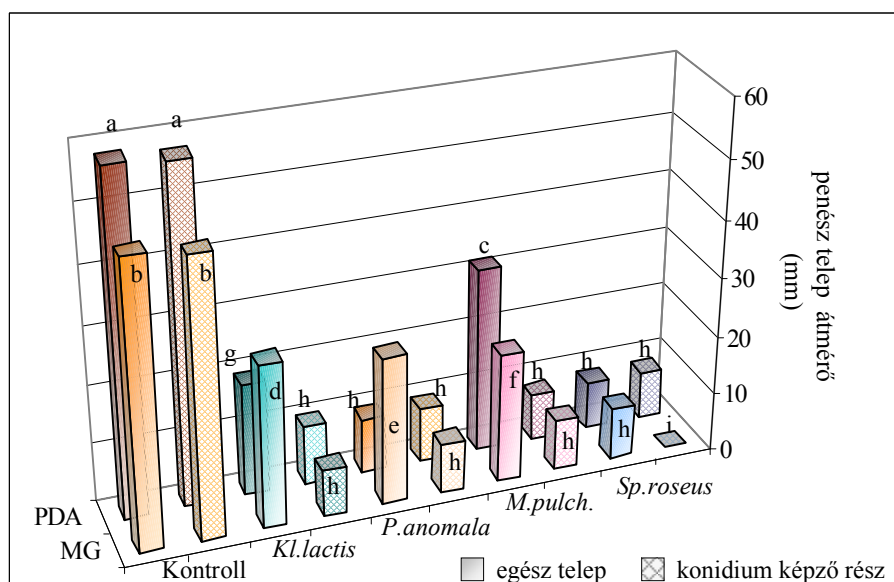
Ezek az eredmények nem igazolták az élesztőtörzs kiválasztásnál tapasztalt eltérő hatékonyságot, ezért a további összehasonlító vizsgálatok értékelését a három *Kl. lactis* törzs közül csak az Y00260 jelű törzsszel végeztem.

##### 4.2.3.2. Kluyveromyces lactis Y00260 hatékonyságának ismert antagonista törzsek gátló hatásával történő összevetése

*Kl. lactis* *P. expansum* törzsekre kifejtett gátlás elemzése során az ismert antagonista törzsek gátló hatásával kapcsolatban előforduló jelenségeket itt is tapasztaltam. A *Kl. lactis* Y00260 törzs gátló hatása nagymértékben eltérő volt a vizsgált penésztörzstől és tápközegtől függően (14. ábra és 15. ábra, 3. melléklet).



14. ábra *Kl. lactis* Y00260 és ismert antagonista élesztőtörzsek ( $10^5$  sejt/ml koncentrációban alkalmazva) gátló hatása *P. expansum* F00811 törzsre 25°C-on, MG és PDA tápközegen, a kísérlet 9. napján. Az azonos betűjelű kezelések között nincs szignifikáns differencia ( $P=0,05$ )



15. ábra *Kl. lactis* Y00260 és ismert antagonista élesztőtörzsek ( $10^5$  sejt/ml koncentrációban alkalmazva) gátló hatása *P. expansum* F00601 törzsrre 25°C-on MG és PDA tápközegen, a kísérlet 9. napján. Az azonos betűjelű kezelések között nincs szignifikáns differencia ( $P=0,05$ )

MG táptalajon szinte alig fejtett ki antagonista hatást az alkalmazott élesztőtörzs az F00811 jelű *P. expansum* törzs léghifát és szubsztrát hifát képző részére. Ellenben az F00601 penésztörzs egész telepeit MG tápközegen jelentősen gátolta a *Kl. lactis* törzs. PDA tápközegen mindkét penésztörzs esetén tapasztalható volt – az MG tápközeghez képest nagyobb mértékű – gátlás. A penésztelepek konidium képző területét mérve a *Kl. lactis* Y00260 törzs gátlás szempontjából nagy hasonlóságot mutatott az ismert antagonista törzsekkel (6. melléklet).

Hasonlóan a már elemzett antagonista törzsekhez a *Kl. lactis* Y00260 esetében is tapasztalható volt, hogy növekvő élesztő sűrűséget alkalmazva fokozatosan nőtt az élesztőtörzs gátló hatása, illetve, hogy a kisebb tárolási hőmérséklet és *Kl. lactis* vizsgált törzsének együttes alkalmazása nagyobb mértékű gátlást okozott, mint a két tényező külön-külön (3. melléklet).

Az itt leírt eredmények alapján megállapítható, hogy a *Kl. lactis* Y00260 törzs gátló hatása egyes esetekben kisebb mértékű, mint az ismert antagonista törzseké, ennek ellenére illeszkedik azok közé. Így – az in vitro kísérletek alapján – feltételesen alkalmassá válhat a biológiai védekezésre. Mivel ezt az élesztőfajt ilyen szempontból még nem vizsgálták, munkám további részében a *Kl. lactis* *P. expansum* törzssel szemben kifejtett gátlás hatásmechanizmusával foglalkozom.

### 4.3. A *Kluyveromyces lactis* *Penicillium expansum*-ra kifejtett gátlásának hatásmechanizmusa

#### 4.3.1. *Kluyveromyces lactis* által termelt anyagok hatása

##### 4.3.1.1. *Antibiotikus anyagok termelése*

*Kl. lactis* Y00260 törzs antibiotikus anyag termelését a koncentrált és nem koncentrált sejtmentes szűrlet hatásával ellenőriztem (agarlyuk diffúziós módszer). A nem koncentrált sejtmentes szűrlet hatása a penészek konidium képzésében mutatkozott meg. Az F00811 jelű *P. expansum* törzs esetében ez alig észrevehető, az F00601 törzs esetében jellegzetesebb: 2-3 mm-es zónában nem képződtek a *P. expansum*-ra jellemző zöld konidiumok (16. ábra). Itt is érzékelhető volt tehát a *P. expansum* két vizsgált törzse közötti különbség.



*Penicillium expansum* F00811

*Penicillium expansum* F00601

16. ábra *Kl. lactis* Y00260 sejtmentes szűrletének hatása *P. expansum*-ra 25°C-on

A koncentrált sejtmentes szűrlet alkalmazása során azonban egyik penésztörzs esetében sem volt gátlás vagy egyéb elváltozás tapasztalható. Ennek alapján a konidium fejlődésben okozott gátlás nem utal antibiózisra.

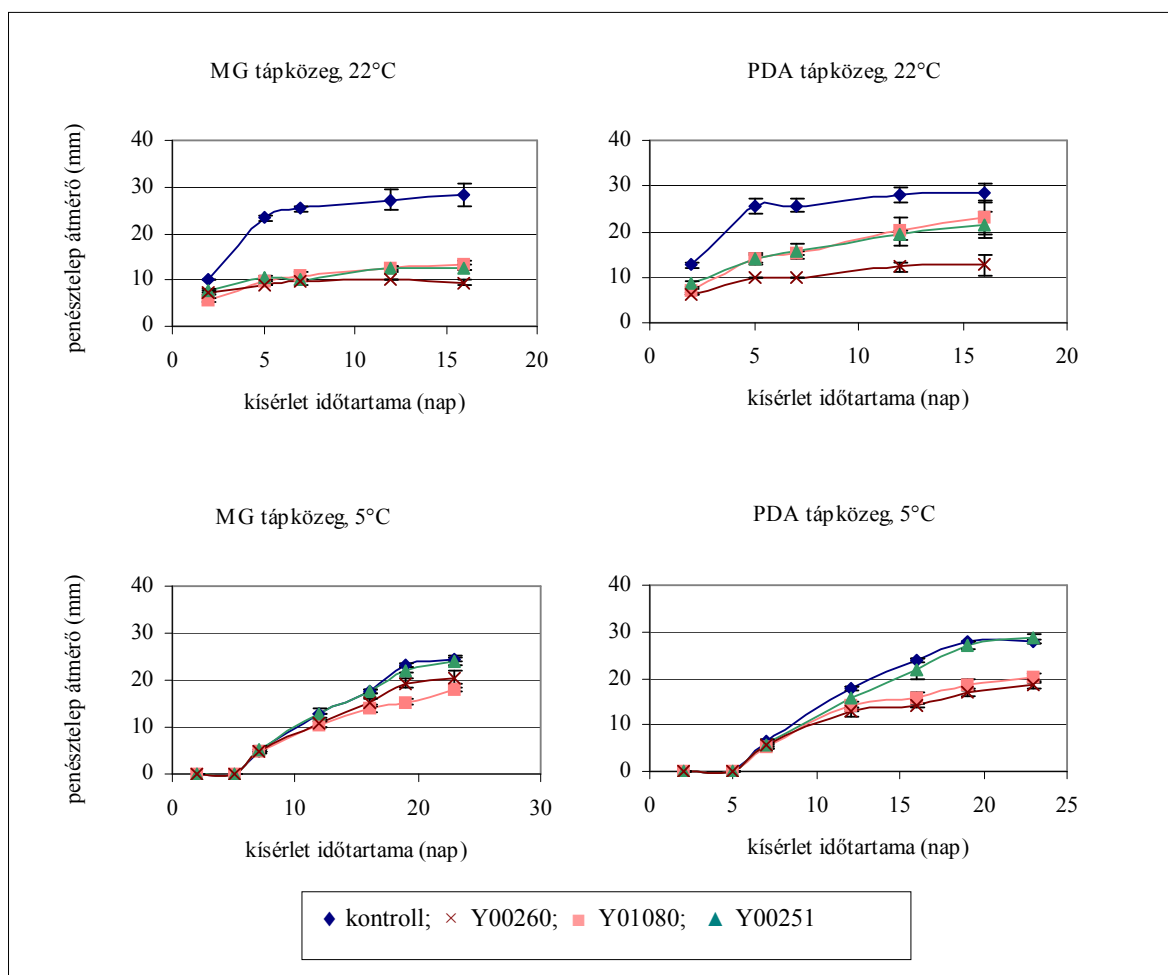
##### 4.3.1.2. *Killertoxin képzés*

A szakirodalmi áttekintésben említettek szerint: POLONELLI és munkatársai (1990) illetve WALKER és munkatársai (1995) számoltak be munkájukban arról, hogy élesztők által termelt killertoxinok nemcsak más élesztőgombák, hanem egyes penészgombák fejlődését is képesek gátolni. Ezen felül, *Kl. lactis*-ről kimutatták a killertoxin termelő tulajdonságot (STARK és BOYD, 1986).

A fent leírt két okból kifolyólag vizsgáltam az Y00260 jelű *Kl. lactis* törzs killertoxin termelését. Korábbi feltételezéseimmel szemben azonban a tápközegek pH-jától függetlenül nem tapasztaltam killertoxin képződést.

#### 4.3.1.3. Illékony és gáznemű komponensek hatása

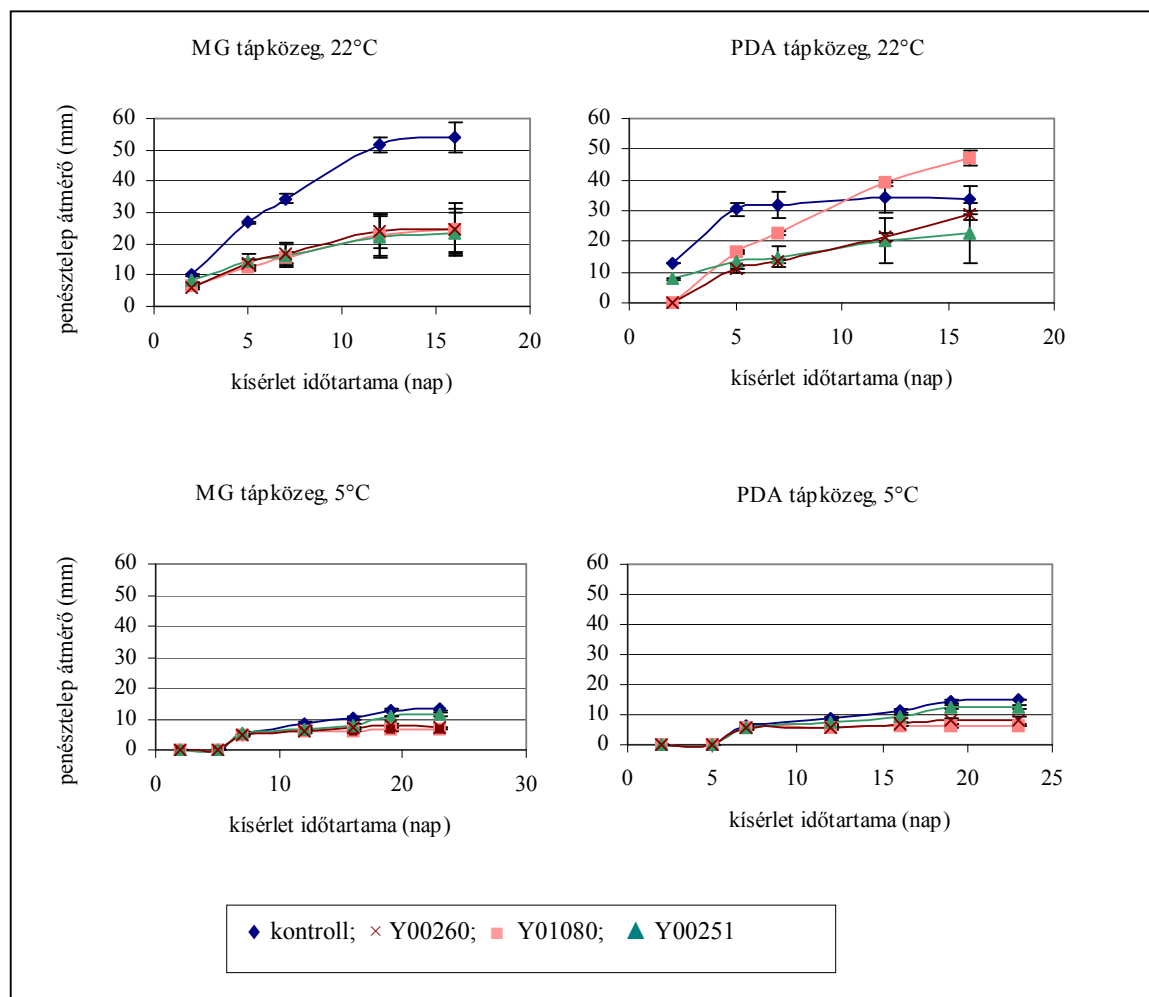
A *Kl. lactis* törzsek által termelt illékony illetve gáznemű komponensek *P. expansum*-ra kifejtett hatása – melyet egymással szembe fordított Petri csészék segítségével vizsgáltam – a gátlási hatékonysághoz hasonlóan nagymértékben függött a vizsgált penésztörzstől, az alkalmazott tápközegtől valamint a tárolási hőmérséklettől (17. ábra és 18. ábra).



17. ábra *Kl. lactis* törzsek által termelt illékony illetve gáznemű komponensek gátló hatása *P. expansum* F00811 törzsre MG és PDA tápközegen, 22°C és 5°C-on.

A *P. expansum* F00811 penésztörzs gátlása MG és PDA tápközegen – különböző mértékben – kimutatható volt 22°C-on. MG táptalajon a *Kl. lactis* Y00251, Y01080 vagy Y00260 törzs jelenlétében a penésztelep átmérője a kontroll telep átmérőjének 30%-a volt. Ugyanez az

eredmény PDA tápközegen csak Y00260 jelű élesztőtörzs jelenlétében volt megfigyelhető, az Y00251 és Y01080 jelű törzsek által termelt gáznemű komponensek hatása kisebb mértékű volt. 5°C-on a penésznövekedés – mind a kontroll telepé, mind az élesztőtörzs jelenlétében növekvő telepé – lassabb volt, mint 22°C-on. A kis tárolási hőmérsékleten MG tápközegen az élesztőtörzsek nem fejtettek ki jelentős gátlást, ezzel szemben PDA tápközegen a *Kl. lactis* Y00260 és Y01080 törzsek jelenlétében nőtt penésztelepek átmérői és a kontroll telepek átmérői között szignifikáns különbség volt kimutatható.

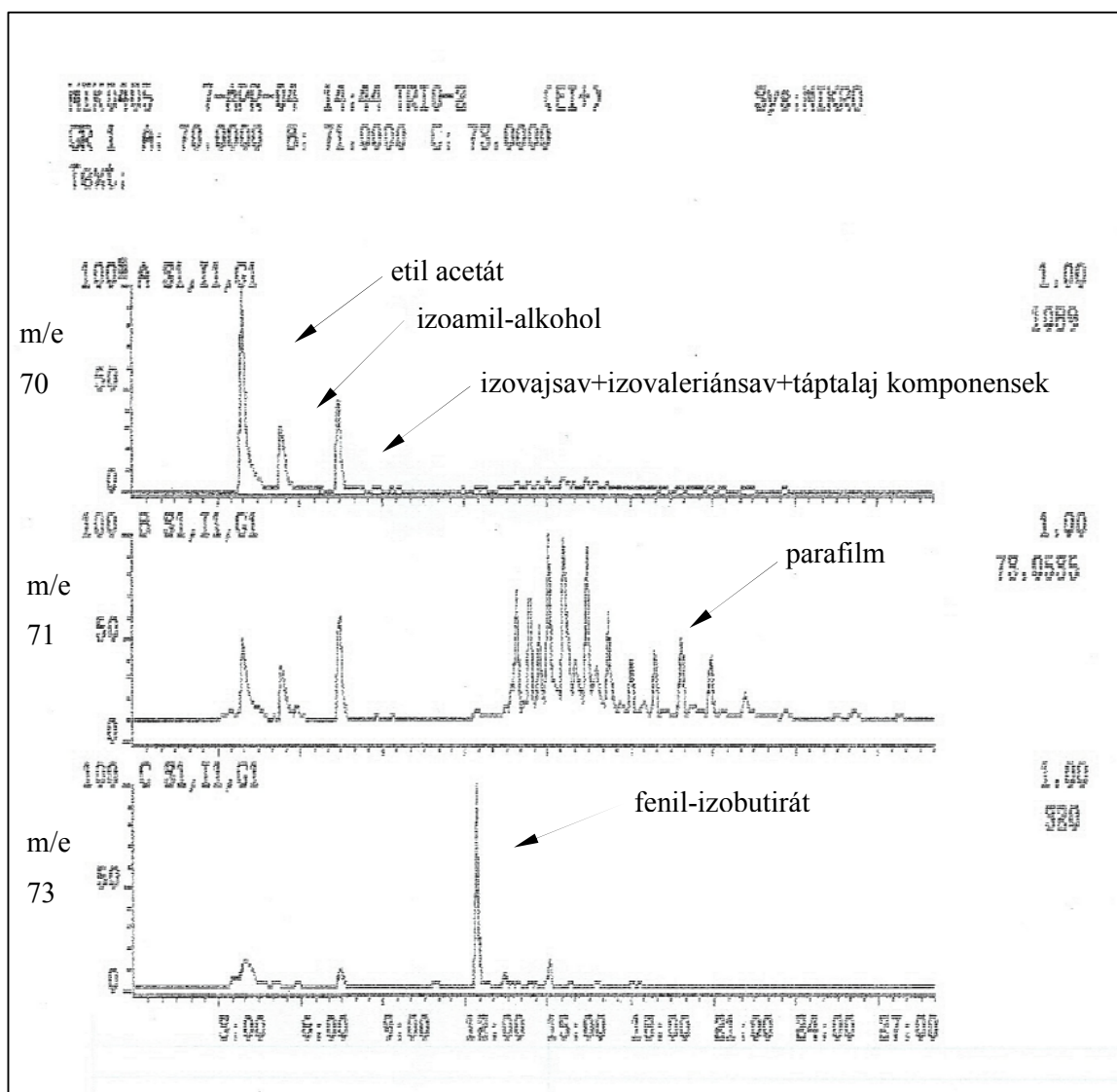


18. ábra *Kl. lactis* törzsek által termelt illékony illetve gáznemű komponensek gátló hatása *P. expansum* F00601 törzsre MG és PDA tápközegen, 22°C és 5°C-on.

