

EGY BIOKONTROLL KÉPESSÉGEKKEL RENDELKEZŐ *BACILLUS*
SUBTILIS TÖRZS ÖKOFIZIOLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE

DOKTORI ÉRTEKEZÉS
BENCSIK-BÓKA BETTINA

TÉMAVEZETŐ:
DR. MANCZINGER LÁSZLÓ
EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2019
SZEGED

Tartalomjegyzék

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2	BEVEZETÉS	9
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
3.1	A biológiai védekezés jelentősége	12
3.2	A dolgozatban vizsgált növény-, illetve gombapatogén kórokozók jellemzése	12
3.3	A dolgozatban vizsgált kémiai peszticidek, fémek és nehézfémek.....	19
3.4	A biológiai védekezés lehetőségei, biopeszticidek	20
3.5	A biológiai védekezés általános jellemzése	23
3.6	A <i>Bacillus</i> nemzetség általános jellemzése	24
3.7	A <i>Bac. subtilis</i> törzsek és az általuk termelt hatóanyagok szerepe a biológiai védekezésben.....	26
3.8	A <i>Bac. subtilis</i> által termelt antimikrobiális peptidok	27
3.8.1	<i>Bac. subtilis</i> által termelt peptid-termékek.....	27
3.8.1.1	Nem-riboszómális peptid-szintetáz (NRPS) termékek	27
3.8.1.1.1	Iturinok	27
3.8.1.1.2	Fengicinek	28
3.8.1.1.3	Szurfaktinok és homológ vegyületeik	28
3.8.1.1.4	Maltacinek	32
3.8.1.1.5	Egyéb, nem-riboszómális peptid-szintetáz termékek	32
3.8.1.2	Riboszómális szintézis útján létrejövő termékek	33
3.8.1.2.1	A típus: Szubtilin és ericin.....	33
3.8.1.2.2	B típus: Merzacidin	33
3.8.1.2.3	Szublancin és Szubtilozin A	34
3.8.1.3	Sejtfalbontó enzimek, proteázok.....	34
3.8.2	A <i>Bac. subtilis</i> által termelt nem-peptid antibiotikumok	35
3.9	<i>Bac. subtilis</i> -tartalmú biokontroll készítmények.....	35
3.10	Spontán sztreptomycin-rezisztens mutáns <i>Bac. subtilis</i> törzsek.....	36
4	CÉLKITŰZÉSEK	37
5	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	38
5.1	A kísérletek során felhasznált törzsek	38

5.2	Alkalmazott anyagok.....	38
5.2.1	A kísérletek során alkalmazott táptalajok	38
5.2.2	Alkalmazott tápoldatok	39
5.2.3	Reagensek, pufferek	39
5.2.3.1	Biokémiai reakciókhoz, valamint tenyésztésekhez alkalmazott reagensek és pufferek	39
5.2.3.2	Molekuláris vizsgálatok pufferei, reagensei	40
5.2.4	PCR-hez szükséges reagensek, primerek	40
5.2.5	Enzimvizsgálatokhoz alkalmazott szubsztrátok.....	42
5.2.6	Az analitikai vizsgálatokhoz alkalmazott vegyszerek.....	42
5.3	Alkalmazott módszerek.....	43
5.3.1	<i>Bacillus</i> törzsek izolálása, elővizsgálata, azonosítása	43
5.3.2	A <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J törzs ökofiziológia jellemzése.....	44
5.3.2.1	A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata különböző tápoldatokban	44
5.3.2.2	A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata eltérő hőmérsékleteken...	44
5.3.2.3	A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata különböző pH-értékeken	44
5.3.2.4	A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata különböző vízaktivitási értékeken	44
5.3.3	Különböző növénypatogén gombákkal, <i>Trichoderma</i> törzsekkel, mikotoxintermelő <i>Aspergillus</i> törzsekkel, növény- és gombapatogén baktériumokkal szembeni <i>in vitro</i> antagonizmus-tesztek.....	45
5.3.4	A törzs növény-gombapatogén baktériumok növekedésére gyakorolt hatása ...	46
5.3.5	A törzs sziderofórtermelésének, lipáz, kazeináz, zselatináz, kitináz aktivitásának és keményítóbontásának vizsgálata	47
5.3.6	Extracelluláris enzimek termelésének vizsgálata kromogén szubsztrátokkal....	48
5.3.7	Sztreptomicin-rezisztens törzsek izolálása, spontán sztreptomicin-rezisztens mutáns törzsek kimotripszin-típusú proteáz-termelésének vizsgálata, a törzsek <i>rpsL</i> génszekvenciáinak elemzése	49
5.3.8	Kimotripszin-típusú proteáz termelésének időbeni vizsgálata.....	50
5.3.9	Különböző szén-illetve nitrogénforrások hatása a kimotripszin-típusú proteáz termelésére.....	50
5.3.10	Növekedés- és enzimtermelés-optimalizálási kísérletek.....	50

5.3.11	Különböző fémek hatása a kimotripszin-típusú proteáz termelésére és aktivitására	53
5.3.12	Herbicidek és fungicidek hatása az enzimtermelésre és az enzimaktivitásra	54
5.3.13	A törzs fengicin- és bacilizin-termelésének vizsgálata bioteszttel.....	55
5.3.14	A <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J hemolitikus tulajdonságainak vizsgálata és a szurfaktintermelés vizsgálata direkt bioautográfias módszerrel.....	55
5.3.15	Antibiotikumok termelődéséért felelős gének azonosítása	56
5.3.16	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás vizsgálatok	57
5.3.17	A törzs teljes genomjának szekvenálása	58
5.3.18	Statisztikai analízis.....	59
6	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	60
6.1.1	<i>Bacillus</i> törzsek izolálása, elővizsgálata és azonosítása.....	60
6.2	A <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J törzs ökofiziológia jellemzése.....	61
6.2.1	A törzs növekedési tulajdonságai különböző tápoldatokban	61
6.2.2	A törzs növekedési tulajdonságai különböző hőmérséklet-, pH- és vízaktivitás-értékeken	62
6.3	A törzs különböző növénypatogén gombákkal, <i>Trichoderma</i> törzsekkel, mikotoxintermelő <i>Aspergillus</i> törzsekkel, növény-gomba patogén baktériumokkal szembeni <i>in vitro</i> antagonizmusa	64
6.4	A törzs növény-gomba patogén baktériumok növekedésére gyakorolt hatásának elemzése	72
6.5	A törzs sziderofórtermelésének, lipáz, kazeináz, zselatináz, kitináz aktivitásának és keményítőbontásának elemzése	75
6.6	A törzs extracelluláris enzimek termelésére való képességének kiértékelése.....	77
6.7	Sztreptomycin-rezisztens törzsek izolálása, spontán sztreptomycin-rezisztens mutáns törzsek kimotripszin-típusú proteáz termelése és <i>rpsL</i> génszekvenciái.....	78
6.8	Kimotripszin-típusú proteáz termelésének időbeni jellemzése.....	80
6.9	Különböző szén- illetve nitrogénforrások hatásának elemzése a kimotripszin-típusú proteáz termelésére.....	81
6.10	Növekedés és enzimtermelés optimalizálása	86
6.10.1	Glükóz, élesztőkivonat és a tenyésztési idő hatása a törzs növekedésére és kimotripszin-típusú proteáz-termelésére	86

6.10.2	Glükóz, nátrium-glutamát, valamint fémszulfátok hatása a törzs növekedésére és kimotripszin-típusú proteáz-termelésére	89
6.11	Különböző fémek hatásának jellemzése a kimotripszin-típusú proteáz termelésére és az enzimaktivitására	93
6.12	Herbicidek és fungicidek hatásának jellemzése az enzintermelésre és az enzimaktivitásra	96
6.13	A törzs fengicin- és bacilizin-termelésének jellemzése	101
6.14	<i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J hemolitikus tulajdonságainak és szurfaktintermelésének kiértékelése.....	104
6.15	Antibiotikumok (bacillomicin, fengicin, iturin, mikoszubtilin, szurfaktin) termelődéséért felelős gének azonosítása.....	106
6.16	A <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J törzs szurfaktin izoformái	107
6.16.1	Szurfaktin izoformák MS-vizsgálata.....	107
6.16.2	A keletkezett szurfaktin izoformák jellemzése	107
6.17	A törzs teljes genom szekvenciájának elemzése	109
6.17.1	A <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J törzs teljes genomjának fő tulajdonságai	109
6.17.2	A törzs pontos taxonómiai pozíciója.....	112
6.17.3	Egy nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNP-k) és deléció/inszerció polimorfizmusok (DIP).....	113
6.17.4	A <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J törzs genomjában található antibiotikum-klaszterek	113
6.17.5	Az <i>sfp</i> génben található DIP jelentősége.....	113
6.17.6	A <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J törzs genomjának összehasonlítása más <i>Bac. subtilis</i> csoportok genomjával.....	115
6.17.7	Mutációs forrópontok a <i>Bac. subtilis</i> SZMC 6179J törzs genomjában.....	116
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	121
8	SUMMARY	127
9	IRODALOMJEGYZÉK.....	132
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	148
11	MELLÉKLETEK	149