A *P. expansum* F00601 törzs esetében MG tápközegen, 22°C és 5°C-on a penész gátlás jellege megegyezett az F00811 jelű törzsnél tapasztaltakkal. PDA tápközegen, 22°C-on a gátlás mértéke csökkent a tárolás végén az Y00260 élesztőtörzs jelenlétében. Az Y01080 *Kl. lactis* törzs jelenlétében a penésztelep átmérője a tárolás 10. napjától meghaladta a kontroll penésztelep

átmérőjét. A vizsgálatot megismételve azonban nem jelentkezett ez a jelenség. 5°C-on a kontroll *P. expansum* F00601 törzs telepeinek átmérői és az élesztőtörzsek jelenlétében fejlődő telepek átmérői között kisebb mértékű gátlás volt megfigyelhető, mint az F00811 penésztörzs esetében.

A *Kluyveromyces lactis* Y00260 által termelt illékony vegyületek meghatározása során öt főkomponenst sikerült azonosítani GC/MS módszerrel.

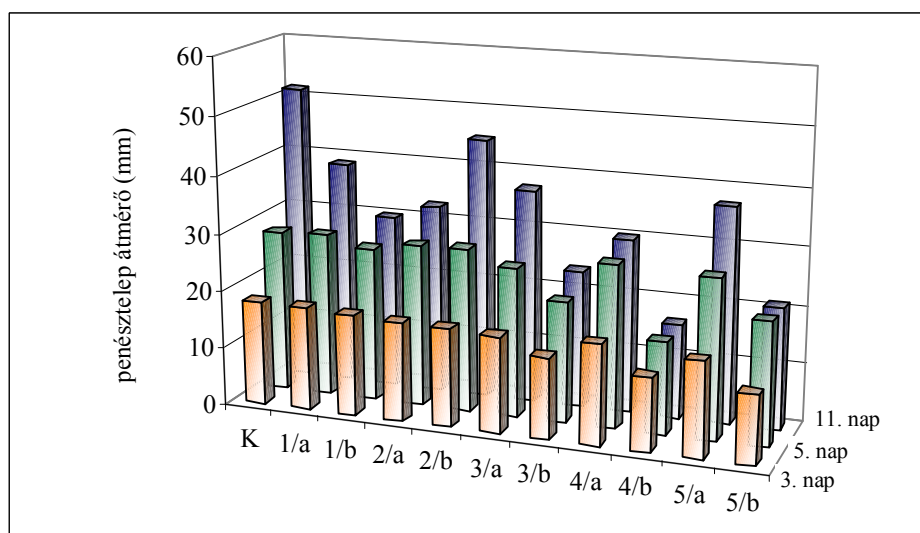


19. ábra *Kl. lactis* Y00260 által termelt illékony komponensek

A 70-es tömegszámánál a legnagyobb intenzitású csúcsok etilacetát, izoamilalkohol, valamint izovajsav, izovaleriánsav és a táptalajból származó komponensek egyéből származnak. A 73-as tömegszámánál mért csúcsot fenilizobutirátként lehetett azonosítani. A 71-es tömegszám esetén a

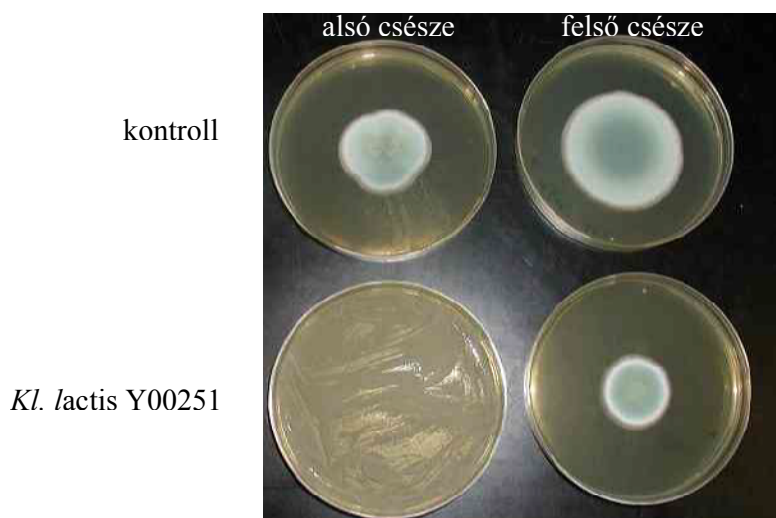
12. és 21. perc között sűrűn megjelenő csúcsok a Petri csészéket körülzáró parafilmről származnak (19. ábra).

Az egyes főkomponensekkel külön-külön elvégzett vizsgálatok során elsősorban az inkubáció 11. napján voltak jelentős különbségek a kontroll és az illékony komponensekkel kezelt minták között. (20. ábra). Ekkor mind az 1%-os, mind a 10%-os oldatok jelenlétében növekvő penésztelepek átmérői jelentős mértékben kisebbek voltak, mint a kontroll. A leghatékonyabb gátlást az izovaleriánsav fejtette ki. Az inkubáció 5. napján csak az izovajsav és izovaleriánsav 10%-os oldata esetén volt erősebb gátlás tapasztalható. A kontroll és az egyes illékony komponensek jelenlétében leoltott telepek növekedése időben hasonló dinamikát mutatott, mint a *Kluyveromyces lactis* törzsek jelenlétében (18. ábra), a gátlás mértéke azonban kisebb volt.



20. ábra Egyes illékony komponensek hatása *Penicillium expansum* F00601 törzsrre 25°C-on (K-kontroll, 1- izoamilalkohol, 2- etilacetát, 3- izovajsav, 4- izovaleriánsav, 5- fenilizobutirát; a- 1%, b-10%)

Az illékony és/vagy gáznemű komponens hatásának vizsgálata közben az alábbi jelenség is megfigyelhető volt: a kontroll csészékben, ahogy a felső csészében kifejlődtek a penésztelepeken a konidiumok, az alsó csésze táptalajára hullottak, ahol, ezáltal, szintén penésztelep képződött. Azokban a csészékben, ahol az alsó csésze élesztő szuszpenzióval volt beoltva, nem képződtek penésztelepek (21. ábra). Ezzel a jelenséggel így azt is lehet modellezni, hogy a tárolás során a gyümölcsöket bevonó védő élesztő réteg védelmet nyújthat a levegőből a termény felületére kerülő penész spóra/konidium okozta romlással szemben.



21. ábra *Kl. lactis* Y00251 törzs által termelt illékony és/vagy gáznemű komponens által *P. expansum*-ra kifejtett gátló hatás

A két egymással szembe fordított Petri csésze közötti légtér gázösszetételének változását jelentős mértékben befolyásolta a *Kl. lactis* Y00260 törzs (22. táblázat). A légtér CO<sub>2</sub> tartalma 0,1%-ról 8-10%-ra emelkedett, az O<sub>2</sub> koncentráció pedig 20,5%-ról 13-14%-ra csökkent.

22. táblázat *Kl. lactis* Y00260 anyagcsere folyamatai által okozott gázösszetétel változás két egymással szembe fordított Petri csésze által közrezárt légtérben.

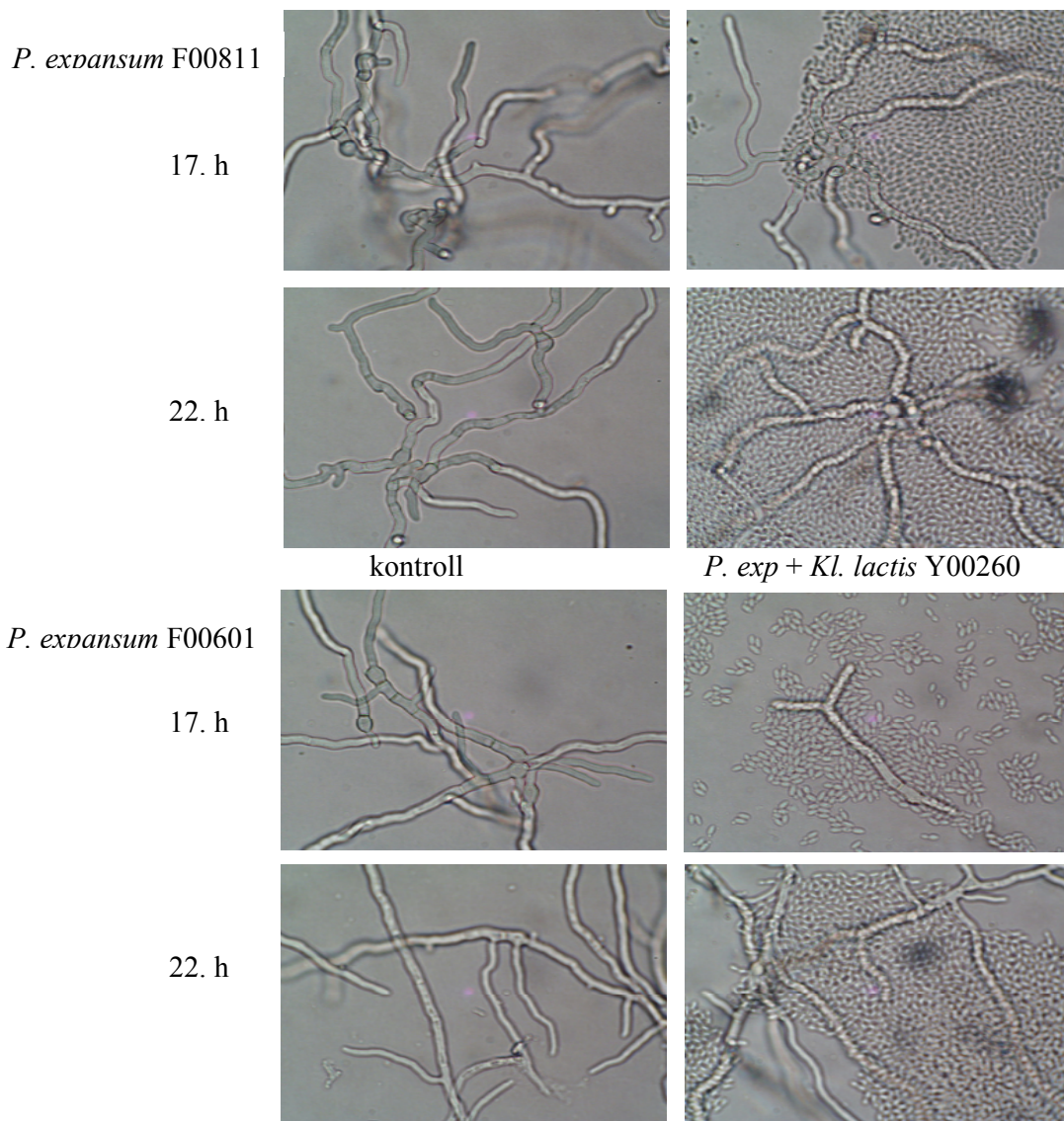
Tenyésztési idő	Kontroll csészék (az alsó csésze nincs mikroorganizmussal beoltva)		<i>Kl. lactis</i> Y00260 törzssel beoltott csészék	
	O <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)	O <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)
<b>2. nap</b>	20,3 ± 0,3	0	14,0 ± 0,5	10,0 ± 0,6
<b>5. nap</b>	20,5 ± 0,06	0,1	14,6 ± 0,9	7,9 ± 0,9

A légtér megemelkedett CO<sub>2</sub> tartalma hozzájárulhat a penésznövekedés gátláshoz, bár a későbbiekben ismertetésre kerülő eredmények azt mutatják, hogy 10% CO<sub>2</sub> koncentrációjú módosított légtérű tárolás nem eredményezi a *P. expansum* hasonló mértékű gátlását. Ezzel összhangban vannak YACKEL és munkatársai (1971) által elért eredmények, melyek szerint 10,5% CO<sub>2</sub> és 2,0% O<sub>2</sub> tartalmú szabályozott légtérű tárolásnak a normál légtérben történő tároláshoz viszonyítva nem volt hatása *P. expansum* megjelenésére és előfordulására.



#### 4.3.2. Élesztősejtek jelenlétének közvetlen hatása a konidium csírázásra

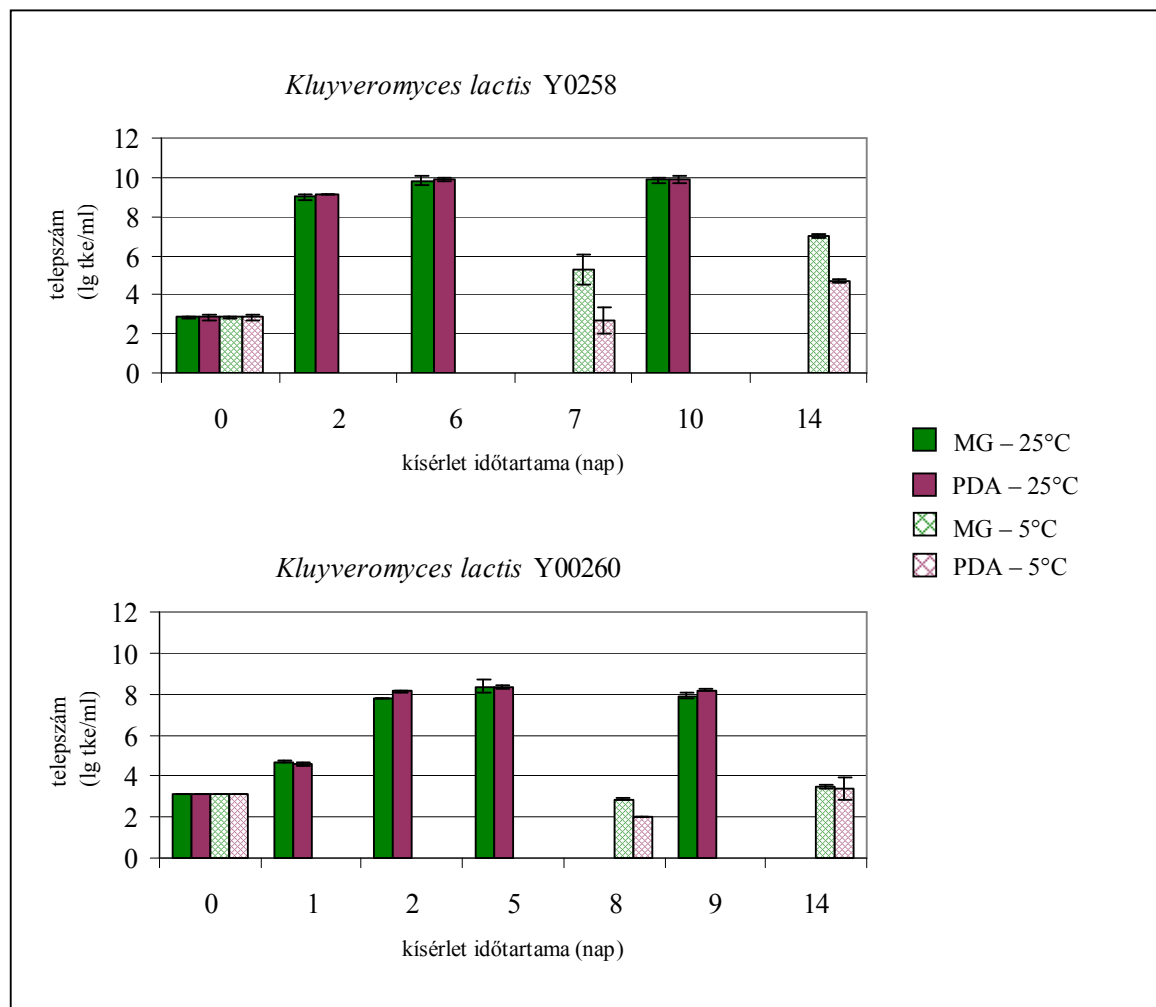
A mikroszkópos vizsgálat során a *Kl. lactis* sejtek összetömörödve alkottak telepeket, melynek jelenléte az F00811-es penésztörzs konidiumainak csírázását és hifanövekedését nem befolyásolta. Az F00601-es *P. expansum* esetében az inkubáció 17. órájában még enyhe gátlás mutatkozott, ez azonban az inkubáció 22. órájában nem volt észlelhető (22. ábra). A *Kl. lactis* sejtek nem tapadtak oly módon a hifához, ami a szakirodalom szerint a közvetlen kölcsönhatás esetén jellemző (CASTORIA et al., 1997).



22. ábra *Kl. lactis* Y00260 sejtjeinek közvetlen hatása *P. expansum* F00811 és F00601 törzs konidium csírázására (25°C, MG tápközeg)

### 4.3.3. Tápközeg összetétel befolyása *Kluyveromyces lactis* szaporodására

A különböző élesztőtörzsek gátló hatékonyságának vizsgálatokor több esetben erősebb gátlás volt megfigyelhető PDA tápközegen. Ezért vizsgáltam a *Kl. lactis* két törzsének szaporodását a két különböző táptalajon. A vizsgálat eredményét a 23. ábra szemlélteti.

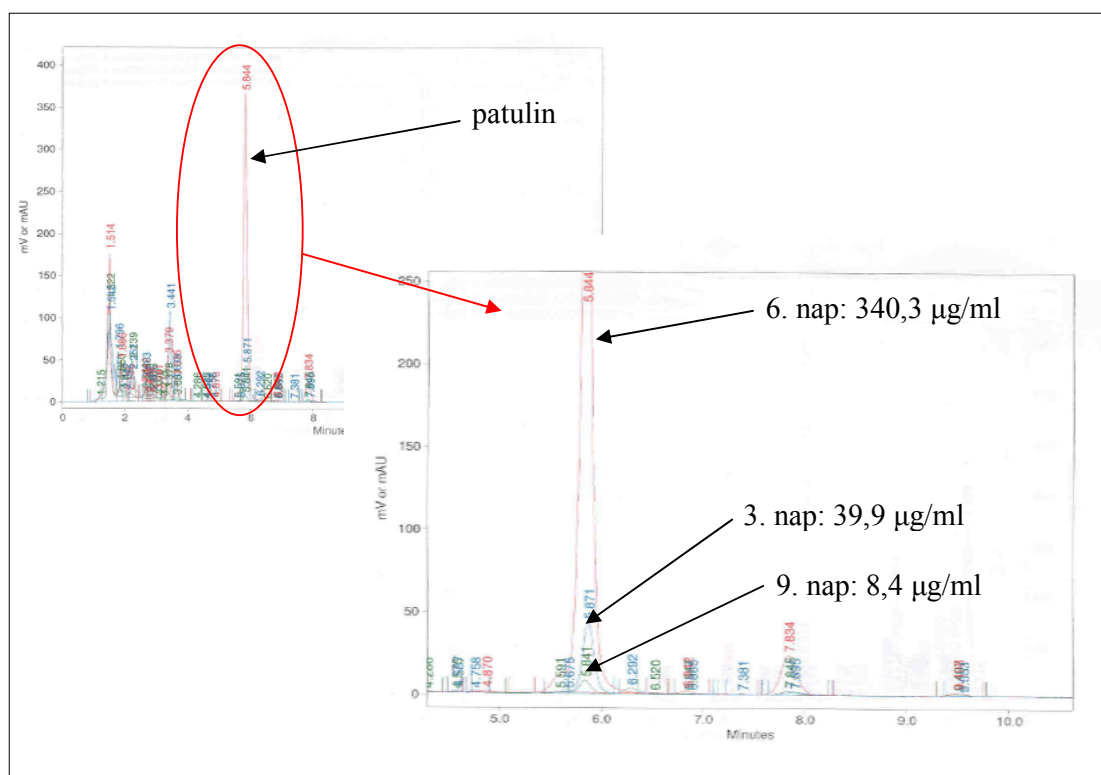


23. ábra *Kl. lactis* törzsek szaporodása két táptalajon és két hőmérsékleten

A diagramokról leolvasható, hogy 25°C-on nincs szignifikáns különbség a két tápközeg élesztő szaporodást befolyásoló hatása között. 5°C-on azonban MG tápközegen az Y0258 élesztőtörzs esetében egy-két nagyságrenddel több telep képződött, mint PDA tápközegen. Az Y00260 törzs esetében ez a különbség csak a kísérlet 8. napján volt mérhető. Továbbá megfigyelhető, hogy az Y0258 törzs mindkét tenyésztési hőmérsékleten jobban szaporodott, mint az Y00260 törzs. A kísérlet során, a különböző tápközégek, illetve élesztőtörzsek között kimutatott különbség nem jelentkezett a gátlás hatékonyságában (5. melléklet).

#### 4.4. Az élesztőgombák hatása *Penicillium expansum* törzsek patulin termelésére

A két vizsgált *P. expansum* törzs patulin termelése alapvetően különbözött: az F00601-es törzs nem termelt, az F00811 nagy mennyiségű patulint termelt az adott körülmények között. Az F00811-es törzs által termelt patulin mennyiségének változását a 24. ábra szemlélteti. A tenyésztés első hat napjában intenzív mikotoxin termelés figyelhető meg, azonban a 9. napon a mért patulin mennyisége kevesebb, mint a korábbi időpontokban. Hasonló tapasztalatokról számol be HASAN (2000), aki 20°C-on, 10 napig tartó tenyésztést követően mért kisebb mikotoxin mennyiségeket. HASAN feltételezése szerint a patulin mennyiség csökkenése azzal magyarázható, hogy maga a penész kezdi lebontani a mikotoxint.

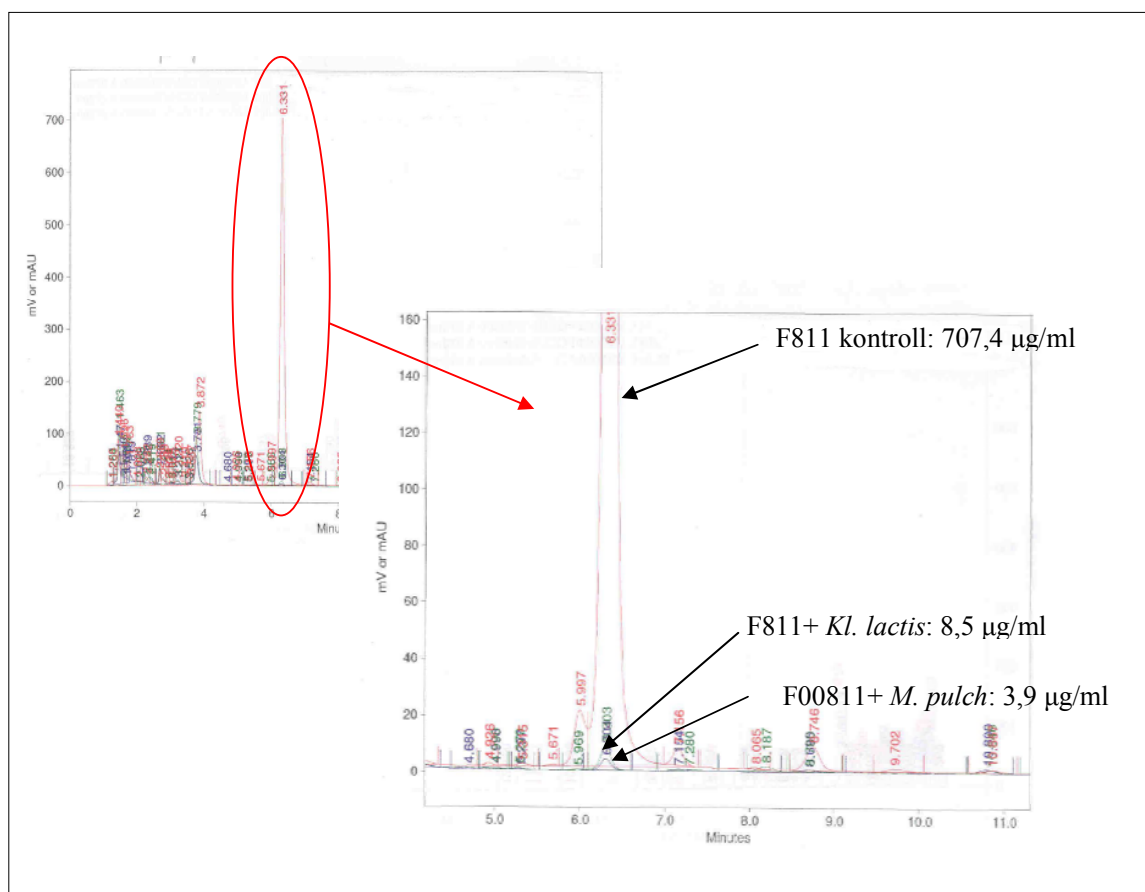


24. ábra *Penicillium expansum* F00811 által termelt patulin

Jelentős mértékben kisebb mennyiségű patulin volt kimutatható a kontrollhoz képest azokból a mintákból, melyekben élesztőgomba (*Kl. lactis*, illetve *M. pulcherrima*) hatását vizsgáltam *P. expansum* patulin termelésére (25. ábra). Ez következhet egyrészt abból, hogy a vizsgált élesztőgomba törzsek gátolták a penésznövekedést és, ezáltal, a patulin termelést is. MOODLEY és munkatársai (2002) figyelték meg, hogy *P. expansum*-mal mesterséges módon beoltott almákon kisebb átmérőjű romlási foltok jelentek meg, és ennek következtében kisebb

mennyiségű patulin volt mérhető módosított atmoszférás csomagolás alkalmazása esetén. Ezek alapján feltételezhető, hogy nem minden penészt gátló tényező jelentkezik olyan stresszhatásként, amely a mikotoxin termelést fokozná.

Az élesztőgombák jelenlétében kisebb mennyiségben mérhető patulin magyarázata lehet továbbá, hogy a *Kl. lactis* illetve *M. pulcherrima* képesek lebontani a termelődött mikotoxint, hasonlóan a *Saccharomyces cerevisiae*-hez, mely jelenlétében almalé fermentáció során csökken a patulin mennyisége (STINSON et al.; 1978; SUMBU et al., 1983).



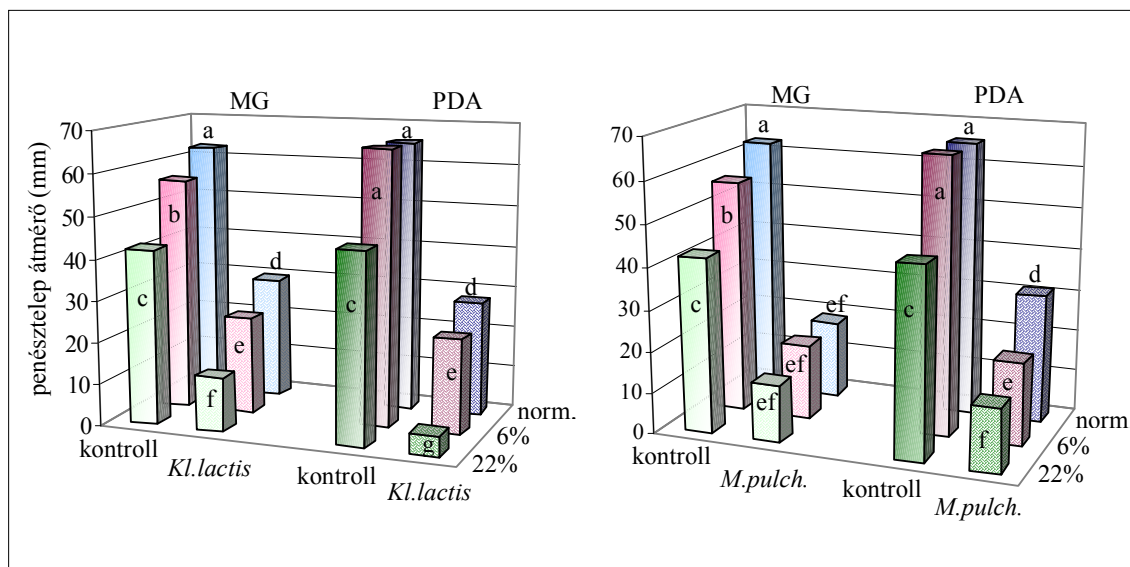
25. ábra Élesztőgombával együtt tenyésztett *Penicillium expansum* F00811 patulin termelése a tenyésztés 6. napján

#### 4.5. Kombinált kezelések alkalmazása

##### 4.5.1. Módosított atmoszférás tárolás és antagonista élesztő együttes hatása a *P. expansum*-ra

A normál légtér összetételéhez képest nagyobb CO<sub>2</sub> és kisebb O<sub>2</sub> tartalom penésznövekedést gátló hatása a kontroll mintáknál is megfigyelhető volt (26. ábra). A 6%-os CO<sub>2</sub> tartalmú légösszetételben kisebb mértékű gátlás volt tapasztalható, egyes esetekben nem is volt szignifikáns különbség a normál légösszetételben növekvő kontroll telepek átmérőjéhez képest. A

22% CO<sub>2</sub> tartalmú módosított atmoszféra alkalmazásakor a penésztelepek átmérői jelentős mértékben kisebbek voltak a normál légösszetételben mért értékekhez képest.



26. ábra Különböző kiindulási CO<sub>2</sub> tartalmú légösszetétel és antagonista élesztő jelenlétének együttes hatása *P. expansum* F00601 növekedésére (a penésztelep lég- és szubsztrát hifa képző részét mérve), a kísérlet 12. napján. Az azonos betűjelű kezelések között nincs szignifikáns differencia (P=0,05)

Amellett, hogy a *Kl. lactis* Y00260 törzs jelentős mértékben gátolta a penész növekedését, megfigyelhető az is, hogy az egyre nagyobb kiindulási CO<sub>2</sub> tartalmú légtérben egyre kisebbek voltak a penésztelep átmérők. A 22% CO<sub>2</sub> tartalmú légösszetétel erőteljesebb gátló hatása itt is megmutatkozott.

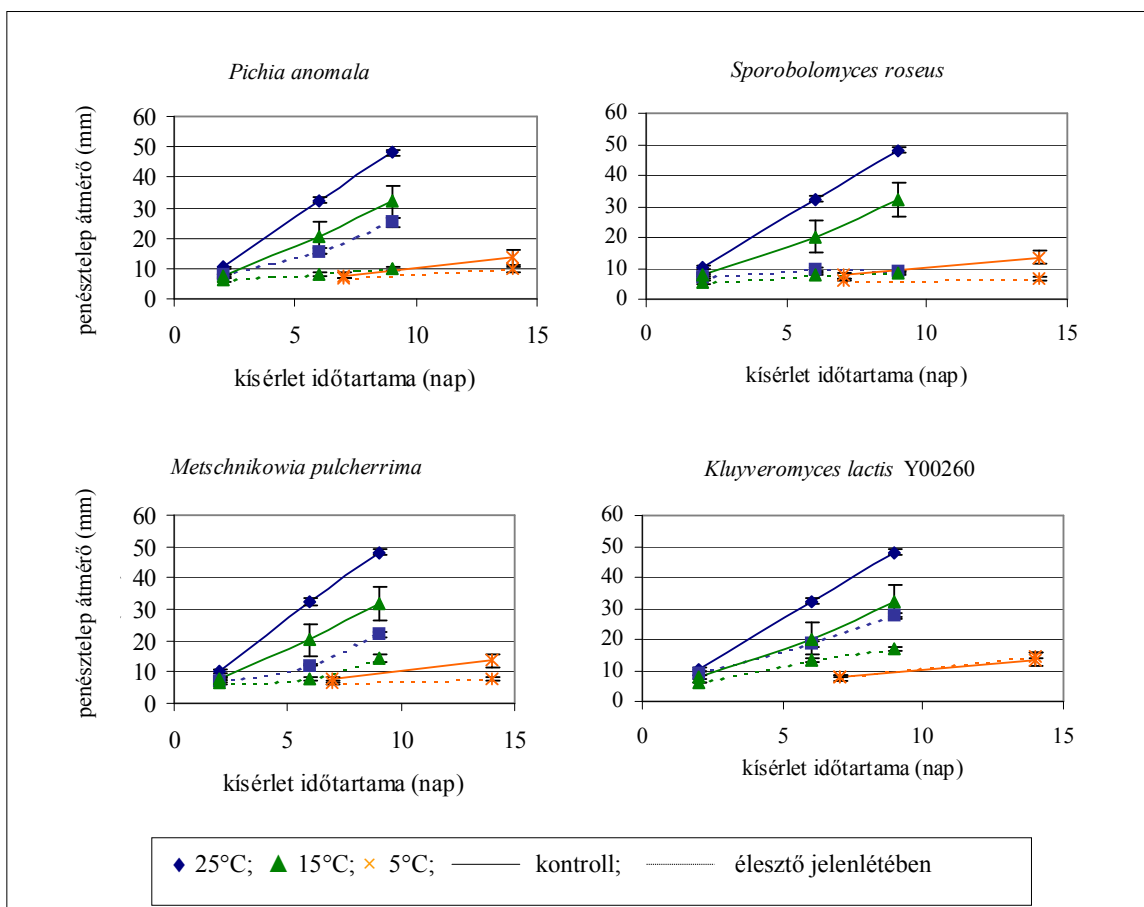
*M. pulcherrima* Y00681 törzset alkalmazva antagonistaként az élesztő gátló hatása mellett nem volt tapasztalható a légtér nagyobb széndioxid tartalmának gátló hatása, kivéve PDA tápközegen a tárolás 12 napján.

#### 4.5.2. A kis tárolási hőmérséklet és az antagonista élesztő együttes hatása

A különböző élesztőtörzsek – *Pich. anomala*, *M. pulcherrima*, *Sp. roseus* és *Kl. lactis* – gátló hatékonyságának vizsgálatakor a hőmérséklet befolyásoló hatását elemezve additív hatást figyeltem meg a kisebb tárolási hőmérséklet és az antagonista élesztőtörzs együttes alkalmazása esetén (3. melléklet, 27. ábra).

Az additív hatás 5°C-on való tárolás esetén nem minden vizsgált antagonista élesztőnél mutatkozott jelentős mértékben: a kis tárolási hőmérséklet önmagában olyan mértékben gátolta a

penésznövekedést, hogy emellett nem volt az élesztő gátló hatása szignifikánsan érzékelhető. Ezzel szemben a *Sp. roseus* törzs esetében az élesztő 25°C és 15°C-on olyan nagy mértékű gátlást fejtett ki *P. expansum* F00601 törzsre mindkét tápközegen, hogy a tárolási hőmérséklet különbség hatása nem volt érzékelhető. Az 5°C-on való tárolás és a törzs együttes alkalmazásakor viszont mutatkozott a két tényező additív hatása.



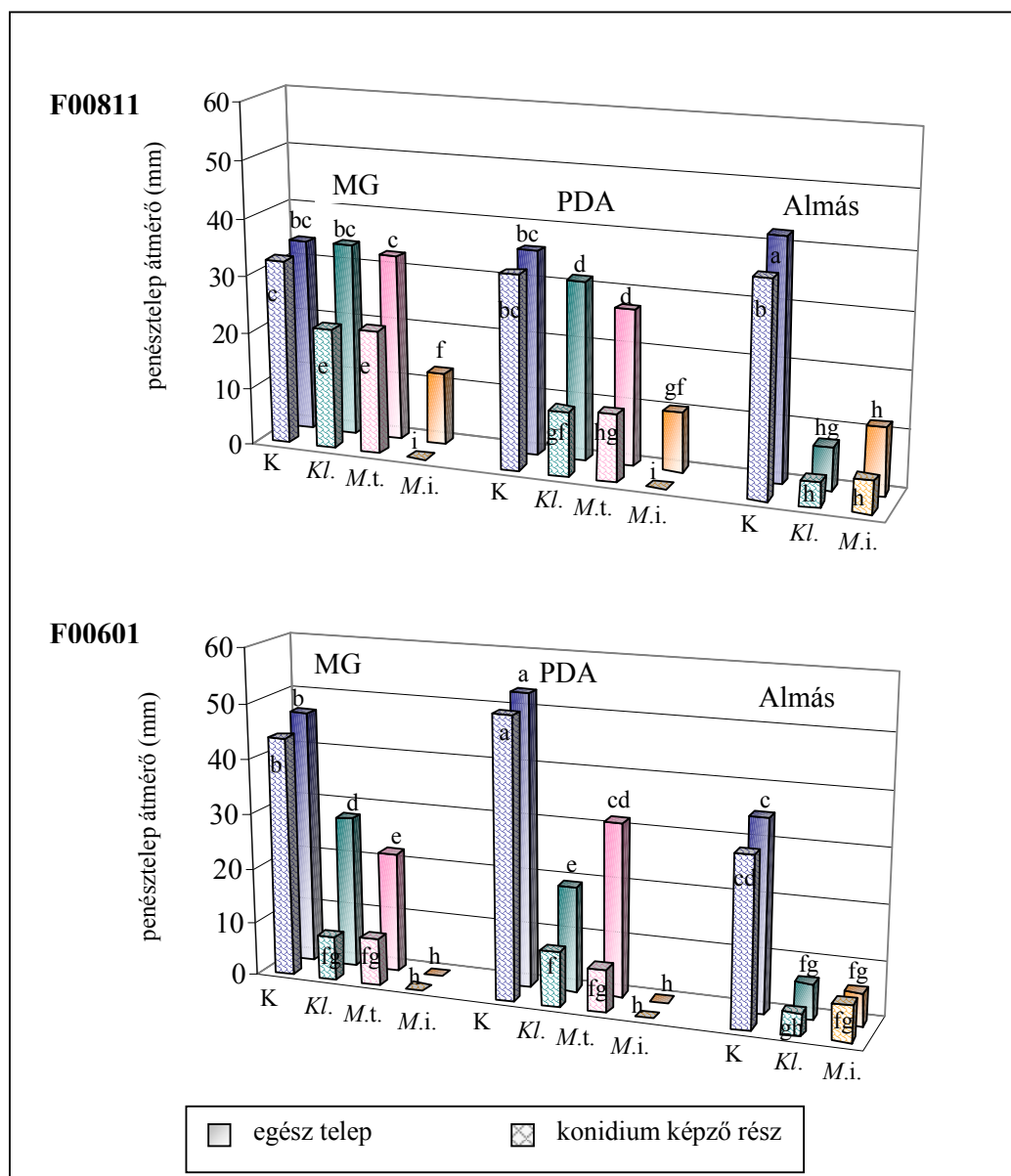
27. ábra Tárolási hőmérséklet és antagonista élesztő ( $10^5$  sejt/ml) kombinált alkalmazásának hatása *P. expansum* F00601 törzsre, MG táptalajon

#### 4.6. In vivo kísérletek értékelése

##### 4.6.1. *Kluyveromyces lactis* és almáról izolált *Metschnikowia pulcherrima* gátló hatékonysága gyümölcsöt modellező tápközegen

A két vizsgált élesztőtörzs *P. expansum* törzsekre almás táptalajon kifejtett gátló hatékonyságát MG és PDA táptalajon tapasztalt eredményekhez viszonyítottam.