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4 D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
A	Adenozin
APPA	L-2-amino-5-foszfono-3-cisz-penténsav
ATCC	<i>American Type Culture Collection, USA</i>
ATP	Adenozin-trifoszfát
BCI	Biokontroll index
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citozin
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures, Hollandia</i>
CTP	Citozin-trifoszfát
DIP	<i>Deletion/insertion polymorphism</i> - deléció/inszerció polimorfizmus
DHT	<i>Double hydrogen transfer</i> - kettős hidrogén transzfer
DKP	Diketopiperazin
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DON	Deoxinivalenol, vomitoxin
dNTP	Dezoxi-nukleozid-trifoszfát
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,</i> Németország
DTNB	5,5-Ditio-bisz (2-nitrobenzoesav)
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav dinátrium sója
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> - Elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria
ESI-IT-MS	<i>Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry</i> - Elektroporlasztásos ionizációs ioncsapdás tömegspektrometria
FGSC	<i>F. graminearum</i> fajkomplex
FSSC	<i>F. solani</i> fajkomplex
G	Guanozin
GTP	Guanozin-trifoszfát
GTR	<i>General Time-Reversible</i>

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> - Nemzetközi Rákkutató Ügynökség
ICEBs1	<i>Integrative and Conjugative Elements B1, Conjugative Transposons B1</i> - Integratív és Konjugatív elemek B1
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> – belső átíródó elválasztó (szakasz)
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i> - Multilókusz szekvencia-tipizálás
MS	<i>Mass Spectrometry</i> - Tömegspektrometria
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> - Mágneses magrezonancia
NRPS	<i>Nonribosomal Peptide Synthetase</i> – nem-riboszómális peptid-szintetáz
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection, USA</i>
NTD	3,3'-Neotrehalóz-diamin
OD	Optikai denzitás
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - polimeráz láncreakció
pNA	Paranitroanilid
R _f	Retenciófaktor
RISA	<i>Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i> - Riboszómális intergénikus kitöltőszakasz-analízis
Rpm	Rotations per minute - fordulatszám
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - egy pontos nukleotid-polimorfizmus
SOLiD	<i>Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection</i> - szekvenálás oligonukleotid ligálással és detektálással
SZMC	<i>Szeged Microbiology Collection</i> – Szegedi Mikrobiológiai Gyűjtemény
T	Timidin
TAE	Trisz-ecetsav-dinátrium-EDTA
TE	Trisz-EDTA
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> - Vékonyréteg Kromatográfia
Tris	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
TTP	Timidin-trifoszfát

U	Unit
UV	Ultraibolya fény

2 BEVEZETÉS

A vírusok, baktériumok és gombák által okozott növényi, illetve gombabetegségek komoly károkat okozhatnak a mezőgazdaságban. A hazánkban is jelentős termés kiesést okozó növénypatogén baktériumok és gombák a következők: *Allorhizobium vitis*, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *panici*, *Pse. tolaasii*, *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Alternaria alternata*, *Alt. solani*, *Armillaria gallica*, *Arm. mellea*, *Arm. ostoyae*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris bicolor*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia spicifera*, *Fusarium culmorum*, *Fus. moniliforme*, *Fus. oxysporum* fajkomplex, *Fus. solani* fajkomplex, *Phoma cucurbitacearum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*. Mindezek mellett említést érdemelnek a mikotoxintermelő *Aspergillus* fajok is, melyek az emberi szervezetre is káros másodlagos anyagcsere-termékeik révén okozhatnak jelentős gondot. A hazai csiperke- és laskagomba-termesztésben főleg a *Trichoderma aggressivum*, *Tri. pleuroti* (korábban *Tri. pleurotum*) és *Tri. pleuroticola* fajok képesek károkat okozni. Fontos megjegyezni, hogy az Európai Unió nem engedélyezi a gombatermesztés során a kémiai peszticidek alkalmazását, így az alternatív védekezési stratégiák nagy jelentőséggel bírnak.

Napjainkban a legelterjedtebb és leghatékonyabb védekezési módszer a kémiai növényvédőszer használata. A kémiai peszticidek alkalmazása a XX. század közepe óta elterjedt, és használatuk azóta is növekvő tendenciát mutat. A magas felhasználási ráta számos problémát von maga után, úgymint a másodlagos kártevők megjelenése, rezisztencia kialakulása, környezeti terhelés, továbbá az emberi egészség veszélyeztetése. Éppen ezért már az 1920-as évek óta foglalkoztatja a kutatókat a patogén mikroorganizmusok biológiai védekezéssel történő visszaszorítása. Napjainkban egyre növekvő igény mutatkozik az alternatív, kémiai szermaradványok jelenlétét kiküszöbölő megoldások iránt. Az egyik ilyen fakultatív útvonal a biológiai védekezés alkalmazása.

A növénybiológiában biokontroll ágenseknek nevezik azokat a mikroorganizmusokat, melyek képesek a kártevőket elnyomni. A biológiai védekezés céljaira a mikroorganizmusokon túl az általuk termelt vegyületeket is fel lehet használni. A fertőzés csökkentése történhet direkt, indirekt, valamint kevert antagonizmus révén. Direkt antagonizmusról hiperparazitizmus és predáció esetén beszélhetünk, míg kevert antagonizmus esetében antibiotikumok, lítikus enzimek, melléktermékek termelése, illetve fizikai, kémiai zavarás révén valósul meg a

biológiai védekezés. Az indirekt antagonizmus során kompetíció és a gazda rezisztenciájának indukciója okozza a patogén visszaszorítását.

Biokontroll ágensekre a vírusok, a baktériumok és a gombák között is számos példát találunk. Vírusok közül a bakteriofágok, illetve a mikovírusok tekinthetők sikeres antagonistáknak. Gombák közül a legismertebbek a számos, kereskedelemben kapható készítmény alapjait képező *Trichoderma* nemzetség tagjai, különös tekintettel a *Trichoderma harzianum* fajkomplex képviselőire, valamint a *Tri. asperellum*, *Tri. viride* és *Tri. virens* fajokra.

A Gram-negatív baktériumok közé tartozó *Pseudomonas fluorescens* csoport tagjai nagyon jó kompetíciós képességekkel rendelkeznek, mely extracelluláris enzimek, antibiotikumok és sziderofórok termelésének köszönhető. Mindemellett a biokontrollban szerepet játszó fajok képesek a termesztett gomba és a növény növekedésének serkentésére is.

A *Bacillus* nemzetség spóráképzése nagy előnyt jelent a biológiai védekezés során. Kedvezőtlen körülmények között biztosítja a baktérium túlélését, továbbá nagymértékben megkönnyíti a mikrobiális peszticidek formulázását is. A *Bac. thuringiensis* és az általa termelt toxin kulcsfontosságú bioinszekticid. A *Bac. subtilis* a mezőgazdaságban, az élelmiszeriparban és a gyógyászatban is fontos szerepet tölt be extracelluláris enzimek (proteáz, kitináz, lipáz, celluláz) és antibiotikumok termelése révén.

A *Bac. subtilis* genomjának 4-5%-a antibiotikum-szintézisért felelős géneket kódol és ezáltal képes több mint két tucat, strukturálisan diverz antimikrobiális vegyület termelésére. A három leginkább tanulmányozott, nem-riboszómális peptidszintézis útján létrejövő ciklikus lipopeptid családot a szurfaktinok, az iturinok és a fengicinek alkotják.

A fengicin család tagjai ciklikus lipodekapeptidek, melyek peptidrésze 10 aminosavból áll, míg a kapcsolódó szénlánc hossza C14-C18 között változik. Erős felületaktív tulajdonságokkal és széles spektrumú antifungális hatással rendelkeznek.

Az iturinok 7 fő variánsa az iturin A és C, a bacillomicin D, F, L és LC, valamint a mikoszubtilin. Ezen vegyületek 7 aminosavból álló, ciklikus peptidgyűrűt és egy zsírsavláncot tartalmaznak. Az iturin esetében a zsírsavlánc hosszúsága C14-től C17-ig változik. Erős *in vitro* antifungális aktivitásuk ismert élesztőkre illetve fonalas gombákra, de csak korlátozott antibakteriális hatással rendelkeznek, míg antivirális hatásukat napjainkig nem dokumentálták.

A szurfaktin család tagjai heptapeptidek, melyek béta-hidroxi-zsírsavval ciklikus laktongyűrűt hoznak létre. Hemolitikus, antivirális, antimikoplazmatikus és antibakteriális tulajdonsággal rendelkeznek, antifungális aktivitásuk azonban nem ismert. Ezen ciklikus

lipopeptidek előnyös tulajdonságait nemcsak a mezőgazdaság, de a gyógyszer- és élelmiszeripar is kihasználja. Kulcsszerepük a biofilmképzésben bizonyított, illetve antibiofilm-ágensként is hasznosíthatóak, amely az élelmiszerek tartósítása során nagy előny.

A szurfaktinok gyulladáscsökkentő hatása a foszfolipáz A2 gátlása révén valósul meg. Tumorellenes aktivitásukat jól szemlélteti az Ehrlich Ascites karcinóma sejteken kifejtett antiproliferatív hatás. A szurfaktinok trombolitikus terápiás szerként történő alkalmazása is kutatott tüdő-, szívizom- és agyi rendellenességek esetén.