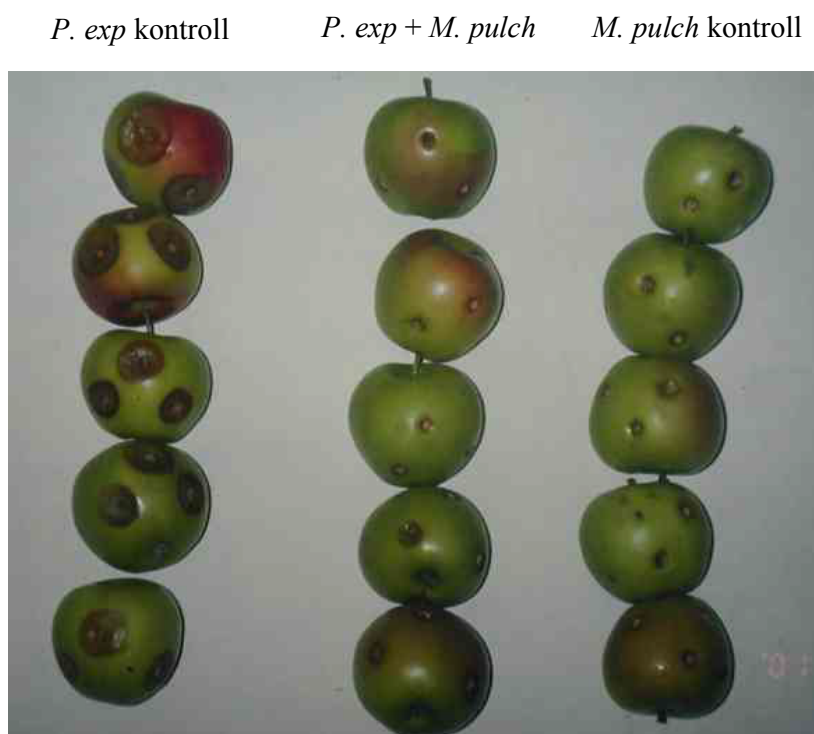
*Kl. lactis* Y00260 alkalmazása során a különböző tényezők – tárolási hőmérséklet, élesztő szuszpenzió sejtsűrűsége, penésztörzs – szinte minden kombinációja esetén MG és PDA tápközeghez képest almás tápközegen nagyobb mértékű gátlás volt megfigyelhető (28. ábra). Almáról izolált *M. pulcherrima* esetén a három táptalaj között a gátlás szempontjából nem tapasztaltam ilyen jellegű eltérést, viszont ez az élesztőtörzs nagyobb mértékű gátlást fejtett ki, mint a *Kl. lactis* Y00260.



28. ábra *Kl. lactis* Y00260 és *M. pulcherrima* törzsek *P. expansum*ra kifejtett gátló hatása három különböző táptalajon, 25°C-on, a kísérlet 9. napján. (K – kontroll; Kl. – *Kl. lactis* Y00260; M.t. – törzsgyűjteményi *M. pulcherrima*; M.i. – almáról izolált *M. pulcherrima*) Az azonos betűjelű kezelések között nincs szignifikáns differencia (P=0,05)

#### 4.6.2. *Kluyveromyces lactis* gátló hatékonysága almán

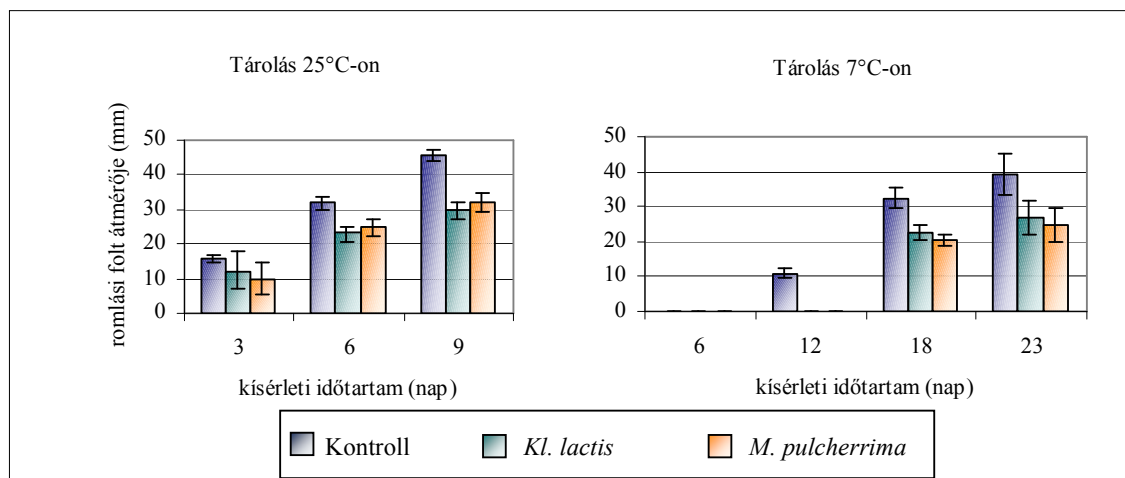
A nyári almán végzett kísérletek során ismét megmutatkozott a két vizsgált *P. expansum* törzs közötti különbség: az F00601-es törzssel való beoltás nem okozott semmiféle elváltozást a mesterségesen készített sebekben, ezzel szemben az F00811-es törzssel történő beoltás hatására 25°C-on néhány napon belül jelentkeztek az irodalomban is jellegzetes kórképként leírt barnulás. A későbbiekben ezért az ilyen jellegű vizsgálatokhoz csak az F00811-es törzset alkalmaztam. Az alma fajtája, érettségi foka, és az ezzel szoros összefüggésben álló összetevők aránya befolyásolta a gátlást. A törzsgyűjteményi *M. pulcherrima* 25°C-on a tárolás 3. napján még jelentős gátlást eredményezett, de az inkubálás 15. napján már nem volt jelentős különbség az egyes minták között. 7°C-on való tárolás során a tárolás 15. napján egyértelmű gátlás volt tapasztalható az élesztővel és penésszel beoltott minták és a kontroll – penésszel beoltott – minták között (29. ábra). Az élesztővel kezelt sebek nem mutattak elváltozást. Ugyancsak nyári almán végzett kísérletek során *Kl. lactis* Y00260 esetén nem tapasztaltam szignifikáns mértékű gátlást.



29. ábra: *P. expansum* F00811 törzs okozta romlás gátlása *M. pulcherrima* Y00681-es törzsszel, tárolás 7°C-on



A hűtőtárolóból származó almákkal történő vizsgálatok során az almáról izolált *M. pulcherrima*, valamint *Kl. lactis* Y00260 szignifikáns gátló hatást fejtett ki *P. expansum*-mal szemben. A két élesztőtörzs hatása között azonban nem volt jelentős eltérés (30. ábra). A gátlás mértékét azonban nehéz összevetni a szakirodalomban leírt eredményekkel, mivel minden esetben más és más vizsgálati paraméterek (antagonista- , illetve penész konidium koncentráció; almafajta; beoltás módja) szerepelnek.



30. ábra *Kl. lactis* Y00260 és almáról izolált *M. pulcherrima* *P. expansum* F00811 törzsszel szemben kifejtett gátló hatása almán

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A gyümölcsök és zöldségek tárolása során fellépő – főként penészes romlásból eredeztethető – veszteségek mértéke 10-40%-ig terjedhet (WORLD RESOURCES, 1998). A termények penészesedését fungicidek alkalmazásával gátolják, illetve előzik meg. A vegyszerek kiváltása, mennyiségük csökkentése érdekében egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a biológiai védekezésre (WILSON és WISNIEWSKI, 1989). A biológiai védekezéssel kapcsolatos kutatásoknak állandó része az újabb és újabb antagonista mikroorganizmusok kiválasztása. A szakirodalomban leírt (2.6.1 fejezetben összefoglalt) izolálási és screenelési módok általában egy adott terményhez és annak mikrobiotájához kötődnek. Emellett azonban előzetes információt is adnak az antagonista szervezet hatékonyságáról. Az általam alkalmazott screenelési eljárás előnye, hogy egyszerű, gyorsan kivitelezhető *in vitro* módszer: az élesztőgomba vonaltenyésztete körül kialakuló gátlási zóna alapján sikeresen választottam ki penészt gátló élesztőgomba törzset és izolátumot. A gátlási zóna utalhat a gátlás hatásmechanizmusára: antibiotikus anyag képzésére, vagy az élesztőgomba gyors metabolizmusa és szaporodása következtében kialakuló tápanyag elszegényedésére a tenyésztet környezetében (LIMA et al., 1997). A különböző élesztőgombák gátlási hatékonyságának vizsgálati eredményeit figyelembe véve ez a screenelési módszer nem szolgáltat egyértelmű információt az antagonista szervezet hatékonyságára nézve. Almáról izolált és törzsgyűjteményből származó *Metschnikowia pulcherrima* összehasonlítása esetén a screenelési eljárás összhangban volt a hatékonyság vizsgálattal: az almáról izolált törzs, melynek vonaltenyésztete körül gátlási zóna volt, jóval erősebb gátló hatást fejtett ki a hatékonyság vizsgálata során, mint a törzsgyűjteményből származó törzs, melynek tenyésztetét a penész benőtte (19. táblázat, 2/a melléklet). Ezzel szemben azon *Kluyveromyces lactis* törzsek között, melyek a screenelés során eltérő hatást mutattak, nem volt szignifikáns különbség a hatékonyság tekintetében (19. táblázat, 2/a melléklet, 5. melléklet).

Az élesztőtörzsek antagonista hatékonyságának BJÖRNBERG és SCHNÜRER (1993) módszerével történő vizsgálata során megfigyelhető volt a különböző vizsgálati tényezők, körülmények – penésztörzs, antagonista élesztő szuszpenzió koncentráció, táptalaj, tárolási hőmérséklet – befolyása. A két *Penicillium expansum* törzs élesztőgombával szembeni érzékenysége jelentős mértékben különbözött (10. ábra), ezért érdemesnek tartanám a két penésztörzs közötti különbség genetikai hátterének kutatását, mert ez lehetőséget adhat a penészgomba és az antagonista mikroorganizmus közötti kölcsönhatás mélyrehatóbb ismeretére. Az élesztőtörzsek gátló hatékonysága és az alkalmazott sejtsűrűség, illetve tárolási hőmérséklet között szoros összefüggést figyeltem meg (20. és 21. táblázat). MCLAUGHLIN és munkatársai (1990), valamint FAN és TIAN (2001) eredményeihez hasonlóan: nagyobb koncentrációjú

élesztő szuszpenziót alkalmazva növekvő mértékű gátlást tapasztaltam. A kisebb tárolási hőmérséklet és az antagonista élesztők együttes alkalmazása additív hatást eredményezett, ami összhangban van BJÖRNBERG és SCHNÜRER (1993) megfigyelésével.

A különböző kutatások alapján biológiai védekezésre alkalmasnak bizonyuló élesztőgombákkal történő összehasonlító vizsgálatok szerint megállapítható, hogy a *Kluyveromyces lactis* vizsgált törzsei is lehetséges biokontroll szervezetek (14. és 15. ábra). Az általam vizsgált *Kluyveromyces lactis* törzsek alapvetően nem zöldségről, gyümölcsről vagy egyéb terményről származnak – amilyen próbálkozást az általam feldolgozott szakirodalom nem tartalmaz – ezért lehetséges, hogy alkalmazásuk nemcsak egy terményre, földrajzi területre korlátozódik, hanem annál nagyobb hatáskörűvé válhat.

A *Kluyveromyces lactis* Y00260 törzs gátló hatásmechanizmusát vizsgálva nem tapasztaltam killertoxin képzést. Az agarlyuk diffúziós vizsgálat, mely során az élesztő sejtmentes szűrletében esetlegesen jelenlevő antibiotikus anyagok hatását vizsgáltam, nem utalt antibiózisra, mivel az egyik penésztörzs (F00601) esetében tapasztalt enyhe gátlás nem fokozódott a koncentrált sejtmentes szűrlet alkalmazása esetén. Hasonló kísérletekben CASTORIA és munkatársai (2001), illetve FAN és TIAN (2001) sem tudták kimutatni *Aerobasidium pullulans*, illetve *Cryptococcus albidus* sejtmentes felülúszójának penészgátló hatását, melyek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az említett élesztőgombák nem termelnek antibiotikumot.

A szakirodalomban (MCLAUGHLIN et al., 1990; PIANO et al., 1997) tapasztaltakhoz hasonlóan a tápanyagért való versengésre csak közvetett úton tudok következtetni. Egyrészt, növekvő sejtsűrűségű élesztő szuszpenziót alkalmazva nőtt a *Kluyveromyces lactis* hatékonysága, másrészt a két különböző összetételű tápközegen eltérő gátlás volt tapasztalható (3. melléklet). A tápközegekben jelenlevő különböző tápanyagforrások nem befolyásolták az élesztőszaporodást (23. ábra), azonban egyes összetevők – melyeknek pontos meghatározása további kutatásokat igényel – szűk keresztmetszetet jelenthetnek a penészgombák számára. A burgonya-dextróz tápközeg valamely komponensének fogyása szorítja vissza valószínűleg a *Penicillium expansum* növekedést, mivel nemcsak a kontroll telepátmérők átlaga, hanem az élesztőgombákkal elért gátlás mértéke is nagyobb volt PDA tápközegen, mint a maláta kivonatot tartalmazó tápközegen (14. és 15. ábra). SPADARO és munkatársai (2002) *Metschnikowia pulcherrima* izolátumok antagonista hatását vizsgálták hatféle tápközegen, és arra a következtetésre jutottak, hogy a különböző tápanyagforrások nemcsak a romlást okozó penész és az antagonista élesztő közötti versengésre vannak hatással, hanem az egyes szervezetek

anyagcseréjére is befolyással vannak. Így lehetséges, hogy az adott élesztőizolátum bizonyos tápanyagforrások jelenlétében a penészel szemben toxikus anyagokat képez.

Az illékony komponensek gátló hatásának vizsgálata egyértelműen bizonyítja, hogy a *Kluyveromyces lactis* által termelt gáznemű anyag (izoamil-alkohol, izovajsav, izovaleriánsav, fenilizobutirát, valamint etilacetát) szintén oka a gátlásnak. Az egyes komponensekkel külön-külön elvégzett vizsgálatokat (20. ábra) hasonlítva a *Kluyveromyces lactis* törzsekkel végzett – illékony komponensek hatására vonatkozó – vizsgálatokkal (17., 18. ábra), megállapítható, hogy az élesztők anyagcseréje következtében kisebb mennyiségben ugyan, de állandóan jelenlévő komponensek együttesen kifejtett hatása nagyobb mértékű, mint egy-egy komponens egyszeri, nagyobb mennyiségben történő adagolása révén bekövetkezett gátlás. Ezeknek az illékony anyagoknak nagy koncentrációban való önálló alkalmazását akadályozza az is, hogy legtöbbjük igen kellemetlen szagú. A mikroorganizmusok metabolizmusa következtében zárt térben kialakuló légösszetétel változás – oxigén tartalom csökkenés és széndioxid tartalom növekedés – önmagában nem fejt ki olyan mértékű gátlást, melyet ezekben a kísérletekben tapasztaltam, azonban hozzájárulhat az illékony komponensek hatásához. Az illékony komponensek gátlóhatására vonatkozó eredményeimet támasztja alá, hogy DRUVEFORS (2004) is megfigyelte az élesztő által termelt etilacetát penészgátló hatását *Pichia anomala*-val végzett kísérletei során.

Antagonista élesztők módosított légterrel (26. ábra), illetve kisebb hőmérsékleten való tárolással (27. ábra) kombinált alkalmazása nemcsak a szakirodalomból ismert biokontroll élesztők, hanem *Kluyveromyces lactis* esetében is növelte a penésznövekedés gátlást. USALL és munkatársai (2000) is beszámolnak arról, hogy az általuk alkalmazott *Candida sake*, alma szabályozott légterű tárolása során, fokozott mértékben gátolta a *Penicillium expansum* okozta romlást. A *Kluyveromyces lactis* esetében az 5°C-os tárolás során fellépő additív hatás hiánya azonban nem előnyös az élesztő gyakorlati alkalmazása szempontjából. Ez a tény arra is felhívja a figyelmet, hogy már screenelés során is érdemes az ipari gyakorlat főbb tényezőit szem előtt tartani (pl. screenelést kis hőmérsékleten is elvégezni, vagy kis hőmérsékleten tárolt almáról antagonista mikroorganizmust izolálni).

Az illékony komponensekkel elvégzett vizsgálatok-, valamint a kombinált kezelések kísérleti eredményei felvetik azt a lehetőséget, hogy a *Kluyveromyces lactis* biológiai védekezésre szánt alkalmazása módosított atmoszférájú csomagolásban fejtheti ki hatását a leghatékonyabb módon, tekintve, hogy ott viszonylag kis légtérben az illékony komponensek megfelelő koncentrációban vannak jelen, illetve a normál légösszetételhez képest nagyobb széndioxid- és kisebb oxigén koncentráció és az élesztő gátló tevékenysége additív hatást eredményez.

A különböző fajtájú – nyári, illetve tárolásra szánt – almákon végzett vizsgálatok ugyan nem voltak összehangban, az a tény azonban, hogy a *Kluyveromyces lactis* törzs a tárolt almán mutatott gátló hatást, tovább erősíti annak gyakorlati alkalmazhatóságát. Ezt támasztja alá az is, hogy az almáról izolált *Metschnikowia pulcherrima* törzs is hasonló gátló hatékonyságot mutatott ugyanazon körülmények között. A későbbiekben fontosnak tartanám az olyan jellegű vizsgálatok elvégzését, melyek jobban modellezik a gyakorlati alkalmazást: az alkalmazott élesztőgomba védő hatását ne csak mesterségesen ejtett sebeken, hanem az alma egész felületén kísérvék figyelemmel.

Az almás tápközegen nyert biztató eredmények (28. ábra) nem tükrözték teljes mértékben az almán kialakuló enyhébb gátló hatást (30. ábra), melynek oka az almalé és a vizsgált alma eltérő összetételében (pl. savtartalom, cukortartalom) kereshető. Mindemellett fontosnak tartom olyan modell tápközégek alkalmazását is, melyek minél inkább megközelítik a vizsgált gyümölcs, vagy zöldség összetételét, hiszen ezeken hitelesebb előrejelzéseket szerezhetünk az antagonista szervezet és a penészgomba terményen kialakuló egymásra hatásáról, mint a mesterséges tápközégeken.

Antagonista élesztőgombák *Penicillium expansum* patulin termelésére kifejtett hatásával kapcsolatos előkísérletek biztató eredményekkel szolgáltak (25. ábra). Élelmiszer-biztonsági, de alapkutatósi célból is érdemesnek tartanám ennek a kölcsönhatásnak további vizsgálatát.

Gyümölcsök és zöldségek tárolása során felmerülő biológiai védekezéssel kapcsolatos munkákban egyelőre ritkán fordulnak elő olyan vizsgálatok, melyek az antagonista szervezet, a penészgomba, vagy a kettő között kialakuló kölcsönhatás hatásmechanizmusának genetikai hátterét is figyelembe vennék. A biokontroll szervezetek molekuláris technikákkal történő jobb megismerése, a gyakorlati alkalmazhatóságának kiterjesztése, valamint az esetleges genetikai beavatkozással megnövelt hatékonyság végett véleményem szerint az ilyen irányú kutatásoknak nagy jövője van.

## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A szakirodalomban elsőként vizsgáltam olyan élesztőgomba penészgombára kifejett antagonist hatását, mely nem a gyümölcsökre, zöldségekre jellemző mikrobiota tagja. Az általam alkalmazott *Kluyveromyces lactis* élesztő az elvégzett *in vitro* és a gyakorlati életet modellező körülmények (almán, kombinált kezelés során) közötti összehasonlítás alapján potenciális védő (biokontroll) mikroorganizmusnak tekinthető.
2. Megállapítottam, hogy a *Kluyveromyces lactis* által kifejett gátlás hatásmechanizmusában, a tápanyagért való versengés mellett kiemelkedő szerepe van az élesztőgomba által termelt illékony komponenseknek és széndioxidnak.
3. A kísérleti eredmények alapján a *Kluyveromyces lactis* és *Metschnikowia pulcherrima* élesztőgombáknak a *Penicillium expansum* patulin termelésére kifejett hatását figyelembe véve, az antagonista élesztők nem csupán a gazdasági veszteségek csökkentése, hanem az élelmiszer-biztonság szempontjából is jelentős szerepet játszhatnak.
4. Megállapítottam, hogy az almáról származó hatékony élesztőizolátumok *Metschnikowia pulcherrima* törzsek. Az általam kiválasztott izolátum szintén hatékony volt a vizsgált penésztörzsekkel szemben – gátlóhatása nagyobb volt, mint a törzsgyűjteményi izolátumnak.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Gyümölcsök és zöldségek penészes megbetegedés eredetű romlása, illetve fertőzöttsége világszerte komoly veszteséget okoz a tárolás során, melynek mind gazdasági, mind élelmiszerbiztonsági szempontból nagy jelentősége van.

Az elmúlt időszakban egyre inkább olyan minőség megőrzésre irányuló eljárásokra (pl. hűtőtárolás, betárolás előtti hőkezelés, szabályozott légterű tárolás, növénynemesítés) irányul a figyelem, melyek lehetővé teszik a vegyszeres (fungicid) kezelések mellőzését, vagy csökkentett mértékű alkalmazását a tárolás során. Ezen eljárások egyike a biológiai védekezés – penészekkel szemben gátló hatást kifejtő mikroorganizmusok alkalmazása – mely hazánkban a termények tárolása területén még kutatási szinten sem nagyon ismert.

Állandó törekvés újabb és újabb antagonista mikroorganizmusok kiválasztása, gátló hatásmechanizmusuk megismerése, és gyakorlati használatra való alkalmasságuk vizsgálata. A munka célja is ezzel van összhangban: *Penicillium expansum*-ot gátló élesztőgomba kiválasztása, és körültekintő vizsgálata.

Az *in vitro* screenelési eljárás során két élesztőgombát választottam ki: az alma mikrobiotájára nem jellemző *Kluyveromyces lactis*-t, valamint egy almáról izolált *Metschnikowia pulcherrima*-ként azonosított törzset. Mivel ez utóbbi fajnak a biológiai védekezés területén nagy irodalma van, a későbbiekben összehasonlító vizsgálatoknál került a figyelem előterébe. A *Kluyveromyces lactis* faj néhány törzsének gátló hatását a szakirodalomban biológiai védekezésre alkalmasnak ítélt élesztőgombák hatékonyságával *in vitro* és – laboratóriumi körülmények között – almán összevetve ez az élesztőgomba potenciális biokontroll szervezetek közé sorolható. Ezt támasztják alá a hatásmechanizmus megismerésére irányuló vizsgálatok, mely során nem találtam egyértelmű bizonyítékot antibiózisra. A gátlásban nagy szerepe van az élesztőgomba által termelt illékony komponenseknek (izovajsav, izovaleriánsav, fenil-izobutirát). A kombinált kezelések során tapasztalt additív hatás is a gyakorlati megvalósíthatóságot segíti elő.

*Penicillium expansum* és antagonista élesztők (*Kluyveromyces lactis*, illetve *Metschnikowia pulcherrima*) kevert tenyészetében a kontrollhoz képest kisebb patulin mennyiség hívja fel a figyelmet arra, hogy a biokontroll élesztők alkalmazása nemcsak gazdasági megfontolásból, hanem élelmiszerbiztonsági szempontból is hasznosak lehetnek.

A munka folytatásaként fontosnak tartom a gátló hatásmechanizmus további vizsgálatát, a gátlás genetikai hátterének megismerését. A gyakorlati alkalmazás szempontjából szükségesek még az ipari alkalmazást jobban modellező kísérletek: pl. módosított atmoszférás csomagolás, antagonista alkalmazása a gyümölcs egész felületén, féltüzemi kísérletek.

## SUMMARY

Due to spoilage and contamination caused by molds on fruits and vegetables during postharvest storage high economic losses appear all over the world, but also safety aspects have to be considered.

More and more technologies – such as cooling, heat treatment before storage, controlled atmosphere storage etc. – are investigated and applied in recent years in order to keep better quality of fruit and vegetables with omission or reduced use of chemicals during storage. Biological control – using antagonistic microorganisms for inhibition of plant pathogenic molds – is one of the newer methods. Despite promising results in research and successful application in some countries biocontrol in fruit and vegetable storage is not well known even at scientific level in Hungary.

Isolating newer and newer biocontrol agents, achieving more knowledge about the mode of action, enhancing their efficiency, investigating their capability for practical application is permanently in focus of researchers. The aim of this work is linked to this trend: screening and investigating antagonistic yeast – not applied up to the present – for inhibition of *Penicillium expansum*.

Two yeasts have been selected as a result of the *in vitro* screening: *Kluyveromyces lactis* – a yeast not member of the usual microbiota of apple; and an isolate originating from apple identified as *Metschnikowia pulcherrima*. Regarding the numerous publications connected with biocontrol activity and mode of action of *Metschnikowia pulcherrima* the isolate from apple was used for comparison. *Kluyveromyces lactis* can be determined as a potential biocontrol agent on the basis of comparison of the inhibitory effect of some strains of this yeast with biocontrol yeasts *in vitro* and – under laboratory conditions – on apple. According to investigations on mechanism of action no proof on antibiotic production was found. Production of volatile compounds (iso-valeric acid, iso-butyric acid and phenyl-iso-butyrate) play important role in inhibition of mold growth. Applying *Kluyveromyces lactis* in combination with other treatments additive effect was achieved that also contributes to the successful application in future.

The quantity of patulin was ten times less in mixed cultures of *Penicillium expansum* and antagonistic yeasts (*Kluyveromyces lactis* or *Metschnikowia pulcherrima*) than in control samples, referring to the advantages of application of biocontrol yeast not only from economical point of view but in terms of food safety as well.

Getting more knowledge about mode of action, and about the genetic background of the inhibitions are the main goals in the future. It would be also important to carry out experiments – such as modified atmosphere storage, application antagonists on the whole surface of the fruit – for modelling practice in a proper way.



## 1. MELLÉKLET – FELHASZNÁLT IRODALOM

- A 24/1995 (VII. 14.) NM rendelet: az élelmiszerek ártalmas vegyi szennyeződésének elhárításáról szóló 4/1978 (VI. 29.) EüM rendelet módosításáról. *Magyar Közlöny*. 60., 3316-3317.
- ADAMS, P.B. (1990): The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 28, 59-72.
- ADIKARAM, N.K.B; BROWN, A.E.; SWINBURNE, T.R. (1983): Observation on infection of *Capsicum annuum* fruit by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum capsici*. *Transactions of the British Mycological Society*. 80, 395-401.
- AIT-LAHSEN, H.; SOLER, A.; REY, M.; CRUZ, J.; MONTE, E.; LLOBELL, A. (2001): An antifungal exo- $\alpha$ -glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 5833-5839.
- ANDERSON, J.A.; FILINOW, A.B.; VISHNIAC, H.S. (1997): *Cryptococcus humicola* inhibits development of lesions in 'Golden Delicious' apples. *HortScience*. 32, 1235-1236.
- ARRAS, G. (1996): Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 8, 191-198.
- ARRAS, G.; ARRU, S. (1997): Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Annali di Microbiologica ed Enzimologia*. 47, 97-120.
- ARRAS, G.; NICOLUSSI, P.; LIGIOS, C. (1999): Non-toxicity of some antifungal yeasts (*Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula rubra*, and *Candida oleophila*) in laboratory animals. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 49, 125-131.
- ARRAS, G.; DE CICCO, V.; ARRU, S.; LIMA, G. (1998): Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 73, 413-418.
- BACON, C.W.; YATES, I.E.; HINTON, D.M.; MEREDITH, F. (2001): Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*. 109, 325-332.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. (1998): *Nonthermal Preservation of Foods*. – Food Irradiation. 161- 213 p. Marcel Dekker Inc., New York.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. (1993): Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*. 83, 1062-1071.
- BJÖRNBERG, A., SCHNÜRER, J. (1993): Inhibition of growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. *Canadian Journal of Microbiology*. 39, 623-628.
- BRACKETT, R.E. (1987): Vegetables and Related Products. 129-145. p. In BEUCHAT, L.R. (Szerk.): *Food and Beverage Mycology*. New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc.
- BROOKS, C.; COOLEY, J.S. (1928): Time-temperature relations in different types of peach rot infection. *Journal of Agricultural Research*. 37, 507-543.
- BROWN, A.E.; ADIKARAM, N.K.B. (1983): A role for pectinase and protease inhibitors in fungal rot development in tomato fruits. *Phytopathologische Zeitschrift*. 106, 239-251.
- BROWN, A.E.; FINLAY, R.; WARD, J.S. (1987): Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurescens* against soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 19, 657-664.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCO, V. (1997):  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*. 12, 293-300.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCO, V. (2001): *Aerobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 22, 7-17.

- CHALUTZ, E.; BEN-AIRE, R.; DROBY, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; WILSON, C. (1988): Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. *Phytoparasitica*. 16, 69.
- CHEH, I.; INBAR, J. (1994): Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 48, 37-43.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R.; AVENT, A.G. (1987): Antifungal alkylpyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*. 88, 503-513.
- CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; KELMAN, A. (1994): Enhancing the natural resistance of plant tissues to postharvest diseases through calcium application. *HortScience*. 29, 751-754.
- COOK, R.J. (1989): Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture*. 3, 51-62.
- COOK, R.J. (1993): Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 31, 53-80.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. (1983): The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 318 p.
- CURTIS, F.; TORRIANI, S.; DE CICCO, V. (1996): Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 46, 45-55.
- DEÁK, T.; BEUCHAT, L.R. (1996): Yeasts in Specific Types of Foods. 61-95 p. In DEÁK, T.; BEUCHAT, L.R.: *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Boca Raton: CRC Press.
- DICKENS, F.; JONES, H.E.H. (1961): Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *British Journal of Cancer*. 15, 85-100.
- DI PIETRO, A.; LORITO, M.; HAYES, C.K.; HARMAN, G.E. (1993): Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination of gliotoxin. *Phytopathology*. 83, 308-313.
- DOCK, L.L.; NIELSEN, P.V.; FLOROS, J.D. (1998): Biological control of *Botrytis cinerea* growth on apples stored under modified atmospheres. *Journal of Food Protection*. 61, 1661-1665.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L. (1991): Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News and Information*. 2, 169-173.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; GHAOUTH, A.E.; WILSON, C.L. (2003): Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol *Aspire*. *Postharvest Biology and Technology*. 27, 127-135.
- DROBY, S.; HOFSTEIN, R.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.; FRIDLINDER, B.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; TIMAR, D.; CHALUTZ, E. (1993): Pilot testing of *Pichia guillermondii*: A biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control*. 3, 47-52.
- DRUVEFORS, U.A. (2004): Yeast biocontrol of grain spoilage moulds. Mode of action of *Pichia anomala*. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. p. 29.
- DRUVEFORS, U.A.; PASSOTH, V.; SCHNÜRER, J. (2003): The role of nutrient competition and ethyl acetate formation in the mode of action of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts. 26-29. August 2003. Budapest, Hungary. Book of Abstracts p. 115.
- DRUVEFORS, U.A.; JONSSON, N.; BOYSEN, M.E.; SCHNÜRER, J. (2002): Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. *FEMS Yeast Research*. 2, 389-394.
- ELAD, Y. (1988): Scanning electron microscopy of parasitism of *Botrytis cinerea* on flowers and fruits of cucumber. *Transactions of the British Mycological Society*. 91, 185-190.
- ETTER, L.; SZIGETI, G.; TABAJDINÉ PINTÉR, V. (1990): Penészgombák szerepe takarmányok és élelmiszerek minőségromlásában. 213-268. p. In TÉREN, J.; DRASKOVICS, I.; NOVÁK, E.K. (Szerk.) *Mikotoxinok, toxinogén gombák*,

- mikotoxikózisok*. Budapest: Magyar Élelmiszertudományi Egyesület, Gabonaforgalmi és Malomipari Szolgáltató Vállalat Nyomdaüzeme.
- FALLIK, E.; AHARONI, Y.; COPEL, A.; RODOV, V.; TUVAI-ALKALAI, S.; HOREV, B.; YEKUTIELI, O.; WISEBLUM, A.; REGEV, R. (2000): Reduction of postharvest losses of Galia melon by short hot-water rinse. *Plant Pathology*. 49, 333-338.
- FALLIK, E.; GRINBERG, S.; ALKALAI, S.; YEKUTIELI, O.; WISEBLUM, A.; REGEV, R.; BERES, H.; BAR-LEV, E. (1999): A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. *Postharvest Biology and Technology*. 15, 25-32.
- FAN, Q., TIAN, S. (2001): Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology*. 21, 341-350.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 1981: Food loss prevention in perishable crops. [www.fao.org/docrep/S8620E/S8620E00.htm](http://www.fao.org/docrep/S8620E/S8620E00.htm)
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 1989: Prevention of post-harvest food losses fruit, vegetables and root crops a training manual. [www.fao.org/docrep/T0073E/T0073E00.htm](http://www.fao.org/docrep/T0073E/T0073E00.htm)
- FARKAS, J. (2001): Irradiation of minimally processed foods. 273-290. p.In: MOLINS, R. (Ed.): *Food Irradiation Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- FILINOW, A.B. (2001): Butyl acetate and yeasts interact in adhesion and germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* and in fungal decay of Golden Delicious apple. *Journal of Chemical Ecology*. 27, 831-844.
- FILINOW, A.B.; VISHNIAC, H.S.; ANDERSON, J.A.; JANISIEWICZ, W.J. (1996): Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanism of action. *Biological Control*. 7, 212-220.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. (2002): Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. 306-320. p. In SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S. (Szerk.): *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- FRAVEL, D.R. (1988): Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 26, 75-91.
- FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M.E.; LINGSTEN, K.; SCHNÜRER, J. (2002): Physiological characteristic of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research*. 2, 395-402.
- GARCIA, J.M.; AGUILERA, C.; ALBI, M.A. (1995) Postharvest heat treatment on Spanish strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 1489-1492.
- GILINGERNÉ-PANKOTAI, M.; ZENTAI, Á. (2003): Az integrált termesztés bevezetésének sikerei és nehézségei a hazai zöldségajtatásban. SZAB Kertészeti Munkabizottságának Tudományos ülése. – „Integrált kertészeti termesztés”. 2003. szeptember 17, Szarvas.
- GOLDMAN, H.G.; HAYES, C.; HARMAN, G.E. (1994): Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology*. 12, 478-482.
- GRIFFIN, D.H. (1981/a): The physical environment and growth. 195-218. p. In GRIFFIN, D.H.: *Fungal Physiology*. New York: Wiley.
- GRIFFIN, D.H. (1981/b): Spore formation: Environmental factors. 219-239. p. In GRIFFIN, D.H.: *Fungal Physiology*. New York: Wiley.
- HARDING, V.K.; HEALE, J.B. (1980): Isolation and identification of the antifungal compounds accumulation in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology*. 17, 277-289.
- HASAN, H.A.H. (2000): Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16, 607-612.
- HE, D.; ZHENG, X.D.; YIN, Y.M.; SUN, P.;ZHANG, H.Y. (2003): Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44, 211-216.