Mindezek mellett a *Bac. subtilis* szerepet játszik a növényi növekedés serkentésében, valamint a növényi rezisztencia indukciójában is.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A biológiai védekezés jelentősége

A XXI. században az emberi népesség növekedése miatt különösen fontos a haszonnövényekre, illetve termesztett gombákra patogén szervezetek elleni védekezés. A mezőgazdaságban károkat okozó növény-, illetve gombapatogén mikroorganizmusok ellen bevált módszer a hagyományos növényvédő szerek használata (Pal és Gardener 2006). A kémiai anyagokat tartalmazó szerek minőségi és mennyiségi javulást eredményeznek a terményekben, azonban jelentős környezeti terhelést vonnak maguk után, éppen ezért napjainkban egyre növekvő igény mutatkozik a kémiai szermaradványokat nem tartalmazó, alternatív, hatékony növényvédőszerek iránt (Pal és Gardener 2006).

3.2 A dolgozatban vizsgált növény-, illetve gombapatogén kórokozók jellemzése

A mezőgazdaságban kórokozóként jelentkező baktériumok közül hazánkban az 1960-as évektől okoz igazán gondot a *Clavibacter michiganensis* (Actinobacteria, Actinomycetales), egy aerob, Gram-pozitív növénypatogén baktériumfaj, mely elsősorban a paradicsom és a burgonya megbetegedését okozza. A *Cla. michiganensis* subsp. *michiganensis* paradicsomon okoz klavibakteres megbetegedéseket, melyek legjellemzőbb tünete az alsó leveleken induló hervadás, ami később átterjed az egész növényre. A száron, levélnyélen megnyúlt hosszanti, barnás csíkok jelennek meg, a belső szövetek pedig üregekké válnak. A terméseken barnás, fehér gyűrűvel körbevett foltok jelzik a kórokozót (Gartemann és mtsai. 2003).

A *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Proteobacteria, Xanthomonadales) paradicsomot, paprikát és keresztesvirágúakat fertőző, pálcika alakú, Gram-negatív, aerob baktérium. Első tünetként a növény levelén jelennek meg apró, vizenyős, világos-sötét zöld foltok, melyek aztán gyorsan 0,2 cm átmérőjű fekete sárga udvarral rendelkező léziókká fejlődnek. Végző stádiumban a levél teljes beburnulása és lehullása következik. Ezt követően a tünetek az egész növényre átterjednek. A termésen hasonló foltok jelennek meg, amik bár nem hatolnak mélyre, nagy számuk viszont jelentősen rontja a termés minőségét (Sun és mtsai. 2002).

A gyümölcstermesztők számára világszerte jelentős gondot okozó, pálcika alakú, Gram-negatív baktérium, a *Pseudomonas syringae* (Proteobacteria, Pseudomonadales) az idősebb és fiatalabb fákat egyaránt megtámadja. A *Pse. syringae* és rokon fajai rendkívül széles gazdaspecificitásúak, képesek egyszikűeket, valamint lágym-, illetve fásszárú kétszikűeket is

megtámadni, és a felületi sebeken keresztül a fa- és hánccszöveteket, illetve a kambiumot fertőzni. A fajra jellemző jégmagképző fehérjék a baktériumsejt külső membránján aggregátumokat képeznek, melyek szerepet játszanak a sejtközötti térben történő jégkristályok képződésében. Csökkentik a fagyűrést, ezáltal fokozzák a fagykárokat a növényben. A termésmennyiség csökkenésén túl a fa növekedését is hátráltatják (Kennelly és mtsai. 2007).

A *Pseudomonas tolaasii* a gombatermesztésben világszerte jelentős károkat okozó Gram-negatív, aerob baktérium, mely a csiperkegombát (*Agaricus bisporus*), a laskagombát (*Pleurotus ostreatus*) és a shii-take-t (*Lentinula edodes*) is képes megfertőzni. A már kialakult termőtesteken tipikus baktériumos foltosodás figyelhető meg. A *Pse. tolaasii* laskagomba esetében sárgulást (Bessette és mtsai. 1985), csiperkegombán barnulást (Lee és mtsai. 2002), ritkább esetben abnormális növekedést idéz elő. A tolaasin nevű toxin a plazmamembránon pórusokat hoz létre, mely a gombasejtek pusztulásához vezet (Rainey és mtsai. 1992). A csiperkegomba esetében a barnulás a megtámadott gombaszövet autoenzimatikus aktivitásának következménye. Soler-Rivas és munkatársai (1999) számoltak be arról, hogy a barnulási folyamatot az *Aga. bisporus* tirozinázainak aktiválódása váltja ki, jelentős termésromlást idézve elő ezáltal.

Az anaerob, talajlakó *Agrobacterium tumefaciens* – újabb nevén *Rhizobium radiobacter* – és *Agrobacterium vitis* – újabb nevén *Allorhizobium vitis* (Proteobacteria, Rhizobiales) (Young és mtsai. 2001) – széles gazdaspecificitásúak, számos fásszárú növényt (almafa, bogyósok, csonthéjasok, héjasok, díszfák) megfertőznek, sőt lágyszárúakon (napraforgón, dálián, muskátlin) is képesek tüneteket okozni. A kórokozó sebeken keresztül képes fertőzni, egyik nagy előnye, hogy a szétesett golyvákban a baktérium a talajba jutva sokáig fertőzőképes marad. A sérült növényi részeken keresztül különböző fenolvegyületek szabadulnak fel, bekapcsolva ezzel a baktérium plazmidján (tumorindukáló – Ti-plazmid) elhelyezkedő virulencia-géneket. Ezen plazmid egy kisebb szakasza, a növényi sejtek korlátlan osztódását biztosító és az opinok szintéziséért felelős géneket hordozó T-DNS fragmens jut be a növényi sejtekbe. A növényi sejtek által termelt opinokat a baktérium szén-, nitrogén- és aminosavforrásként hasznosítja. A gyökéren és a gyökérnyakon létrejövő, kezdetben apró golyvák idővel elfásodó, széteső daganatokká fejlődnek (Hwang és mtsai. 2015).

Az egyik legismertebb, paradicsomot és burgonyát fertőző, járványos gombabetegséget az Oomycota törzs *Peronosporales* rendjébe tartozó *Phytophthora infestans* okozza. A burgonya-, illetve paradicsomvésznek is nevezett betegség terjedését a hideg, esős időszak nagymértékben elősegíti. Elsőként a leveleken jelennek meg a tünetek sárguló, majd

szürkésbarna foltok formájában. Ezt követően a levelek elszáradnak, illetve a levélnyélen, száron is megjelennek a nagy, barnásfekete foltok. A sporangiumok a talajba jutva képesek a burgonyagumót is megfertőzni, szürkés foltokat okozva, mely aztán a tárolás során a gumók rothadását idézi elő. A paradicsombogyók fertőzése során a barna foltosodás a bogyó húzába is bejutva teszi azt emberi fogyasztásra alkalmatlanná (Nelson 2008).

Az *Aspergillus* fajokra (Ascomycota, Eurotiales) jellemző a fonalagombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, a mikotoxinok termelése, melyek az emberi és állati szervezetet károsítják. Betakarítás előtt kukoricát, földimogyorót, gyapotot fertőznek, de betakarítás után is képesek károkat okozni gabonaféléken, fügén, pisztácián, kávéban, fűszereken, kakaóbabon, mazsolán, hagymán (Varga és mtsai. 2009). Az *Asp. awamori* és az *Asp. niger* a feketepeneszes rothadás okozói. Varga és munkatársai (2012) magyarországi hagymaminták *Asp. awamori* által okozott fumonizin-fertőzöttségéről számoltak be, illetve bizonyították az *Asp. niger* fumonizin B₂- és ochratoxintermelő képességét is. Gazdaságilag fontos mikotoxintermelő *Aspergillus* faj még a májrák kialakulásában szerepet játszó aflatoxint termelő *Asp. flavus*. Hazánkban is számos esetben izolálták különböző mezőgazdasági növényekről ezt a toxintermelő gombát, bár a hazai éghajlati viszonyok a faj toxintermelésének nem kedveznek (Varga és mtsai. 2009).

A gombatermesztésben jelentős problémát okoz a *Trichoderma* nemzetség (Ascomycota, Hypocreales) képviselői által okozott zöldpenészes megbetegedés. Világszerte a három, kereskedelmileg kiemelten fontos bazídiumos gombát, a csiperkét, a laskagombát és a shii-take-t is képesek megfertőzni. A patogén zöldpenészesek képesek a termesztési alapanyagon növekedni, akadályozva a termőtestek növekedését, súlyosabb esetekben azok kifejlődését, jelentős termés kiesést okozva ezáltal. A csiperkegomba termesztésében főleg a *Tri. aggressivum* faj változatai, a *Tri. aggressivum* f. *aggressivum* és a *Tri. aggressivum* f. *europaeum* képesek károkat okozni (Samuels és mtsai. 2002). Kredics és munkatársai (2009) hazai és romániai laskagomba-termesztésben fellépett zöldpenészes fertőzések okozóiként a *Tri. pleuroti* és a *Tri. pleurotica* fajokat írták le, és megállapították, hogy ezen *Trichoderma* fajok hőmérséklet-és pH optimuma széles skálán mozog, kiváló antagonistákkal rendelkezik, proteáz, glukanáz, lipáz és kitináz enzimek termelésére képesek, jelentősen nehezítve az ellenük történő védekezést. Hatvani és munkatársai (2012) elsőként mutatták ki horvátországi csiperkekomposzt-mintákból a *Tri. harzianum* jelenlétét.