- HOWELL, C.R.; BEIER, R.C.; STIPANOVIC, R.D. (1988): Production of ammonia by *Enterobacter cloacea* and its possible role in the biological control of *Phytophthora* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology*. 78, 1075-1078.
- HODGSON, V.J.; WALKER, G.M.; BUTTON, D. (1994): A rapid colorimetric assay of killertoxin activity in yeasts. *FEMS Microbiological Letters*. 120, 201-205.
- ISMAIL, F.A.; AFIFI, S.A. (1976) Control of postharvest decay in fruits and vegetables by irradiation. *Nahrung*. 20, 585-592.
- IZBÉKI, A.; OROSZ, R.; ZENTAI, Á. (2004): Integrált növényvédelem. – Hatékony segítség a hajtattott paradicsom kártevői ellen. *Zöldségkertész*. VI. (1), 5-9.
- JANISIEWICZ, W.J. (1987): Postharvest biological control of blue mold on apple. *Phytopathology*. 77, 481-485.
- JANISIEWICZ, W.J. (1988): Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. *Phytopathology*. 78, 194-198.
- JANISIEWICZ, W.J. (1994): Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 2671-2676.
- JANISIEWICZ, W.J. (1999): Blue mold, *Penicillium* spp. Fruit Disease Focus – January [www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease\\_month/bluemold0199.html](http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_month/bluemold0199.html)
- JANISIEWICZ, W.J.; BORS, B. (1995): Development of microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound invading postharvest pathogens of fruits. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 3261-3267.
- JANISIEWICZ, W.J.; JEFFERS, S.N. (1997): Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*. 16, 629-633.
- JANISIEWICZ, W.J.; ROITMAN, J. (1987): Postharvest mucor rot control on apples with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*. 77, 1776.
- JANISIEWICZ, W.J.; ROITMAN, J. (1988): Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*. 78, 1697-1700.
- JANISIEWICZ, W.J.; WORKOSKI, T.J.; KURTZMAN, C.P. (2001): Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology*. 91, 1098-1108.
- JANISIEWICZ, W.J.; WORKOSKI, T.J.; SHARER, C. (2000): Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*. 90, 1196-1200.
- JANISIEWICZ, W.J.; CONWAY, W.S.; GLENN, D.M.; SAMS, C.E. (1998): Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. *HortScience*. 33, 105-109.
- KADER, A.A. (1985): Quality factors: definition and evaluation for fresh horticultural crops. 75-82. p. In KADER, A.A.; KASMIRE, R.F.; MITCHELL, F.G.; REID, M.S.; SOMMER, N.F.; THOMPSON, J.F.: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources.
- KARABULUT, O.A.; COHEN, L.; WIESS, B.; DAUS, A.; LURIE, S.; DROBY, S. (2002): Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. *Postharvest Biology and Technology*. 24, 103-111.
- KOBILER, I.; SHALOM, Y.; ROTH, I.; AKERMAN, M.; VINOKUR, Y.; FUCHS, Y.; PRUSKY, D. (2001): Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the incidence of side and stem end rots in mango fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 23, 23-32.
- KOVÁCS, E. (2004): Postharvest treatment of fruits. 173-212. p. In DRIS, R. and JAIN, M. (eds.) *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops. Vol. 4. „Postharvest Treatment and Technology.*” Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- KOVÁCS, E.; KERESZTES, Á.; KOVÁCS, J. (1988): The effects of gamma irradiation and calcium treatment on the ultrastructure of apples and pears. *Food Microstructure*. 7, 1-14.

- KRAUSS, U.; JOHANSON, A. (2000): Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands. *Crop Protection*. 19, 151-159.
- LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S. (2001): Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*. 12, 73-76.
- LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W.; CONWAY, W.S. (2003): Biological control of minimally processed fruits and vegetables. 319-332. p. In: NOVAK, J.S. (Szerk): *Microbial safety of minimally processed foods*. Boca Raton: CRC Press.
- LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. (1997): Effectiveness of *Aerobasidium pullulans* and *Candida olephila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*. 10, 169-178.
- LLEWELLYN, G.C.; MCCAY, J.A.; BROWN, R.D.; MUSGROVE, D.L.; BUTTERWORTH, L.F.; MUNSON, A.E.; WHITE, K.L. (1998): Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F (1) mice. *Food and Chemical Toxicology*. 36, 1107-1115.
- LORITO, M.; HAYES, C.K.; DI PIETRO, A.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E. (1994): Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosaminidase and an N-acetyl-  $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 84, 398-405.
- LUND, B.M.; SNOWDON, A.L. (2000): Fresh and processed fruits. 738-758. p. In LUND, B.M.; BAIRD-PARKER, T.C.; GOULD, G.W. (Szerk.): *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- LYDAKIS, D., AKED, J. (2003): Vapour heat treatment of Sultanina table grapes. II.: Effect on postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*. 27, 117-126.
- MANTLE, P.G. (1987): Secondary metabolites of *Penicillium* and *Acremonium*. 161-217. p. In PEBERDY, J.F (Szerk.): *Penicillium and Acremonium*. New York: Plenum Press.
- MAO, G.H.; CAPPELLINI, R.A. (1989): Postharvest biocontrol of gray mold of pear by *Pseudomonas gladioli*. *Phytopathology*. 79, 1153.
- MARQUENIE, D.; LAMMERTYN, J.; GEERAERD, A.H.; SOONTJENS, C.; VAN IMPE, J.F.; NICOLAI, B.M.; MICHELIS, C.W. (2002/a): Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 74, 27-35.
- MARQUENIE, D.; MICHELIS, C.W.; GEERAERD, A.H.; SCHENK, A.; SOONTJENS, C.; VAN IMPE, J.F.; NICOLAI, B.M.; (2002/b): Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*. 73, 187-196.
- MASIH, E.I.; PAUL, B. (2002): Secretion of  $\beta$ -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology*. 44, 391-395.
- MATTHEIS, J.P.; ROBERTS, R.G. (1993): Fumigation of sweet cherry (*Prunus avium* 'Bing') fruit with low molecular weight aldehydes for postharvest decay control. *Plant Disease*. 77, 810-814.
- MCGUIRE, R.; HAGENMAIER, R.D. (1996): Shellac coatings for grapefruits that favour biological control of *Penicillium digitatum* by *Candida olephila*. *Biological Control*. 7, 100-106.
- MCLAUGHLIN, R.J.; WISNIEWSKI, M.E.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. (1990): Effects of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apples with *Candida* sp. *Phytopathology*. 80, 456-461.
- MCLAUGHLIN, R.J.; WILSON, C.L.; DORBY, S.; BEN-AIRE, R.; CHALUTZ, E. (1992): Biological control of postharvest disease of grape, peach, and apple with the yeast *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Disease*. 76, 470-473.
- MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J.I. (2004): Control of fungal decay of apple and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology*. 31, 1-8.

- MERCIER, J.; WILSON, C.L. (1994): Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida olephila* and their effect in infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control*. 4, 138-144.
- MERMELSTEIN, N.H. (2001): Emerging technologies and „fresh” labeling. *Food Technology*, 55, 64-67.
- MITCHELL, F.G. (1985): Preparation for Fresh Market. I. Fruits. 14-22. p. In KADER, A.A.; KASMIRE, R.F.; MITCHELL, F.G.; REID, M.S.; SOMMER, N.F.; THOMPSON, J.F.: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources.
- MOODLEY, R.S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. (2002): The effect of modified atmospheres and packaging on patulin production in apples. *Journal of Food Protection*. 65, 867-871.
- MOSS, M.O. (1987): Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. 37-71. p. In PEBERDY, J.F (Szerk.): *Penicillium and Acremonium*. New York: Plenum Press.
- NÁNÁSINÉ CSÉCSEI, E. (2001): Védőtenyészet alkalmazásának hatása a zöldmalátagyártásnál tapasztalt penész növekedés gátlására. (Élelmiszerbiztonsági szakmérnöki szakdolgozat.) Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar.
- NAQVI, S.A.M.H. (1993): Benzimidazole fungicides in control of post-harvest diseases of Nagpur mandarin. *Plant Disease Research*. 8, 19-24.
- NEVEN, L.G.; DRAKE, S.R. (2000): Comparison of alternative postharvest quarantine treatments for sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*. 20, 107-114.
- NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. (2000): Fresh and processed vegetables. 620-684. p. In LUND, B.M.; BAIRD-PARKER, T.C.; GOULD, G.W. (Szerk.): *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- NIELSEN, M.N.; SØRANSEN, J.; FELS, J.; PEDERSEN, H.C. (1998): Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (10), 3563-3569.
- NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; LIMA, G. (1998): Use of UV-C light to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 13, 171-181.
- NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; VIÑAS, I. (2002): Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *Journal of Food Protection*. 65, 178-184.
- OBAGWU, J.; KORSTEN, L. (2003): Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*. 28, 187-194.
- ONIONS, A.H.S.; BRADY, B.L. (1987): Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium* – *Penicillium*. 10-26. p. In PEBERDY, J.F (Szerk.): *Penicillium and Acremonium*. New: Plenum Press.
- OPPENHEIM, A.B.; CHET, I. (1992): Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. *Trends in Biotechnology*. 10, 392-394.
- ORTU, G.; SCHERM, B.; MUZZU, A.; BUDRONI, M.; ARRAS, G.; MIGHELI, Q. (2003): Biocontrol activity of antagonistic yeast against *Penicillium expansum* on apple. 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts. 26-29. August. Budapest, Hungary. Book of Abstracts p. 200.
- OSTERLOH, A. (1996): Lagerung der Obstarten. 147-176. p. In OSTERLOH, A.; EBERT, G.; HELD, W.H.; SCHULZ, H.; URBAN, E. (Szerk.) *Lagerung von Obst und Südfrüchten*. Stuttgart: Ulmer Verlag.
- PALOU, L.; CRISOSTO, C.H.; SMILANICK, J.L.; ADASKAVEG, J.E.; ZOFFOLI, J.P. (2002): Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. 24, 39-48.

- PEREZ, A.G.; SANZ, C.; RIOS, J.J.; OLIAS, R.; OLIAS, J.M. (1999): Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 47, 1652-1656.
- PETERSSON, S. (1998): Yeast/mold interactions during airtight storage of high-moisture feed grain. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 65. p.
- PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. (1995): Biocontrol of mold growth in high moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 1027-1032.
- PETERSSON, S.; JONSSON, N.; SCHNÜRER, J. (1999): *Pichia anomala* as a biocontrol agent during storage of high-moisture feed grain under airtight conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 15, 175-184.
- PIANO, S.; NEYROTTI, V.; MIGHELI, Q.; GULLINO, M. L. (1997): Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*. 11, 131-140.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. (1997): *Penicillium* and related genera. – *Penicillium expansum*. 229-302. p. In: PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.
- POLONELLI, L.; CONTI, S.; CAMPANI, L.; FANTI, F. (1990): Biotyping of *Aspergillus fumigatus* and related taxa by the yeast killer system. 225-233. p. In SAMSON, R.A.; PITT, J.I. (Szerk): *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. New York: Plenum Press.
- PORAT, R.; DAUS, A.; WEISS, B.; COHEN, L.; FALLIK, E.; DROBY, S. (2000): Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 18, 151-157.
- PRUSKY, D.; FUCHS, Y.; KOBILER, I.; ROTH, I.; WEKSLER, A.; SHALOM, Y.; FALLIK, E.; ZAUBERMAN, G.; PESIS, E.; AKERMAN, M.; YKUTIELY, O.; WEISBLUM, A.; REGEV, R.; ARTES, L. (1999): Effect of hot water brushing, prochloraz treatment and waxing on the incidence of black spot decay caused by *Alternaria alternata* in mango fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 15, 165-174.
- PUNJA, Z.K.; GAYE, M.M. (1993): Influence of postharvest handling practices and dip treatments on development of black root rot on fresh market carrots. *Plant Disease*. 77, 989-995.
- PUSEY, P.L.; HOTCHKISS, M.W.; DULMAGE, H.T.; BAUMGARDNER, R.H.; ZEHR, E.I.; REILLY, C.C.; WILSON, C.L. (1988): Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant Disease*. 72, 622-626.
- PUSEY, P.L.; WILSON, C.L. (1984): Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*. 68, 753-756.
- RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J.E. (1996): Colonization of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. *Journal of Food Protection*. 59, 1311-1317.
- ROBERTS, R.G. (1990/a): Biological control of mucor rot of pear by *Cryptococcus laurentii*, *C. flavus*, and *C. albidus*. *Phytopathology*. 80, 1051.
- ROBERTS, R.G. (1990/b): Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*. 80, 526-530.
- ROBERTS, R.G. (1991): Characterization of postharvest biological control of deciduous fruit diseases by *Cryptococcus* spp. *Biological Control of Postharvest and Diseases of Fruit and Vegetables*. Workshop Proceeding. Shepherdstown, W. Va., Sept. 1990. U.S. Dept. Agr.-Agr. Res. Serv. Publ. 92, 32-43.
- RODOV, V.; BEN-YEHOSHUA, S.; FANG, D.Q.; D'HALLEWIN, G.; CASTIA, T. (1994): Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. *Acta Horticulturae*. 381, 517-523.

- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. (2002): Identification of the common food-borne fungi – *Penicillium*. 174-239. p. In SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S. (Szerk.): *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- SASS, P. (1986): Tárolási veszteségek és betegségek. 313-407. p. In SASS, P. *Gyümölcstárolás*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.
- SCHENA, L.; IPPOLITO, A.; ZAHAVI, T.; COHEN, L.; NIGRO, F.; DROBY, S. (1999): Genetic diversity and biocontrol activity of *Aerobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*. 17, 189-199.
- SCHIRRA, M.; D’HALLEWIN, G.; BEN-YEHOSHUA, S.; FALLIK, E. (2000): Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 21, 71-85.
- SCHOLBERG, P.L.; CONWAY, W.S. (2002): Postharvest pathology. *Agriculture Handbooks* <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/021postharvest.pdf>
- SCOTT, P.M.; SOMERS, E. (1968): Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 16, 483-485.
- SINGH, V.; DEVERALL, B.J. (1984): *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of the British Mycological Society*. 83, 487-490.
- SOMMER, N.F. (1985): Principles of disease suppression by handling practises. 75-82. p. In KADER, A.A.; KASMIRE, R.F.; MITCHELL, F.G.; REID, M.S.; SOMMER, N.F.; THOMPSON, J.F.: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources.
- SPADARO, D., GULLINO, M.L. (2004): State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*. (in press)
- SPADARO, D., ALLOATI, F.; GULLINO, M.L. (2003): Biocontrol of gray mould on apple: a *Metschnikowia pulcherrima* strain competes for nutrients with the pathogen. 23 rd International Specialised Symposium on Yeasts. 26-29. August. Budapest, Hungary. Book of Abstracts p. 92.
- SPADARO, D., GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. (2004): Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology*. (accepted)
- SPADARO, D., VOLA, R., PIANO, S., GULLINO, M.L. (2002): Mechanism of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*. 24, 123-134.
- SPLITTSTOESSER, D.F. (1987): Fruits and Fruit Products. In Food and Beverage Mycology. BEUCHAT, L.R. (ed). Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York. p. 101-128.
- STARK, M.J.R.; BOYD, A. (1986): The killertoxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO Journal*. 5, 1995-2002.
- STINSON, E.E.; OSMAN, S.F.; HUHTANEN, C.N.; BILLS, D.D. (1978): Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*. 36, 620-622.
- STOLL, K. (1977): Mikrobiologische Aspekte der Haltbarkeit von Früchten und Gemüse. Aspekte der Haltbarkeit von Lebensmittel. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich. 21. Oktober 1977. p. 6-10.
- STOTT, W.T., BULLERMAN, J.B. (1975): Patulin: a mycotoxin of potential concern in foods. *Journal of Milk Food Technology*. 38, 695-705.
- STRETCH, A.W. (1989): Biological control of blueberry and carnberry fruit rots. *Acta Horticulturae*. 241, 301-306.
- SUMBU, Z.L.; THONART, P.; BECHET, J.: Action of patulin on a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*. 45, 110-115.
- SZEPESY, I. (1977): Növénybetegségek. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.



- TÉREN, J.; NOVÁK, E.K. (1990): Mikotoxinok, toxinogén gombák. 2-123. p. In TÉREN, J.; DRASKOVICS, I.; NOVÁK, E.K. (Szerk.): *Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok*. Budapest: Magyar Élelmiszertudományi Egyesület, Gabonaforgalmi és Malomipari Szolgáltató Vállalat Nyomdaüzeme.
- THOMASHOW, L.S. (1996): Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*. 7, 343-347.
- URBAN, E. (1996): Lagerkrankheiten. 195-218. p. In OSTERLOH, A.; EBERT, G.; HELD, W.H.; SCHULZ, H.; URBAN, E. (Szerk.) *Lagerung von Obst und Südfrüchten*. Stuttgart: Ulmer Verlag.
- UREÑA, A.G.; OREA, J.M.; MONTERO, C.; JIMÉNEZ, J.B.; GONZALES, J.L.; SÁNCHEZ, A.; DORADO, M. (2003): Improving postharvest resistance of fruits by external application of trans-resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 82-89.
- URQUHART, E.J.; MENZIES, J.G.; PUNJA, Z.K. (1994): Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on greenhouse cucumber. *Phytopathology*. 84, 341-351.
- USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; FONS, E.; VIÑAS, I. (2000): Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 58, 83-92.
- USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; ERIBE, X.O.; VIÑAS, I. (2001): Pilot test of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 21, 147-156.
- UTKEHEDE, R.S.; SHOLBERG, P.L. (1986): In vitro inhibition of plant pathogens: *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* in vitro control of two postharvest cherry diseases. *Canadian Journal of Microbiology*. 32, 963-967.
- VAJNA, L. (1987): A biológiai védekezés. 189-303. p. In VAJNA, L. (Szerk.): *Növénypatogén gombák*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 303 p.
- VAJNA, L.; JAKUCS, E. (2003): A gombák ökológiája 239-250 p. In JAKUCS, E.; VAJNA, L. (Szerk.) *Mikológia*. Budapest: Agroinform Kiadó.
- VERO, S.; MONDINO, P.; BURGUEÑO, J.; SOUBES, M.; WISNIEWSKI, M. (2002): Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*. 26, 91-98.
- VRIJE, T.; ANTOINE, N.; BUITELAAR, R.M.; BRUCKNER, S.; DISSEVELT, M.; DURAND, A.; GERLAGH, M.; JONES, E.E.; LÜTH, P.; OOSTRA, J.; RAVENSBERG, W.J.; RENAUD, R.; RINZEMA, A.; WEBER, F.J.; WHIPPS, J.M. (2001): The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56, 58-68.
- WALKER, G. M., MCLEOD, A. H., HODGSON, V. J. (1995): Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 127, 213-222.
- WILSON, D.M. (1976): Patulin and penicillic acid. In Mycotoxins and other fungal related food problems. 90-109. p. RODRICKS, J.V. (Szerk): *Advances in Chemistry Series 149*. Washington, D.C.: American Chemical Society.
- WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. (1989): Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeast and bacteria. *Scientia Horticulturae*. 40, 105-112.
- WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. (1989): Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. An emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. 27, 425-441.
- WILSON, C.L.; FRANKLIN, J.D.; PUSEY, P.L. (1987): Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology*. 77, 303-305.
- WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. (1993): A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*. 53, 183-189.
- WISNIEWSKI, M.E.; WILSON, C.L. (1992): Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience*. 27, 94-98.