A *Fusarium graminearum* fajkomplexumba (FGSC, Ascomycota, Hypocreales) tartozó *Fusarium culmorum* (O'Donnell és mtsai. 2000a) apró szemű gabonaféléket, főként búzát és

árpát fertőz, de nagy károkat képes okozni zabon, rozson, kukoricán, cirokon és egyéb fűféléken is, ahol szár- és gyökérkorhadást idéz elő (Scherm és mtsai. 2013). Barna elszíneződés jelenik meg a gyökéren és a száron, míg az alsóbb internódiumokon megjelenik a gomba rózsaszínes-lilás szövedéke. Az egyik legsúlyosabb tünete a csőpenészedés. A beteg szemekből növő csíranövények elpusztulnak. Két kemotípusba tartozó trichotecének, az I. csoportba tartozó deoxinivalenol (DON) és annak acetilált származékai, a 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) és 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON), illetve a II. csoportba tartozó nivalenol (NIV) és fuzarenon-X (FUS) termelésére képesek (Sherm és mtsai. 2013).

Magyarországon a *Fus. culmorum* mellett a *Fus. graminearum* (FGSC) a leginkább elterjedt a fuzáriumos betegségeket okozó gombák között. Az *Ascomycota* törzs *Hypocreales* rendjébe tartozó *Fus. graminearum* egy nagyon destruktív patogén, mely főleg gabonaféléken fordul elő, számos esetben más *Fusarium* fajokkal együtt fertőz. A legnagyobb gazdasági veszteségeket a virágok megfertőzése révén idézi elő. Ez a patogén mikotoxinnal fertőzött gabonát eredményez így elsősorban a gabona minőségi – és nem mennyiségi – romlásához járul hozzá (Dean és mtsai. 2012). Ha a tárolás során a szennyezett gabona nedves környezetbe kerül, a fertőző ágens tovább növekszik, és a mikotoxinszint is emelkedik (Magan és mtsai. 2010). A mikotoxinnal fertőzött gabona emberi fogyasztásra és állati takarmányozásra egyaránt alkalmatlan. A *Fus. graminearum* számos trichotecént termel, a legfontosabbak a DON, az acetilált DON-származékok, a nivalenol és a zearalenon (Varga és mtsai. 2009). A DON gátolja a fehérjeszintézist és megzavarja a sejt proliferációját, sejthalálhoz vezetve. A különböző izolátumok (kemotípusok) mikotoxin-profilja eltérő lehet (Alexander és mtsai. 2011).

A *Fus. moniliforme* (*Fusarium fujikuroi* fajkomplexum - FFSC, korábban *Gibberella fujikuroi* fajkomplexum - GFSC) termesztett gabonaféléket (pl. búzát, kukoricát) és egyéb fűféléket fertőz (O'Donnell és mtsai. 2000b). Tünetei törzsenként eltérőek lehetnek, egyes törzsek kukoricamagon, gyökéren, száron okoznak rothadást (Kommedahl és mtsai. 1979, Kommedahl és mtsai. 1981), míg mások a kukoricánövénny reproduktív és vegetatív struktúráin tünetek kialakulása nélkül kolonizálnak (Bacon és mtsai. 1992, Leslie és mtsai. 1990, Koehler 1942). Számos toxint termel, köztük fuzáriumsavat, fuzarint, gibberellineket, moniliformint és fumonizineket (Nelson 1992).

A *Fus. oxysporum* fajkomplexum (FSSC, Baayen és mtsai. 2000) széles gazdaspecificitású, különböző képviselői súlyos veszteségeket képesek okozni több mint 100 különböző növényfajon, mint például paradicsomon, dinnyén, banánon vagy gyapoton. Ezek a talajban élő patogének vaszkuláris hervadást okoznak a megtámadott gazdanövényen. A

fertőzés jellegzetes tünetei a vaszkuláris barnulás, a levélepinasztia, a progresszív hervadás, a csökkent növekedés, illetve a lombvesztés, melyet a növény pusztulása követ (Agrios 2005). Ez a növénypatogén csoport fumonizin C termelésére képes, valamint immunszupresszált betegekben invazív fertőzések okozója lehet (Nucci és Anaissie 2007, O'Donnell és mtsai. 2004)

A *Fus. solani* fajkomplexum (FSSC) képviselői a FGSC-hez hasonlóan trichotecéntermelő fonalagombák (O'Donnell és mtsai. 2008), melyek a fuzárium mikotoxikózisok számos tünete révén (a nyálkahártya hiperémiája, hasmenés, gasztroenteritisz, anginás rohamok, vérzések, fulladás) immunszupresszált állapothoz vezetnek. Számos terményen okoznak hervadásos tüneteket és rothadást, köztük *Cucurbita* fajokon (Hawthorne és mtsai. 1992), *Pisum sativum*-on (van Etten 1978) és *Phaseolus vulgaris*-on (Li és mtsai. 1995).

A *Botrytis cinerea* (Ascomycota, Helotiales) az egyik legismertebb, széles gazdaspecifitású növénypatogén gomba, mely a szürkepenész kialakulásához vezet. Betakarítást követően is hatalmas károkat képes okozni számos zöldségen, gyümölcsön (Coates és mtsai. 1997). A mérsékelt és szubtrópusi régiókban egyaránt felbukkanó kórokozó több mint 200, főleg kétszikű növényfajt képes megtámadni, de a legnagyobb károkat káposztán, salátán, brokkolin, babon, szőlőn, epren, málnán és szedren okozza (Williamson és mtsai. 2007). A *Bot. cinerea* számos tünet kialakulásáért felel, melyek megnyilvánulása növényenként eltérő. A legjellemzőbb a rothadás, melyet a gomba szürke konídiumtömegeinek megjelenése követ a leveleken és a terméseken (Williamson és mtsai. 2007). A gomba több sejtfalbontó enzimet termel, melyek a virulenciában töltenek be fontos szerepet. Endo-poligalakturonázt (Have és mtsai. 1998, Kars és mtsai. 2005), endo- β -1,4-xilanázt (Brito és mtsai. 2006), szuperoxid-dizmutázt (Rolke és mtsai. 2004), botrydial nevű toxint (Colmenares és mtsai. 2002) és egyéb alacsony molekulatömegű vegyületeket, mint például oxálsavat termelhet, melyet *in vitro* (Germeier és mtsai. 1994) illetve *in planta* is képes előállítani (Verhoeff és mtsai. 1988).

A *Sclerotinia sclerotiorum* (Ascomycota, Helotiales) az egyik leginkább ismert aspecifikus növénypatogén, mely fehérpenészes rothadást okoz. Világszerte több mint 400 növényfajt, köztük haszon-, illetve gyomnövényeket is megfertőz. Olyan kétszikű növényekre jelent veszélyt, mint a napraforgó, szója, repce, ehető szárazbab, csicseriborsó, mogyoró, szárazborsó, valamint lencse. Egyszikűek közül célpontja lehet a hagyma vagy akár a tulipán is (Boland és Hall 1994). A fertőzés első jelei sötét léziók, melyek megjelenését a szár vizenyössé válása követi. Ezek a léziók gyakran elhalt szövetekké fejlődnek, melyeket fehér,

vattaszerű micélium boríthat. A szár belsejében a fehér micéliumszövedék mellett megjelennek a fekete szkleróciumok is (Bolton és mtsai. 2006). A *Scl. sclerotiorum* számos sejtfalbontó enzimet termel, többek között pektinázt, β -1,3-glukanázt, β -glükozidázt, cellulázt, xilanázt és kutinázt (Annis és mtsai. 1997). Fontos megjegyezni, hogy az oxálsav termelése is jelentős szerepet játszik a fertőzés sikerében (Bolton és mtsai. 2006).

Az *Alternaria* nemzetség (Ascomycota, Pleosporales) képviselői világszerte számos gyümölcsfa, illetve zöldségféle levelén okoznak úgynevezett alternáriás szárazfoltosságot. Nemcsak a betakarítás előtt, de utána is képesek a terméseket megfertőzni, tönkretenni (Coates és mtsai. 1997). Mindezek mellett humán felső légúti megbetegedésekben, illetve asztmás tünetek kialakulásában is szerepet játszanak (Kurup és mtsai. 2000). Ma már több mint 30-féle *Alternaria* toxint ismerünk, melyek szerkezetileg és szintézisükben is eltérnek egymástól. Fő toxintermelő az *Alt. alternata*, mely alternariolt, alternariol-monometilétert és altenuiszolt is termel. A másik jelentős alternáriás betegség okozója az *Alt. solani*, mely számos ország burgonya- illetve paradicsom-állományát csökkenti, szélsőséges esetekben a burgonyaültetvények akár 80%-át is képes károsítani (Horsfield és mtsai. 2010). Első tünetként a leveleken barna, száraz foltok jelennek meg, melyek később a levelek teljes elszáradásához vezetnek. A terméseken szintén nagy, barna foltok jelzik a patogént, a héj alatt a szövetek feketék, korhadtak.

A *Bipolaris* nemzetség (Ascomycota, Pleosporales) tagjai között számos növénypatogén törzs található. Az általuk okozott megbetegedések elsősorban a *Poaceae* család képviselőit, pl. a rizst, kukoricát, búzát és számos más haszonnövényt érintik. A jellemző tünetek között említhető a levélfoltosság, a levélszáradás, valamint a gyökér- és szárrothadás (Ellis és mtsai. 1971, Berbee és mtsai. 1999, Sivanesan 1985).