- WISNIEWSKI, M.E.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. (1991): Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guillermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 39, 245-258.
- WORLD RESOURCES (1998): Environmental change and human health. – Disappearing food. How big are postharvest losses?  
[http://population.wri.org/pubs\\_content\\_print.cfm?ContentID=1385](http://population.wri.org/pubs_content_print.cfm?ContentID=1385)
- WSZELAKI, A.L.; MITCHAM, E.J. (2003): Effect of combination of hot water dips, biological control and controlled atmospheres for control gray mold on harvested strawberries. *Postharvest Biology and Technology*. 27, 255-264.
- YACKEL, W. C., NELSON, A. I., WEI, L. S., STEINBERG, M. P. (1971): Effect of controlled atmosphere on growth of mold on synthetic media and fruit. *Applied Microbiology*. 22, 513-516.
- YAMADA, S.; TAKAYAMA, Y.; YAMANAKA, M.; KO, K.; YAMAGUCHI, I. (1990): Biological activity of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of Pesticide Science*. 15, 95-96.
- ZAGORY, D. (1999): Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology*. 15, 313-321.
- ZAHAVI, T.; COHEN, L.; WEISS, B.; SCHENA, L.; DAUS, A.; KAPLUNOV, T.; ZUTKHI, J.; BEN-AIRE, R.; DROBY, S. (2000): Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus*, and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*. 20, 115-124.

2. MELLÉKLET – ÉLESZTŐ IZOLÁTUMOK ÉS *P. EXPANSUM* KÖLCSÖNHATÁSA

a) törzsgyűjteményből származó izolátumok

Penésztörzs	Táptalaj	<i>Penicillium expansum</i> az adott élesztőtörzs vonaltenyészetét	
		benövi	szorosan körülnövi
<i>P. expansum</i> F00811	MG	<i>Cryptococcus laurentii</i> Yo 1321 <i>Saccharomyces exigens</i> 1033 T <i>Kloeckera apiculata</i> Y00936 <i>Dekkera bruxelliensis</i> 1007 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Sporobolomyces roseus</i> Y00693 <i>Saccharomyces diastaticus</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> Y1070 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Y00681 <i>Cryptococcus albidus</i> Yo 1320 <i>Rhodotorula rubra</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Candida inconspicua</i> CBS 180 <i>Candida magnoliae</i> CBS 4239 <i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 6124 <i>Candida zeylanoides</i> CBS 619 <i>Kluyveromyces lactis</i> Y0241 <i>Kluyveromyces lactis</i> Y01080

b) almáról izolált élesztő csoportok besorolása

Penésztörzs	Táptalaj	<i>Penicillium expansum</i> az adott élesztőtörzs/izolátum vonaltenyészetét	
		benövi	szorosan körülnövi
<i>P. expansum</i> F00811	MG	N, W, P, Z, D, Q, R, T, X, V, Y	B, E, I, G, A, J, K, L, S
	PDA	N, W, P, Z, D, Q, R, T, X, V, Y	B, E, I, G, J, K, L, S
<i>P. expansum</i> F00601	MG	N, P, Z, Q, R, X, V, Y	W, D, T, B, E, I, G, J, K, L, S, A
	PDA	N, P, Z, Q, R, X, V, Y	W, D, T, B, E, I, G, J, K, L, S

c) aszúszemről származó izolátumok

Penésztörzs	Táptalaj	<i>Penicillium expansum</i> az adott élesztőtörzs/izolátum vonaltenyészetét	
		benővi	szorosan körülnövi
<i>P. expansum</i> F00601	MG	A25ZS; A17LM; A3LZS; A24LZS; A26ZS; A8LMZS; A4LZS; A28; A27ZS; A11L	A9M; A5LM; A1LM; A2M; A6LM; A7LM; A16M; A19; A18LM
	PDA	A25ZS; A17LM; A3LZS; A24LZS; A26ZS; A8LMZS; A4LZS; A28; A27ZS; A11L; A19; A18LM	A9M; A5LM; A1LM; A2M; A6LM; A7LM; A16M

d) tokaji borból származó izolátumok

Penésztörzs	Táptalaj	<i>Penicillium expansum</i> az adott élesztőtörzs/izolátum vonaltenyészetét	
		benővi	szorosan körülnövi
<i>P. expansum</i> F00811	MG	I/0/16; I/3/1; I/3/C; I/2/D; I/0/A; I/2/3; I/1/D	I/1/10; I/2/C; I/1/A; I/0/D; I/1/C; I/2/16; I/1/11; I/2/F; I/2/E; I/1/B; I/2/B; I/3/3; I/3/A; I/0/B; I/0/C; I/0/E; I/0/F; I/2/2; I/2/18; I/3/6; I/3/7; I/3/B
	PDA	I/0/16; I/1/10; I/2/C; I/1/A; I/0/D; I/1/C; I/2/16; I/1/11; I/3/C; I/2/F; I/2/E; I/2/D; I/1/B; I/2/B; I/1/D; I/3/3; I/3/A; I/0/C	I/0/A; I/0/B; I/0/E; I/0/F; I/2/2; I/2/3; I/2/18; I/3/1; I/3/6; I/3/7; I/3/B
<i>P. expansum</i> F00601	MG		I/0/16; I/1/10; I/2/C; I/1/A; I/0/D; I/1/C; I/2/16; I/1/11; I/3/C; I/2/F; I/2/E; I/2/D; I/1/B; I/2/B; I/1/D; I/3/3; I/3/A; I/0/A; I/0/B; I/0/C; I/0/E; I/0/F; I/2/2; I/2/3; I/2/18; I/3/1; I/3/6; I/3/7; I/3/B
	PDA		I/0/16; I/1/10; I/2/C; I/1/A; I/0/D; I/1/C; I/2/16; I/1/11; I/3/C; I/2/F; I/2/E; I/2/D; I/1/B; I/2/B; I/1/D; I/3/3; I/3/A; I/0/A; I/0/B; I/0/C; I/0/E; I/0/F; I/2/2; I/2/3; I/2/18; I/3/1; I/3/6; I/3/7; I/3/B

Élesztőtörzsek gátló hatása (%) *Penicillium expansum* törzsek **szubsztrát és léghifa képző részére** a hőmérséklet, tápközeg és alkalmazott élesztő koncentráció függvényében. (25°C-on mért kontroll penésztelep átmérőkhöz viszonyítva)

F811/MG	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
25°C	0	16	4	40	0	33	51	27	0	-12	12	70	0	1	-24	-19	0	42	65	100
15°C	-4	1	-4	13	-4	32	46	27	7	11	15	78	7	5	12	20	10	48	59	71
5°C	39	38	58	80	39	39	59	59	29	23	34	72	29	19	28	27	50	50	57	72
F811/PDA	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
25°C	0	26	30	37	0	18	53	67	0	-20	22	66	0	5	4	64	0	71	71	87
15°C	-6	-4	26	5	-6	13	42	63	-5	3	21	79	-5	6	22	61	11	61	70	76
5°C	30	35	64	84	30	35	65	79	20	9	29	77	20	5	11	58	53	57	71	84
F601/MG	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
25°C	0	64	54	72	0	80	82	83	0	38	49	86	0	38	41	72	0	57	100	100
15°C	25	70	70	85	25	82	82	84	50	61	80	88	43	50	64	84	32	67	77	100
5°C	74	81	84	100	74	78	86	85	66	71	80	87	65	71	68	79	82	81	80	100
F601/PDA	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
25°C	0	54	42	54	0	76	85	81	0	53	85	85	0	54	67	69	0	83	100	100
15°C	17	76	58	76	17	78	85	83	48	67	86	87	38	52	69	90	18	79	89	100
5°C	68	85	88	100	68	82	86	87	62	73	87	88	58	71	77	86	82	86	89	100

Élesztőtörzsek gátló hatása (%) *Penicillium expansum* törzsek **konidium képző részére** a hőmérséklet, tápközeg és alkalmazott élesztő koncentráció függvényében. (25°C-on mért kontroll penésztelep átmérőkhöz viszonyítva)

F811/MG	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
25°C	0	16	36	40	0	55	51	75	0	60	69	70	0	50	34	34	0	61	100	100
15°C	7	55	38	39	7	52	72	74	7	51	75	78	7	44	46	50	17	59	100	100
5°C	80	74	73	80	80	76	80	80	63	54	65	74	63	57	68	77	100	100	100	100
F601/MG	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
			10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>
25°C	0	80	82	72	0	80	100	100	0	64	82	86	0	73	83	100	0	64	100	100
15°C	34	83	86	100	34	82	100	100	53	73	83	87	47	67	85	100	42	75	100	100
5°C	83	100	100	100	83	100	100	100	80	79	81	100	80	100	100	100	100	100	100	100
F811/PDA	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
			10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>
25°C	0	52	70	63	0	18	53	67	0	55	69	65	0	52	65	68	0	77	100	100
15°C	-6	60	76	34	-6	13	42	63	-5	51	79	79	-5	46	55	77	-7	66	83	100
5°C	81	80	81	84	81	79	79	100	57	46	65	82	57	45	50	100	100	100	100	100
F601/PDA	<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - törzsgyűjteményi			<i>P. exp</i> kont	<i>Sp. roseus</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Pich. anomala</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>Kl. lactis</i>			<i>P. exp</i> kont	<i>M. pulcherrima</i> - almáról izolált		
			10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>		10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>
25°C	0	86	86	54	0	80	85	100	0	73	85	85	0	71	83	69	0	100	100	100
15°C	24	85	85	100	24	83	85	100	55	74	89	87	42	69	76	100	38	81	100	100
5°C	76	100	100	100	76	100	100	100	83	83	87	100	81	80	100	100	100	100	100	100

#### 4. MELLÉKLET – GÁTLÁS ABSZOLÚT ÉRTÉKE

25°C-on mért kontroll penésztelep átmérőkhöz viszonyított 10%-nyi gátlás megfelel:

Penésztörzs	F00811	F00601
Tápközeg		
MG	3-4 mm	4-5 mm
PDA	3-4 mm	5-6 mm

## 5. MELLÉKLET – STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS TÁBLÁZATAI

*Kluyveromyces lactis* (NCAIM Y00260, Y01080 és Y0258) törzsek *Penicillium expansum* NCAIM F00811 törzsre kifejtett gátló hatásának összehasonlítása négytényezős varianciaanalízissel, Scheffe próba szerint.

### **Gátló hatás összehasonlítása 25°C-on**

Egytényezős varianciaanalízis (6-6 párhuzamos adattal számolva):

One-Way Analysis of Variance

Data: K1TENY25.atm

Level codes: K1TENY25.kod

Labels:

Means plot: Scheffe      Confidence level: 95      Range test: Scheffe

#### Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	76164.593	113	674.02295	203.829	.0000
Within groups	1759.217	532	3.30680		
Total (corrected)	77923.810	645			

176 missing value(s) have been excluded.

Harmonikus átlag és maradék szórás:

$$h = 5,538$$

$$\text{mar. szórás} = 0,597$$

Négytényezős varianciaanalízis (a párhuzamosok átlagértékével számolva):

Analysis of Variance for K4TENY25.atlag\_atm - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:K4TENY25.taptalaj	432.865	1	432.8645		
B:K4TENY25.eleszto	4.683	2	2.3417		
C:K4TENY25.konc	3511.403	6	585.2339		
D:K4TENY25.ido	10476.430	2	5238.2152		
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	155.98754	2	77.993772		
AC	329.22433	6	54.870722		
AD	48.48776	2	24.243882		
BC	187.15227	12	15.596022		
BD	17.91262	4	4.478154		
CD	383.94179	12	31.995149		
ABC	160.86922	12	13.405769		
ABD	69.15337	4	17.288342		
ACD	168.67454	12	14.056211		
BCD	189.36204	24	7.890085		
ABCD	58.77300	24	2.448875		
RESIDUAL	.00000E0000	0	.00000E0000		
TOTAL (CORRECTED)	16194.920	125			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.



Table of Least Squares Means for K4TENY25.atlag\_atm

Level	Count	95 Percent Confidence			
		Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	126	20.726825	.00000E0000	20.726825	20.726825
A:K4TENY25.taptalaj					
1	63	22.580317	.00000E0000	22.580317	22.580317
2	63	18.873333	.00000E0000	18.873333	18.873333
B:K4TENY25.eleszto					
1	42	20.896429	.00000E0000	20.896429	20.896429
2	42	20.826905	.00000E0000	20.826905	20.826905
3	42	20.457143	.00000E0000	20.457143	20.457143
C:K4TENY25.konc					
1	18	26.899444	.00000E0000	26.899444	26.899444
2	18	25.832778	.00000E0000	25.832778	25.832778
3	18	23.833889	.00000E0000	23.833889	23.833889
4	18	23.197778	.00000E0000	23.197778	23.197778
5	18	18.539444	.00000E0000	18.539444	18.539444
6	18	14.568889	.00000E0000	14.568889	14.568889

Szignifikáns differencia Scheffe szerint:

$$LSD_{5\%} = 0,4144$$

### **Gátló hatás összehasonlítása 15°C-on**

Egytényezős varianciaanalízis (6-6 párhuzamos adattal számolva):

One-Way Analysis of Variance

---

Data: K1TENY15.atm

Level codes: K1TENY15.kod

Labels:

Means plot: Scheffe      Confidence level: 95      Range test: Scheffe

Analysis of variance

---

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	52657.760	100	526.57760	304.515	.0000
Within groups	830.033	480	1.72924		
Total (corrected)	53487.793	580			

---

196 missing value(s) have been excluded.

Harmonikus átlag és maradék szórás:

$$h = 5,683$$

$$\text{mar. szórás} = 0,304$$

### Négytényezős varianciaanalízis (a párhuzamosok átlagértékével számolva):

Analysis of Variance for K4TENY15.atlag\_atm - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:K4TENY15.taptalaj	214.868	1	214.8683		
B:K4TENY15.eleszto	54.688	2	27.3439		
C:K4TENY15.konc	2615.243	6	435.8739		
D:K4TENY15.ido	10939.916	2	5469.9581		
INTERACTIONS					
AB	8.60639	2	4.303196		
AC	256.11029	6	42.685048		
AD	19.61479	2	9.807394		
BC	75.54116	12	6.295096		
BD	67.79578	4	16.948945		
CD	325.64944	12	27.137453		
ABC	92.65584	12	7.721320		
ABD	13.82352	4	3.455879		
ACD	156.20588	12	13.017157		
BCD	48.49646	24	2.020686		
ABCD	60.20795	24	2.508665		
RESIDUAL	.00000E0000	0	.00000E0000		
TOTAL (CORRECTED)	14949.423	125			

42 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for K4TENY15.atlag\_atm

Level	Count	95 Percent Confidence			
		Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	126	17.270952	.00000E0000	17.270952	17.270952
A:K4TENY15.taptalaj					
1	63	18.576825	.00000E0000	18.576825	18.576825
2	63	15.965079	.00000E0000	15.965079	15.965079
B:K4TENY15.eleszto					
2	42	16.570238	.00000E0000	16.570238	16.570238
3	42	18.153095	.00000E0000	18.153095	18.153095
4	42	17.089524	.00000E0000	17.089524	17.089524
C:K4TENY15.konc					
1	18	21.804444	.00000E0000	21.804444	21.804444
2	18	22.576111	.00000E0000	22.576111	22.576111
3	18	18.981111	.00000E0000	18.981111	18.981111
4	18	18.713333	.00000E0000	18.713333	18.713333
5	18	17.591667	.00000E0000	17.591667	17.591667
6	18	11.815556	.00000E0000	11.815556	11.815556

Szignifikáns differencia Scheffe szerint:

$$LSD_{5\%} = 0,296$$

## Gátló hatás összehasonlítása 5°C-on:

Egytényezős varianciaanalízis (6-6 párhuzamos adattal számolva):

One-Way Analysis of Variance

Data: K1TENY5.atm

Level codes: K1TENY5.kod

Labels:

Means plot: Scheffe      Confidence level: 95      Range test: Scheffe

### Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	32611.266	75	434.81688	279.659	.0000
Within groups	555.067	357	1.55481		
Total (corrected)	33166.333	432			

139 missing value(s) have been excluded.

Harmonikus átlag és maradék szórás:

$$h = 5,378$$

$$\text{mar. szórás} = 0,289$$

Négytényezős varianciaanalízis (a párhuzamosok átlagértékével számolva):

Analysis of Variance for K4TENY5.atl\_atm - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:K4TENY5.taptalaj	5.0323	1	5.0323		
B:K4TENY5.eleszto	11.5530	2	5.7765		
C:K4TENY5.konc	2090.0484	6	348.3414		
D:K4TENY5.ido	4487.1705	1	4487.1705		
INTERACTIONS					
AB	7.76182	2	3.880908		
AC	531.93573	6	88.655955		
AD	6.41867	1	6.418671		
BC	78.56679	12	6.547233		
BD	3.09780	2	1.548901		
CD	165.38008	6	27.563347		
ABC	34.86355	12	2.905296		
ABD	6.92055	2	3.460275		
ACD	115.58970	6	19.264949		
BCD	40.65340	12	3.387783		
ABCD	30.31778	12	2.526482		
RESIDUAL	.00000E0000	0	.00000E0000		
TOTAL (CORRECTED)	7615.3101	83			

28 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for K4TENY5.atl\_atm

Level	Count	95 Percent Confidence			
		Average	Std. Error	for mean	
GRAND MEAN	84	16.634762	.00000E0000	16.634762	16.634762
A:K4TENY5.taptalaj					
1	42	16.879524	.00000E0000	16.879524	16.879524
2	42	16.390000	.00000E0000	16.390000	16.390000
B:K4TENY5.eleszto					
2	28	16.296786	.00000E0000	16.296786	16.296786
3	28	16.456429	.00000E0000	16.456429	16.456429
4	28	17.151071	.00000E0000	17.151071	17.151071
C:K4TENY5.konc					
1	12	18.653333	.00000E0000	18.653333	18.653333
2	12	21.959167	.00000E0000	21.959167	21.959167
3	12	21.284167	.00000E0000	21.284167	21.284167
4	12	18.665000	.00000E0000	18.665000	18.665000
5	12	16.559167	.00000E0000	16.559167	16.559167
6	12	12.722500	.00000E0000	12.722500	12.722500