A *Bip. bicolor* (Mitra) Shoemaker 1959 (korábban *Cochliobolus bicolor* Paul és Parbery 1966 nevezéktana alapján) főleg a melegebb területeket, trópusi régiókat kedveli. Elsősorban fűféléket fertőz, de számolták már be tölgyfán okozott károkról is (Mena-Portales és mtsai. 1995, Farr és Rossman 2013). Valószínűsítik, hogy a vetőmaggal terjed (Lau és Sheridan 1975, Wu 1983, Richardson 1990). A búzanövény rothadását és *Pennisetum* fajok levélfoltosságát (Sivanesan 1987) is okozhatja. Miyagawa és munkatársai (1994) a *Bip. bicolor* El-I törzséből 4 fitotoxikus komponenst írtak le, a cochlioquinone A-t, a cochlioquinone B-t, a stemphone-t és az isocochlioquinone A-t. Kísérleteikben mind a négy vegyület gátolta a rizs- és a kölespalánták gyökerének növekedését.

A *Curvularia spicifera* (Ascomycota, Pleosporales, korábban *Bipolaris spicifera*/*Cochliobolus spicifer* Nelson) (Manamgoda és mtsai. 2012) szintén gyökérrohadást és levélfoltosságot okozó patogén, mely spiciferon nevű fitotoxinokat termel (Nakajima és mtsai. 1989, 1991).

A *Phoma cucurbitacearum* (Ascomycota, Pleosporales) főleg kabakos növényeket, uborkát, sárgadinnyét, görögdinnyét, sütőtököt, és egyéb vad tökféléket fertőz (Sitterly és Keinath 1996). A növény föld feletti összes vegetatív és reprodukív részét képes megtámadni (Chester 1891, Keinath 2011). A betegség fő tünete a leveleken megjelenő barnás foltok, melyek átterjednek a levélnyélre, kocsányra, szárra, majd azok vízzel telítődnek, üszkösödnek és elrohadnak (Keinath 2013). Ezen növénypatogén gomba számos sejtfalbontó enzimet termel, közülük a legjelentősebb a poligalakturonáz (Zitter 1996).

A *Colletotrichum* (Ascomycota, Glomerellales) egyike a legismertebb növénypatogén gombanemzetségeknek. Avokádó, alma, mandula, paprika, áfonya, mangó, papaya, citrus, dísnövények és számos más növény kórokozója a *Col. gloeosporioides*. A növények föld feletti részein sötét léziókat okoz, melyek aztán a növényi szövetek elhalásához vezetnek, a betakarítást követően pedig rohadást idéz elő (Dean és mtsai. 2012). A biotróf és nekrotrof szakaszból álló fertőzés során a gomba apresszóriumok segítségével behatol a gazdaszervezetbe, majd fertőzési hólyagok jönnek létre és elsődleges gombafonalak jelennek meg. A nekrozis során a létrejövő másodlagos gombafonalak elterjednek és a sejtek pusztulását okozzák (Munch és mtsai. 2008).

A *Rhizoctonia solani* (Basidiomycota, Cantharellales) széles gazdaspecificitású növénypatogén gomba. Gazdasági szempontból jelentős növények mellett dísz-, illetve erdei növényeket is képes megfertőzni. Egyik legismertebb célpontja a burgonya, de a cukorrépat, gabonaféléket, dinnyét, fejes salátát és a babot is megtámadja (González García és mtsai. 2006). Palántadőlést okoz, melynek első tünetei a fekete léziók megjelenése a gyökéren, száron, magokon. A fertőzés során a gomba penetrációját és kolonizációját számos általa termelt extracelluláris enzim teszi lehetővé, többek között a fertőzés korai szakaszában megjelenő pektin- és cellulózbontó enzimek. A fertőzés későbbi szakaszában pedig az endopektin-liáz felel a növényi szövet degradációjáért.

A bazídiumos gombák közül az egyik legjelentősebb a világszerte erdőpusztulásokat okozó tuskógomba, az *Armillaria* (Basidiomycota, Agaricales). A világ minden részén a mérsékelt, a boreális és a trópusi éghajlaton is képes gyümölcsfákat (citrus-, alma-, mandula-, cseresznye-, meggy- és szilvafákat), csonthéjasokat, szálfákat, fenyőket megtámadni,

gyökérrothadást okozni. A legvirulensebb fajai az *Arm. mellea*, *Arm. ostoyae* és az *Arm. luteobubalina* (Baumgartner és mtsai. 2011). Képesek a fertőzött fák eltávolítása után akár évekig az ott maradt gyökereken túlélni és újból fertőzni. A fertőzés során rizomorfákat képeznek, melyek mechanikai erőt és extracelluláris enzimeket alkalmaznak a gyökérbe való behatolásra. A micélium a kambiumba jutva elpusztítja a szöveteket és a tápanyagokat hasznosítja. A fertőzött gyökerekben fehér, vastag micéliumtömeget képeznek. További tünetek is jelzik a gomba kártételét: csökkent lombozat, hervadás, idő előtti lombhullás, csonka hajtások, hiányos termések. A gazda halálát követően az *Armillaria* parazita életmódról szaprofita életmódra vált és a rizoszférában perzisztál (Baumgartner és mtsai. 2011).

3.3 A dolgozatban vizsgált kémiai peszticidek, fémek és nehézfémek

A 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (2,4 D) az egyik legrégebb és legszélesebb körben használt, főként a kétszikű gyomok ellen hatásos herbicid. Több mint 1500 kereskedelemben kapható gyomirtószer tartalmaz 2,4 D-t. A 2,4 D auxinanalóg, mely a célzott növények kontrollálatlan növekedésével okozza azok pusztulását. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) a feltehetően humán karcinogén (2B) kategóriába sorolta (IARC 2017).

A fenilurea-herbicidek a peszticidek egy fontos csoportját képezik, melyek közül az egyik legtöbbet használt vegyület a linuron. Egyszikűek és kétszikűek ellen is hatékony ez a széles körben alkalmazott, metil-metoxi-karbamid-típusú herbicid. A fenilurea-herbicidek hatásukat a fotoszintézis gátlása révén érik el, a fotoszintetikus elektrontranszportláncban szerepet játszó enzim gátlása révén (Snel és mtsai. 1998).

A klórtoluron főleg egyszikűek, de számos kétszikű ellen is alkalmazható, dimetil-karbamid típusú gyökér- és levélherbicid. Szelektivitása gyengébb, mint a fent említett linuroné, de hatásfoka magasabb. Ezen peszticideket az IARC (2A) „valószínűleg daganatkeltő anyag” kategóriába sorolta (IARC 2016).

Az egyik legismertebb fungicid a ditiokarbamát származékok közé tartozó mankozeb. Peronoszpóra, varasodás, monília betegség, alternáriás, szeptóriás és számos egyéb gomba által okozott növénybetegségek ellen alkalmazható a liztharmat és a szürkepenész kivételével. Hatását a gombaenzimek tiolcsoportjához kötődve éri el, ezzel gátolva a sejtlégzést. A karbamátok humán tekintetben idegmérgek, gyermekeket és csecsemőket érintő fejlődési rendellenességekkel hozhatók összefüggésbe (Morais és mtsai. 2012). Az IARC besorolása alapján a 3. kategóriába sorolt, tehát emberben daganatkeltés szempontjából nem besorolható anyag (IARC 1976).

A karbendazim benzimidazol-típusú, széles spektrumú fungicid. Üszöggombák, lisztharmat, fuzáriumos fertőzések és monília betegségek ellen hatásos. A gombák sejtosztódását gátolja, az orsófonalakhoz kötődve megakadályozza a kromoszómák szétválását. A karbendazimot az Európai Munkahelyi Biztonsági és Egészségvédelmi Ügynökség az M2 (mutagén: 2. kategória) és C2 (karcinogén: 2. kategória) kategóriákba sorolta (EU-OSHA 2009).

A mezőgazdaságban a rézvegyületek alkalmazása igen elterjedt. A réz felhasználásában a legnagyobb áttörést a bordói lé bevezetése hozta, melyet Millardet 1880-ban elsőként réz-szulfátból, mészből és vízből állított elő és lett figyelmes ezen oldat antimikrobiális hatására. A mezőgazdaságban sokféle réz-szulfát-tartalmú peszticid érhető el, melyek számos baktérium- és gombabetegség ellen alkalmazhatóak. Mindezek mellett a réznek esszenciális szerepe van a magasabbrendű növények növekedésében és reprodukciójában, mint számos fehérje alkotóeleme, fontos biokémiai reakciókban játszik szerepet (Rusjan 2012).

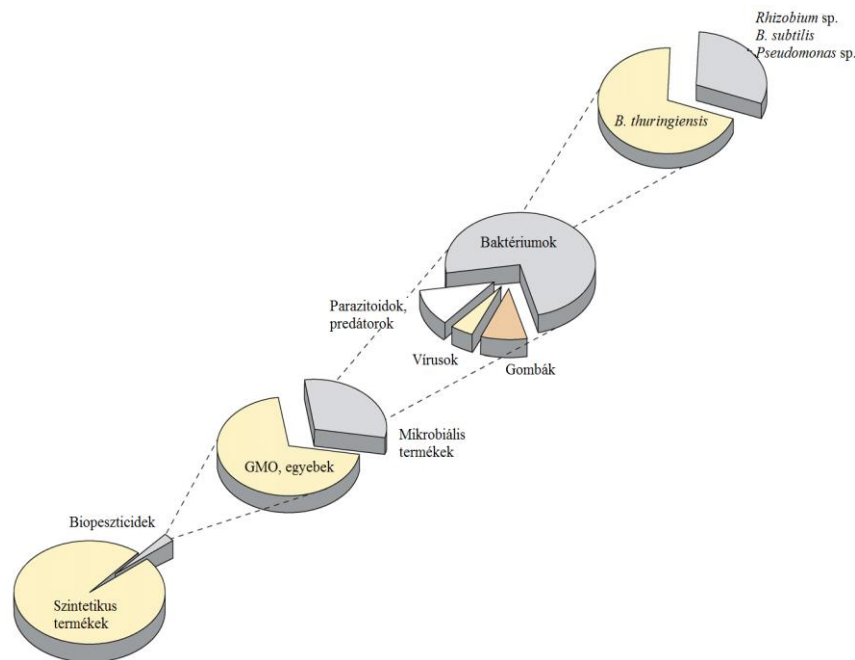
Egyéb nyomelemek, mint például a mangán és a vas is alkalmazhatóak tápanyagpótló és talajjavító adalékokként. A mangán-szulfátot napjainkban is használják talaj- és levéltrágyaként, mivel a növények számára elengedhetetlen a mangánfelvétel (Mousavi és mtsai. 2011).

A toxikus mikroelemek közé sorolható a kadmium, mely fosszilis tüzelőanyagok égetése, a foszfátműtrágyák, fémek gyártása, a kommunális hulladékok égetése során, illetve szennyvíziszappal juthat a környezetbe. Növények számára nem toxikus, azonban a levelekben akkumulálódva és az állatok szervezetébe jutva számukra toxikussá válhat (Gupta és mtsai. 2008). A talajba a nikkelt kohászat, bányászat, olajszármazékok és szennyvíziszap révén juthat (Gupta és mtsai. 2008). Az IARC a kadmiumot és származékait, továbbá a nikkelt és vegyületeit bizonyítottan rákkeltő hatású anyagoknak minősítette, melyek a szennyezett talajból a növényekben felhalmozódhatnak és az emberi szervezetbe juthatnak (IARC 2012).

3.4 A biológiai védekezés lehetőségei, biopeszticidok

A napjainkban is nagy mennyiségben használt kémiai peszticidok hozzájárulnak a termények mennyiségi és minőségi javulásához, azonban jelentős környezeti terhelést jelentenek. Nemcsak a célorganizmusra lehetnek nem kívánatos hatásaik, számos vegyület esetében karcinogén hatások is ismertek (Agrios 1988, Cook 1993, Heydari 2007, Heydari és mtsai. 2007). Egy további, gyakran felmerülő probléma a patogén szervezetek rezisztenssé válása, melynek következtében újabb és újabb peszticidok előállítására válik szükségessé, ami

jelentős költségeket von maga után (Cook 1993). A kémiai peszticidek használata ma már szigorú szabályozás alá esik, és egyre nagyobb a környezetvédelmi nyomás ezen káros anyagok felhasználásának mérséklésére. Éppen ezért egyre nő az igény a kémiai hatóanyagokat nem tartalmazó, alternatív megoldások iránt (**1. táblázat**) (Pal és Gardener 2006).



1. ábra. A biopeszticidek jelenlegi helyzete.

A szintetikus növényvédőszer uralják a piacot, bár a 2000-es évek óta használatuk némileg visszaszorult, 2008-ban az összes használt növényvédőszer 2,5%-át tették csak ki a biopeszticidek (**1. ábra**). A forgalomba került biopeszticidek csupán 30%-a mikrobiális peszticid (Thakore 2006), melyek között a baktériumalapú készítmények vannak többségben. A *Rhizobium* (*Agrobacterium*), *Bacillus* és *Pseudomonas* nemzetség képviselői a legsikeresebb mikrobiális peszticidek (Fravel 2005). A mikroorganizmusokat tartalmazó készítmények 70%-a *Bacillus thuringiensis*-en alapuló rovarellenes növényvédőszer, a maradék 30% körülbelül fele pedig *Bac. subtilis*-en alapuló biopeszticid (Ongena és Jacques 2008).

Az ökológiai természetben a kórokozók és kártevők szupressziójára szolgáló megoldásokat négy fő csoportra oszthatjuk:

1. mikroorganizmus-alapú készítmények alkalmazása (mikrobiális peszticidek)
2. más organizmusok (nematódák, rovarok) segítségével történő szupresszió
3. élő organizmusokból származó hatóanyagok alkalmazása (biokémiai peszticidek)
4. genetikailag módosított növények alkalmazása (Cawoy és mtsai. 2011).

1. táblázat. A mikrobiális és kémiai peszticidek tulajdonságainak összehasonlítása (Cawoy és mtsai. 2011).

	KÉMIAI PESZTICIDEK	MIKROBIÁLIS PESZTICIDEK
Felhasználás	könnyű felhasználás	komplexebb felhasználás
Hatékonyaság	hatékonyak	hatékonyaságuk biotikus és abiotikus tényezők függvénye
Termelés, előállíthatóság	ellenőrzött ipari termelés, könnyű előállíthatóság	komplexebb ipari termelés, bonyolultabb előállíthatóság
Szennyezés	levegő-, talajvíz-, talajszennyező	kevésbé szennyezők, alacsony koncentrációban is hatékonyak
Toxicitás	toxikusak (széles hatásspektrumúak)	kevésbé toxikusak célzottan hatnak, biodegradábilisak
Rezisztencia	rezisztencia alakulhat ki velük szemben	sokféle hatásmechanizmus jellemzi, így a rezisztencia kialakulásának valószínűsége kisebb

A mikrobiális peszticidek nagy előnye, hogy szántóföldi és üvegházi növényeken okozott megbetegedések ellen is hatásosak, legyen szó gabonaféléken, hüvelyeseken, virágokon vagy dísznövényeken okozott tünetekről. Betakarítás előtti (*preharvest*) és betakarítás utáni (*postharvest*) kórokozók ellen is fel tudnak lépni. A leginkább elterjedt mikrobiális peszticidek baktérium- illetve gombaalapúak, melyeket sok esetben a szupresszív környezetből izolálnak. Egyik nagy előnyük a többi növényvédőszerrel szemben a hatásmechanizmus sokfélesége: képesek lehetnek a növénypatogének elleni, tápanyagokért és helyért zajló kompetícióban részt venni, valamint direkt antagonizmus révén gátolni növekedésüket, illetve rezisztenciát indukálhatnak a gazdanövényben. A genetikailag módosított növényekkel szemben a pozitívabb társadalmi megítélésük teszi őket

elfogadottabbá. Európában számos jogszabály korlátozza a genetikailag módosított növények termesztését. A biokémiai peszticidekkel szemben a mikrobiális peszticidek jelentős előnye a fertőzés helyén való állandó jelenlétük, sőt a fitoszférában történő megtelepedésüket követően *in situ* képesek a bioaktív komponensek folyamatos termelésére. Mindezek mellett nemcsak a patogének elnyomásában van jelentős szerepük, számos egyéb pozitív hatásuk is lehet. Több mikroorganizmus termel növényi hormonszerű vegyületeket, melyek hatása révén képesek lehetnek a növény növekedésének serkentésére. Felhasználhatóvá alakítják a talajban lévő, a növény számára oldhatatlan tápanyagokat, szerepet játszhatnak a foszfát-szolubilizációban (fitázok, nem specifikus foszfátázok, szerves savak termelése révén) és a nitrogénkötésben. Elősegíthetik továbbá a gazdanövény és más hasznos organizmusok közötti kapcsolatok kialakulását (Cawoy és mtsai. 2011).

3.5 A biológiai védekezés általános jellemzése

A biológiai védekezést, rövidebb nevén biokontrollt a biológia különböző területein alkalmazzák, melyek közül a legismertebbek a rovartan és a növénykórtan. A növénykórtan területén azokat a mikrobiális antagonistákat vizsgálják, melyek képesek a kialakult növényi betegség visszaszorítására. Azon organizmusokat, vagy az általuk termelt különböző tisztaságú hatóanyagokat tartalmazó kivonatokat, melyek a kórokozókat képesek elnyomni, biokontroll ágenseknek nevezzük. Élelmiszerbiztonsági szempontból szívesebben használják a kivonatokat (Pal és Gardener 2006). A biológiai védekezésben szerepet játszó mechanizmusokról a **2. táblázat** nyújt áttekintést.

2. táblázat. A biológiai védekezésben szerepet játszó folyamatok (Pal és Gardener 2006 nyomán).