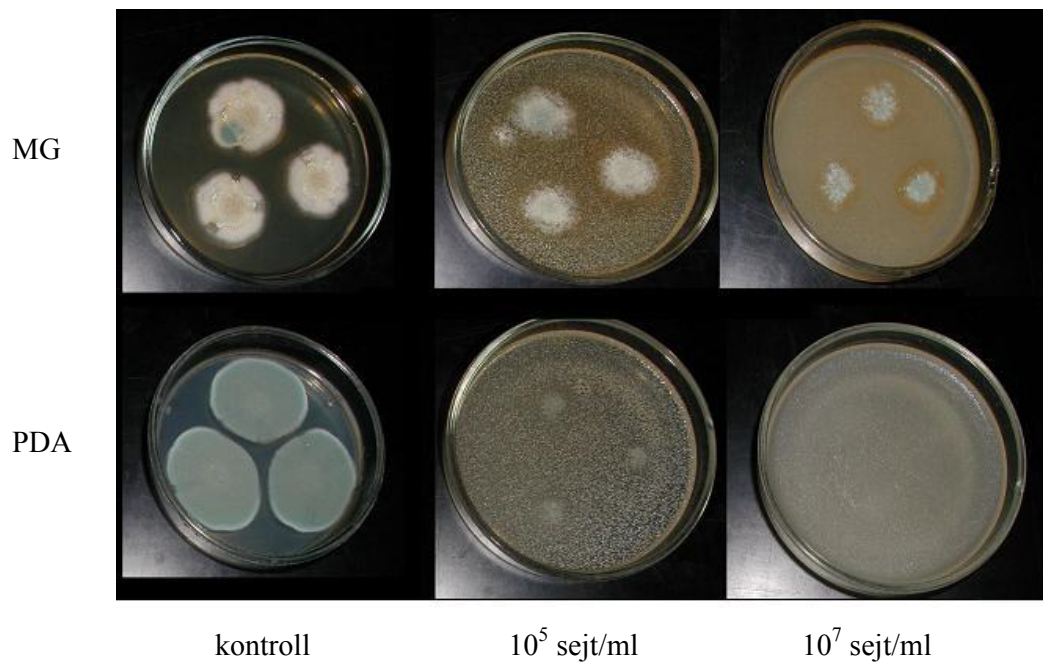
Szignifikáns differencia Scheffe szerint:

$$LSD_{5\%} = 0,358$$

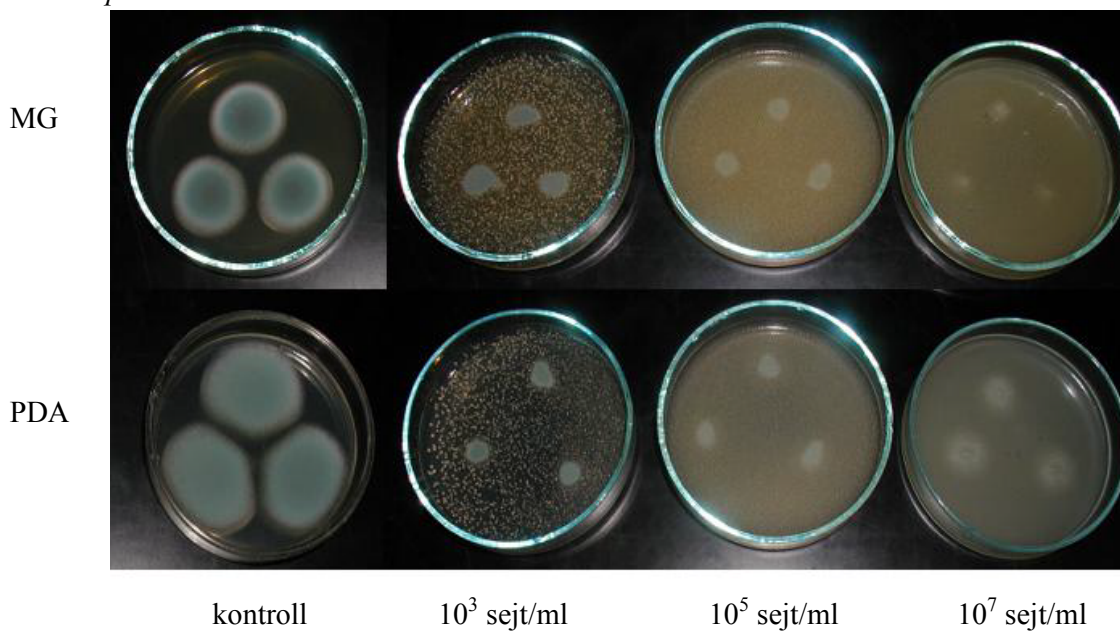
6. MELLÉKLET – ÉLESZTŐGOMBÁK GÁTÓ HATÉKONYSÁGA KÉPEKBEN

*Metschnikowia pulcherrima* Y00681

*P. expansum* F00811

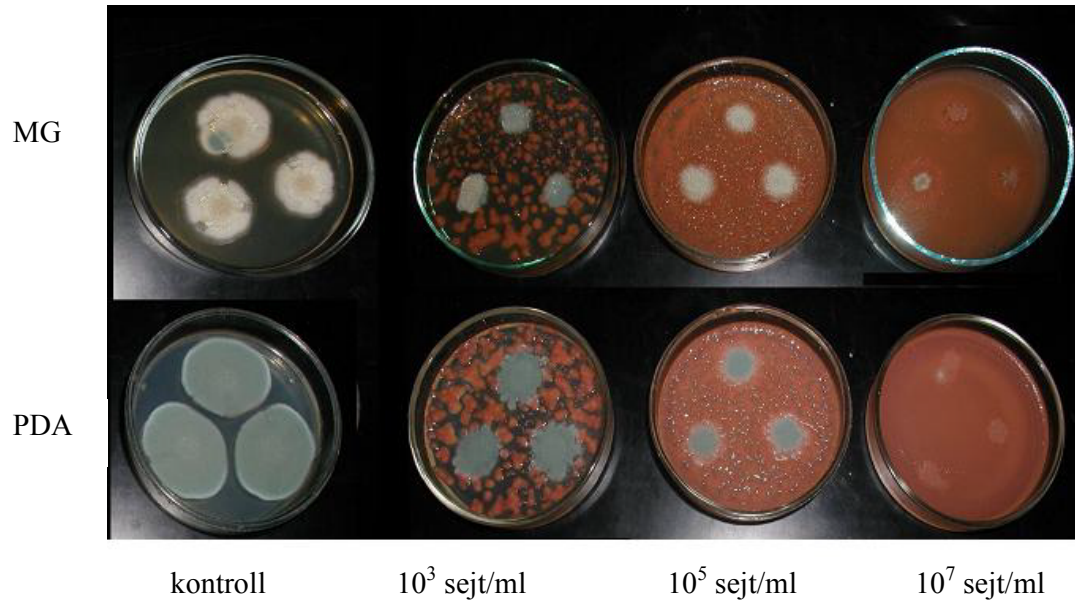


*P. expansum* F00601

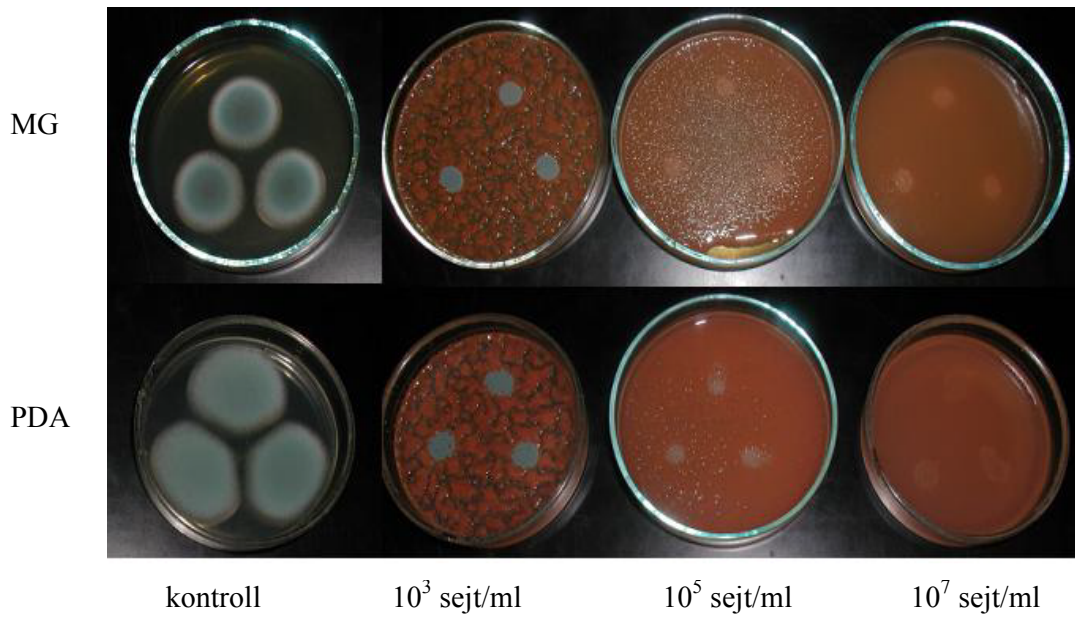


*Sporobolomyces roseus* Y00693

*P. expansum* F00811

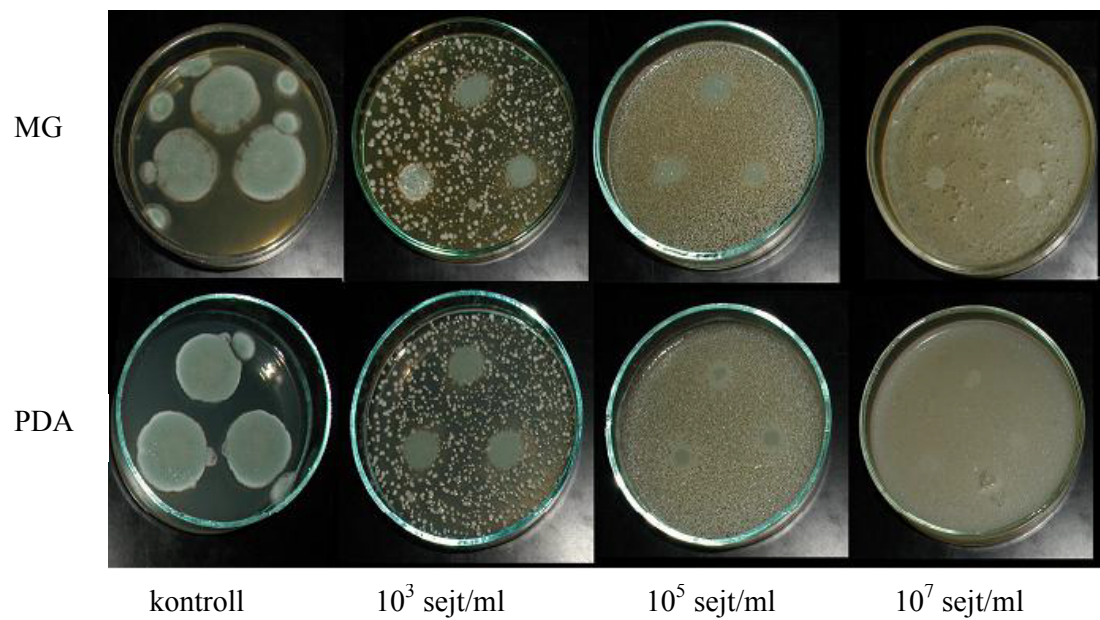


*P. expansum* F00601

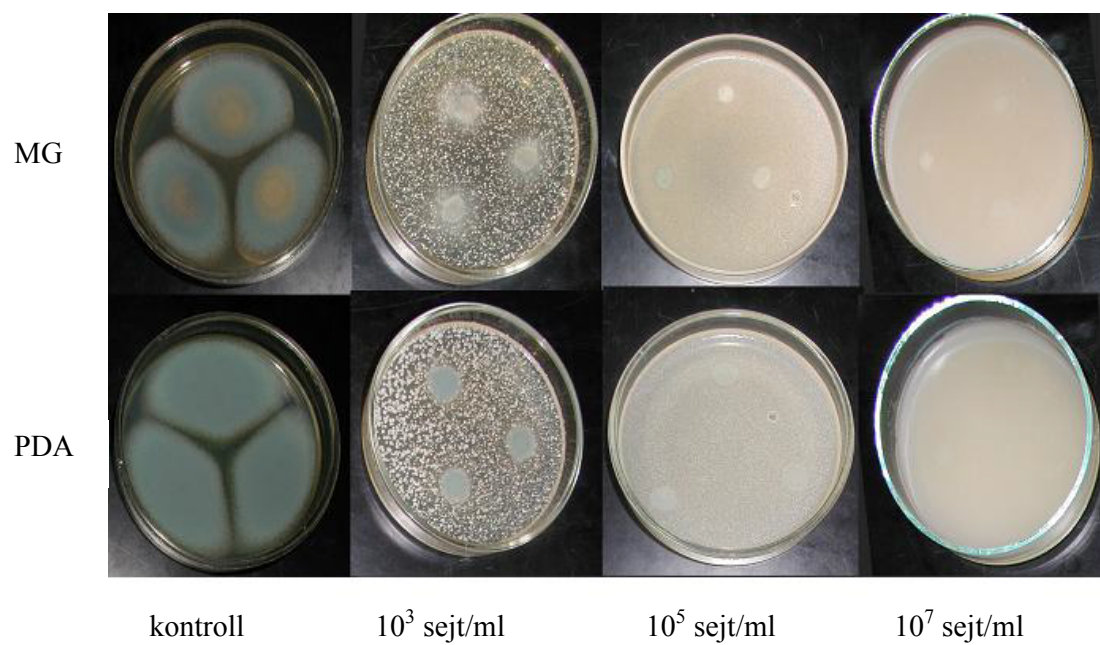


*Pichia anomala* J121

*P. expansum* F00811

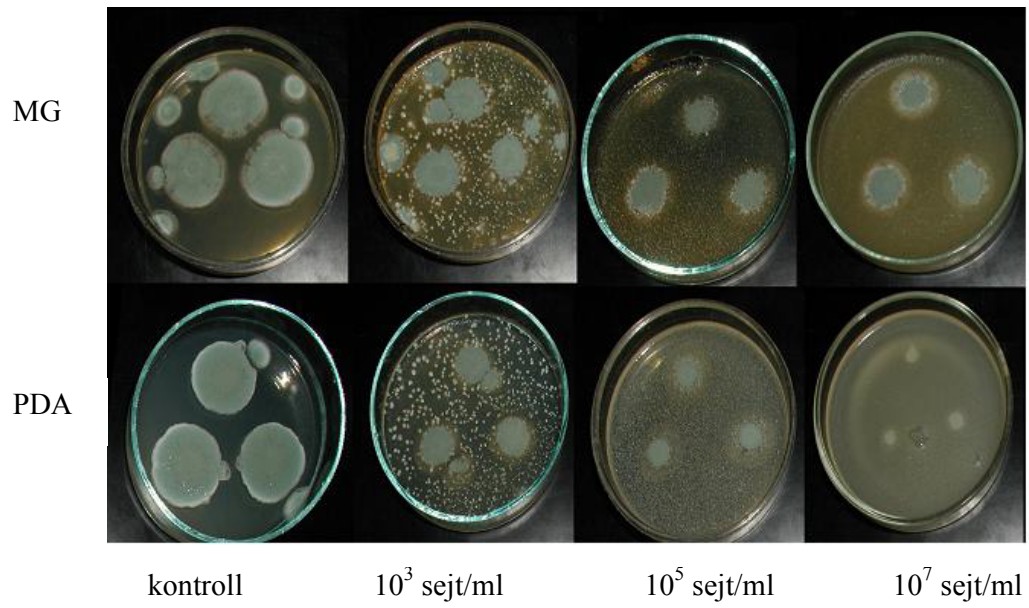


*P. expansum* F00601

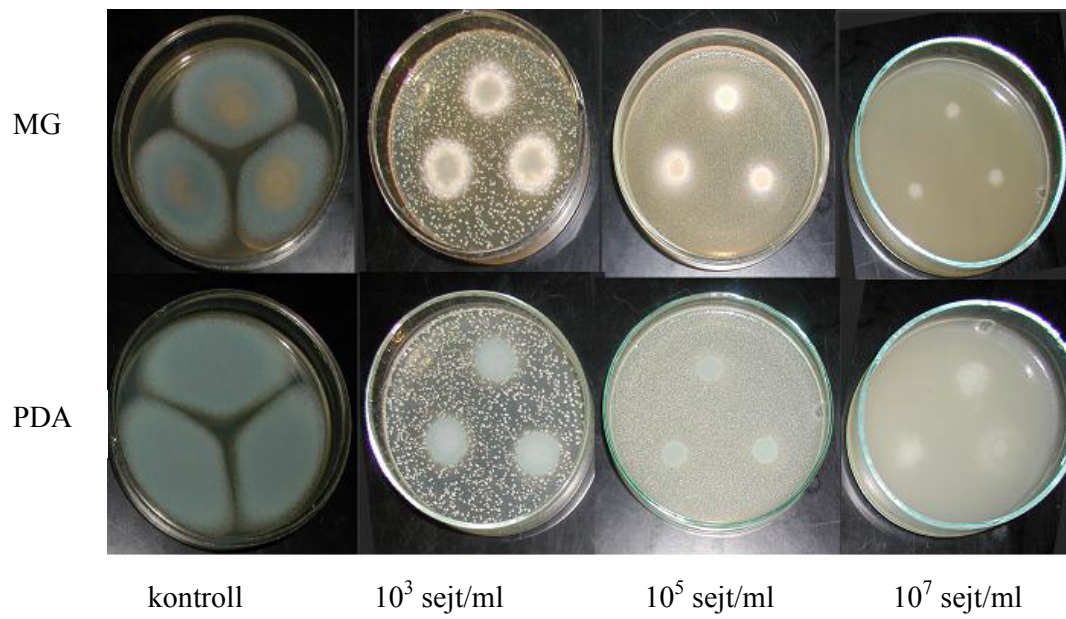


*Kluyveromyces lactis* Y00260

*P. expansum* F00811



*P. expansum* F00601





## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm két témavezetőmnek – Mohácsiné dr. Farkas Csillának és Dr. Balla Csabának – hogy mind emberileg, mind szakmailag támogattak. A velük való megbeszélések irányadóak voltak, sokszor mutattak rá újabb és újabb lehetőségekre munkámmal kapcsolatban, lendületet és kedvet adtak a folytatáshoz.

Köszönet illeti a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, valamint a Hűtő- és Állatitermék Technológia Tanszék munkatársait, akik sokszor hasznos tanáccsal, ötlettel láttak el, és akik nagyban hozzájárultak kísérleteim elvégzéséhez.

Szeretnék köszönetet mondani a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézetnek, ahol lehetőségem nyílt arra, hogy az értekezést elkészítsem.

Dr. Lelik Lászlónak a Központi Laboratórium vezetőjének a gázkromatográfiás vizsgálatokban, Horváth Orsolyának a Konzervipari Kutató-, Fejlesztő és Minőségvizsgáló Kht. Munkatársának a patulin kimutatásban, és Dr. Körmendy Lászlónak a statisztikai számításokban nyújtott segítségéért szeretném köszönetemet kinyilvánítani.

Köszönettel tartozom Dr. Paul Färbernek, a karlsruhei Bundesforschungsanstalt für Ernährung kutatójának, aki azontúl, hogy az ott eltöltött öt hónap alatt bevezetett az alapvető molekuláris biológiai ismeretekbe, újból és újból a munka elkészítésére ösztönzött.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom férjemnek és családomnak, azért, hogy mindvégig megfelelő háttérrel biztosítottak, biztattak, vagy egyszerűen meghallgattak, ha valamilyen problémám merült fel egy-egy kísérlettel kapcsolatban.