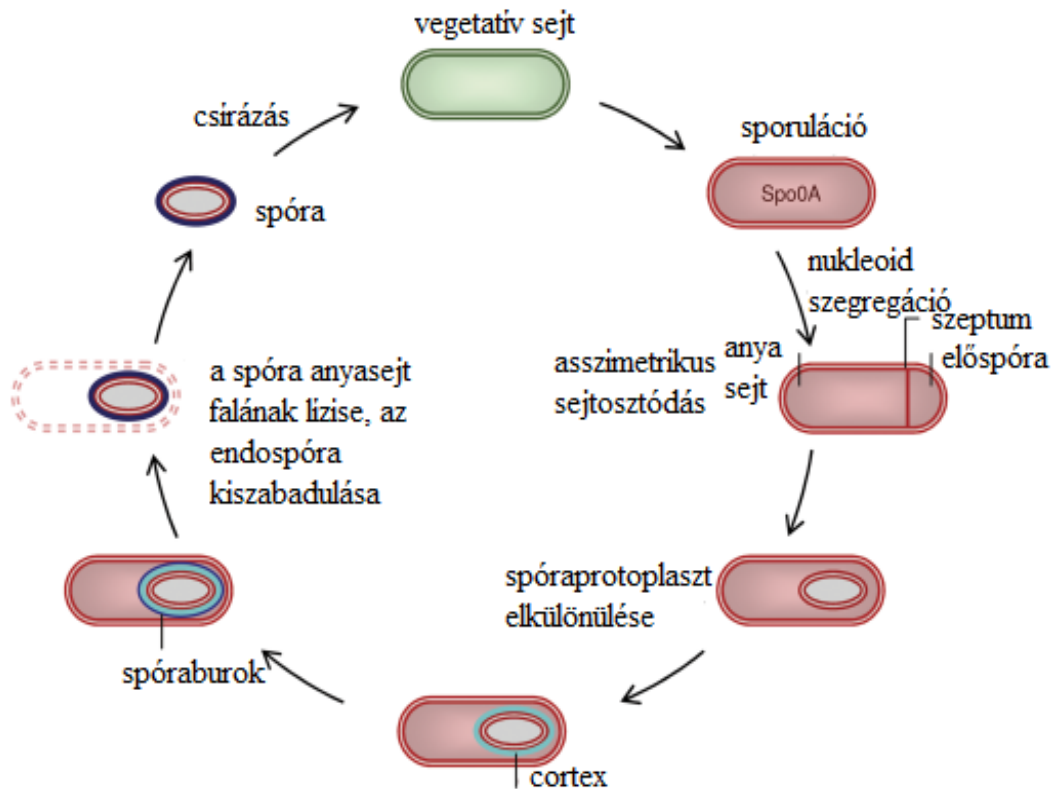
TÍPUS	MECHANIZMUS	PÉLDÁK
Direkt antagonizmus	hiperparazitizmus/predáció	litikus/lizogén bakteriofágok <i>Ampelomyces quisqualis</i> <i>Lysobacter enzymogenes</i> <i>Pasteuria penetrans</i> <i>Trichoderma virens</i>
Vegyes antagonizmus	antibiotikum-termelés	2,4-diacetil-floroglucinol fenazin ciklikus lipopeptidek

	extracelluláris enzimek termelése	kitináz, glukanáz, proteáz
	melléktermékek	ammónia szén-dioxid hidrogén-cianid
	fizikai/kémiai kapcsolat	talajpórusok eltömődése csírázási szignálok felhasználása molekuláris keresztkapcsolatok zavara
Indirekt antagonizmus	kompetíció	exudátumok felhasználása sziderofórok termelése niche elfoglalása
	gazdarezisztencia indukálása	gombasejtfallal való kapcsolat patogén-asszociált molekuláris mintázat detektálása fitohormon-közvetített indukció

3.6 A *Bacillus* nemzetség általános jellemzése

A *Bacillus* nemzetség tagjai a *Firmicutes* divízióba tartozó, Gram-pozitív endospórás prokarióta szervezetek. Az endospórák fontos kitartó képletek, biztosítják a baktériumok kedvezőtlen körülmények között történő túlélését. A spóráképzést indukálhatja a tápanyag fogyása, a sejt életkorával együtt járó anyagcseretermékek feldúsulása, továbbá a kiszáradás. Bizonyos *Bacillus* fajoknál jó tápanyagellátottság mellett is a tenyészet nagy hányada már spórás állapotú lehet. Az endospórák rendkívül ellenállóak, jól tolerálják a vízhiányt, a magas hőmérsékletet, a nyomást, az UV- és gamma-sugárzást, különböző oldószereket, fertőtlenítőszereket. A spórákat erős dehidratáltság jellemzi. Az endospórákra jellemző anyag a pikolinsav, leggyakoribb előfordulási formája a Ca-dipikolinát (Kevei és Kucsera, 1998). A **2. ábra** a spórázás folyamatát szemlélteti, amely sejtosztódással indul, aminek következtében

a vegetatív sejtben megindul a replikáció. A dimer képződését a nukleoid-szegregáció követi. A létrejövő szeptum lehetővé teszi a spóraprotoplaszt elkülönülését, melyből a spóraanyasejt membránjával körülvett előspóra jön létre. A spóraanyasejt falának lízisét követően megtörténik az endospóra kiszabadulása és a spóra csírázása (González-Pastor és mtsai. 2003).



2. ábra. A *Bacillus* fajok spórázási ciklusa (González-Pastor és mtsai. 2003 nyomán).

A *Bacillus* fajok spóráképzése nagyfokú előnyt jelent a biológiai védekezés szempontjából. Kompetíciós képességük ugyan elmarad a *Pseudomonas* fajokéhoz képest, a spórák viszont igen ellenállóvá, hosszan eltarthatóvá és jól formulázhatóvá teszik a *Bacillus*-alapú készítményeket. Számos kiváló antagonista képességekkel rendelkező *Bacillus* faj ismert.

A *Bac. thuringiensis*-alapú készítmények számos kártevő (pl. lepkefélék hernyói, legyek-szúnyogok lárvái, bogarak) ellen hatásosak. Számos gazdaságilag jelentős rovarkártevő ellen alkalmazhatók, mint például: *Heliothis* sp., *Earias* sp., *Spodoptera* sp., *Plutella* sp., melyek olyan haszonnövényeket támadnak meg, mint például a gyapot, rizs, paradicsom, karfiol, káposzta. Kedvezőtlen körülmények között – a fajra jellemzően – a vegetatív sejtek spórákká alakulnak. Spóráképzésük során törzsenként különböző toxinkristályokat hoznak létre, melyek más-más rovarcsoportokra hatnak. A toxin a középbél hámsejtjeinek receptoraihoz kötődve pórusokat nyit a sejthártyán, ezáltal a rovar halálát okozva. Az ilyen

alapú készítmények előnye, hogy sem emlősökre, sem madarakra nincsenek káros hatással (Thakore 2006).

3.7 A *Bac. subtilis* törzsek és az általuk termelt hatóanyagok szerepe a biológiai védekezésben

Számos irodalmi adat létezik a *Bac. subtilis* biológiai védekezésben betöltött kiemelkedő szerepéről. A *Bac. subtilis* sokat tanulmányozott modellszervezet, és ezen nem patogén fajt az Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerügyi Hivatala (USFDA) általánosan biztonságosnak tekinthető (GRAS - „generally regarded as safe”) státuszba sorolta. A *Bac. subtilis*-t spóráképzésén túl egyéb tulajdonságai teszik ellenálló biokontroll ágensé. A *Bac. subtilis* mozgó baktérium, e tulajdonsága segíti a gyökérkolonizációban. Aerob vagy fakultatív anaerob, képes alacsony oxigén-koncentráció mellett is növekedni (Nakano és Hulett 1997), ami nagy előnyt jelent, mivel a rizoszférában rendelkezésre álló oxigén csekély, illetve elérhetősége időben is fluktuál.

A *Bac. subtilis* törzsek jól fejlett szekréciós rendszerrel rendelkeznek (Harwood 1992), számos széles spektrumú antibiotikus aktivitással rendelkező másodlagos metabolitot, többek között ciklikus lipopeptideket, valamint polipeptideket, proteineket (enzimeket) és nem peptid-típusú termékeket termelnek, melyek mind az orvostudomány, mind a mezőgazdaság számára értékesek (Mukherj és mtsai. 2006). A *Bac. subtilis* által termelt antimikrobiális vegyületeket a biológiai védekezésben betöltött szerepük és élelmiszerek tartósítására való képességük miatt intenzíven kutatják. Kísérletek folynak állatgyógyászatban gyógyszerként történő alkalmazhatóságukkal kapcsolatban is (Mulligan 2005).

A *Bacillus* fajok által termelt ciklikus lipopeptidok jelentős szerepet töltenek be a növényi rezisztencia indukciójában és a növényi növekedés serkentésében is. Az indukált szisztémás rezisztencia (ISR) jázmonsav és/vagy etilén által közvetített. Érdekes, hogy a szalicilsav-függő (szisztémás szerzett rezisztencia) és a jázmonsav-függő védelmi útvonalak kölcsönösen antagonisztikusak lehetnek, és néhány bakteriális patogén kihasználja ezt a szisztémás szerzett rezisztencia leküzdésére. Az induktorok teljes skálája még nem ismert, de a sziderofórok, illetve a fengicin- és a szurfaktin-típusú lipopeptidok hatékonysága már bizonyított. A vizsgált lipopeptideknél megfigyelték, hogy különböző növényi sejtek stimulálásra specializálódtak. A szurfaktin bab-, paradicsom- és dohánynövényekben indukált rezisztenciát, a fengicin pedig három *Solanaceae* faj esetében is bizonyította hatékonyságát (Ongena és Jacques 2008).

A következőkben a *Bac. subtilis* által termelt antimikrobiális komponenseket tekintjük át Wang és munkatársainak (2015) összegzése alapján.

3.8 A *Bac. subtilis* által termelt antimikrobiális peptidek

3.8.1 *Bac. subtilis* által termelt peptid-termékek

3.8.1.1 Nem-riboszómális peptid-szintetáz (NRPS) termékek

Számos baktérium képes nem-riboszómális szintézis révén peptid antibiotikumok termelésére. *Bac. subtilis* esetében 3 nagy csoport, az iturinok, a fengicinek és a szurfaktinok ismertek.

3.8.1.1.1 Iturinok

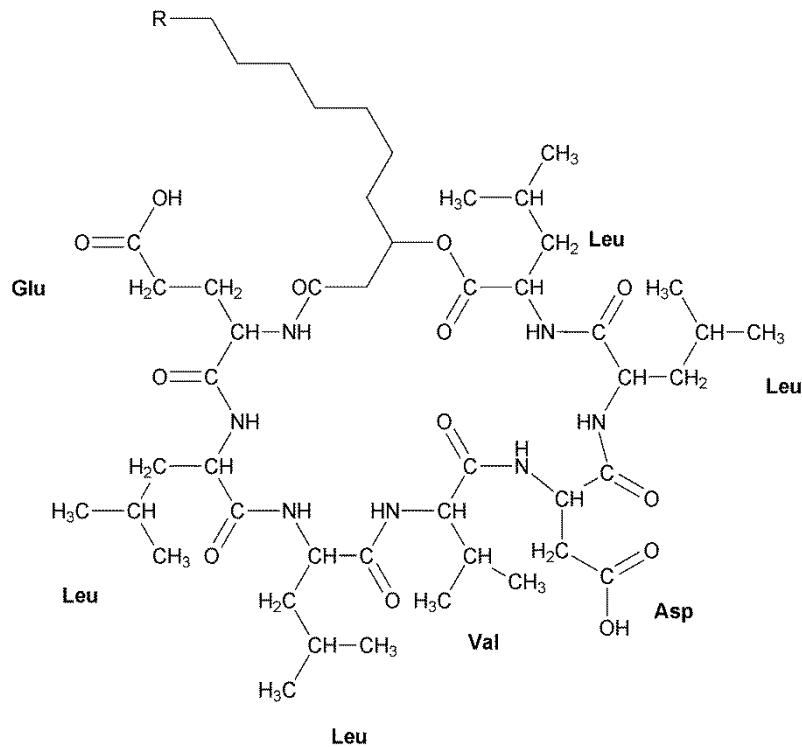
Több *Bac. subtilis* törzs termel az iturinok csoportjába tartozó ciklikus lipopeptideket. Ezen csoport szerkezetileg is ismert tagja négy iturin antibiotikum (iturin A, C, D, E), öt bacillomicin és 1 mikoszubtilin (Besson és mtsai. 1976, Klich és mtsai. 1994, Cho és mtsai. 2003). Ezeket az antibiotikumokat invariáns LDDLLDL aminosav-szekvencia jellemzi (Hourdou és mtsai. 1989). Hét aminosavból álló ciklikus peptidgyűrűt és egy zsírsavláncot tartalmaznak. Az iturin esetében a zsírsavlánc hosszúsága C14-től C17-ig változik. A zsírsavlánc szénatomszámának növekedése az aktivitás növekedéséhez vezet (Phae és mtsai. 1990). Az iturin A, D és E közötti különbségek a következők: az iturin A egy Asn vagy Gln aminosava cserélődik Asp vagy Glu aminosavra iturin D-ben, míg az iturin E-ben Asp-OCH₃-ra vagy Glu-OH₃-re (Grangemard és mtsai. 1997). Az iturin A-val szemben az iturin C-t nem jellemzi antibiotikus aktivitás, ami valószínűleg az Asn cseréjének tulajdonítható. A bacillomicinek és a mikoszubtilin az iturinoktól a peptidláncok L⁴, L⁵, D⁶ és L⁷ pozíciójában különböznek (Wang és mtsai. 2015). A fengicinekhez képest erősebb hemolitikus tulajdonsággal bírnak. Élesztő- illetve fonalgombák elleni antifungális hatásuk kiemelkedő (Walton és Woodruff 1996, Moyne és mtsai. 2001), azonban csak korlátozott antibakteriális hatásuk van (Besson és Michel 1986; Asaka és Shoda 1996; Kumar és mtsai. 2012), míg antivirális hatásuk nem ismert (Yu és mtsai. 2002; Moyne és mtsai. 2001). Az iturinok fungitoxikus hatása a membrán-permeabilitás megváltoztatásában rejlik. A szurfaktinokkal ellentétben ez nem a membrán szétszakítása és szolubilizálása révén valósul meg, hanem ozmotikus perturbációs hatásra létrejövő ioncsatornákkal (Ongena és Jacques 2008).

3.8.1.1.2 Fengicinek

A fengicinek (plipasztatin, ha a Tyr⁹ D konfigurációban található) ciklikus dekapeptidek, ahol nyolc aminosav formál egy ciklikus gyűrűt, míg a β -hidroxi-zsírsv a másik két aminosavhoz kapcsolódik. Az aminosav-szekvencia konfigurációja LDLDLDDLLDL, melyben az L-Tyr és L-Ile egy laktongyűrűvel kapcsolódik (Lin és mtsai. 2005). Ezen csoport tagjai a fengicin A, fengicin B és homológjaik, melyek a zsírsavláncok hosszában (C13-tól C17-ig) és a peptidrész 6. pozíciójában lévő aminosavban különböznek (D-Ala a fengicin A-ban és D-Val a fengicin B-ben). A fengicinek makrolakton gyűrűt formálnak, melyben a peptidszekvencia 3. pozíciójában a Tyr oldallánc észterkötést formál a C-terminális aminosavval, kialakítva ezáltal egy belső gyűrűt (Wang és mtsai. 2015). A fengicinek kevésbé hemolitikusak az iturinok vagy szurfaktinok csoportjainál, azonban erős antifungális hatással rendelkeznek, különösen fonalagombákkal szemben (Steller és mtsai. 1999). Hatásmechanizmusuk kevésbé ismert, mint a másik két lipopeptid-család esetében, de e család tagjai is interakcióba lépnek a lipidrétanggal és mennyiségük függvényében a membrán permeabilitásában okoznak változást (Deleu és mtsai. 2005).

3.8.1.1.3 Szurfaktinok és homológ vegyületeik

Arima és munkatársai (1968) írtak le először szurfaktin-vegyületeket *Bac. subtilis* fermentlevéből. Egyéb *Bacillus* fajok is termelnek a szurfaktin-családba tartozó vegyületeket: szurfaktinokat, eszperint, lichenizint és pumilacidint (Ongena és Jacques 2008). A további változatosság a kapcsolódó telített vagy telítetlen zsírsavláncoktól függ, amit a szurfaktinok esetében a C13-C15 lánc hosszának változása okoz (**3. ábra**) (Shao és mtsai. 2015). A szurfaktin-család tagjai strukturálisan eltérőek, de mindegyikük heptapeptid, amely β -hidroxi-zsírsvval ciklikus laktongyűrűt képez.



3. ábra. A szurfaktinok szerkezete az elsőként leírt heptapeptid példáján. A leggyakrabban kapcsolódó β -hidroxi-zsírsavak a C13 ($R = C_4H_9$), C14 ($R = C_5H_{11}$) és C15 ($R = C_6H_{13}$) (Shao és mtsai. 2015 nyomán)

A szurfaktinok amfifilikusak, így kapcsolódhatnak és szorosan kihorgonyozhatnak a lipidmembránokba, ezáltal képesek megzavarni azok integritását. Lipidvezikulumokon végzett tanulmányok alapján a szurfaktinok alacsony koncentrációban főleg a membrán külső „részébe” integrálódnak, elenyésző mértékben károsítva azokat. Közepes koncentrációban részleges permeabilizációt okoznak, de a membrán működése helyreállhat. Nagyobb koncentráció hatására pórusok alakulnak ki, mivel szurfaktin gazdag klaszterek jönnek létre a membránban. Amikor a szurfaktin eléri a kritikus micelláris koncentrációt, teljesen szétszakítja és szolubilizálja a membránt, kevert micellákat hozva létre. A koleszterol jelenléte a foszfolipid-rétegben gyengíti a szurfaktin destabilizáló hatását (Carrillo és mtsai. 2003), tehát a célszervezet membránjának szteroltartalma befolyásolja a káros hatásokat (Ongena és Jacques 2008).

A szurfaktinok széleskörű bioaktivitást mutatnak, ideértve a hemolitikus, antivirális, antibakteriális és antimikoplazmatikus hatásokat, valamint a felületaktív tulajdonságokat is. Ezen tulajdonságok együttesen teszik rendkívül vonzóvá a termelő mikroorganizmust biológiai védekezésben történő felhasználásra rizoszféra-kompetencia, a növénypatogén ágensek direkt gátlása, vagy éppen a gazdanövény immunizálása révén (Ongena és Jacques 2008).

A szurfaktin antivirális hatással is rendelkezik, mivel gátolja a vírusburok összeszerelődését. Vollenbroich és munkatársai (1997a) kísérleti körülmények között bizonyították, hogy a szurfaktin képes a herpeszvírusok, retrovírusok és egyéb burokkal rendelkező DNS- és RNS-vírusok inaktiválására (Vollenbroich és mtsai. 1997a). A szurfaktin Semliki Forest vírus, Herpesz simplex vírus (HSV-1 és a HSV 2), majom-immundeficiencia vírus, vezikuláris sztomatitisz vírus, macska kalicivírus és rágesáló enkefalomiokarditisz vírus ellen hatékony, a ciklikus szurfaktin szénláncának hossza befolyásolja a vírusok inaktiválására való képességét (Singla és mtsai. 2014).

Szintén Vollenbroich és munkatársai (1997b) számoltak be a szurfaktin antimikoplazmatikus hatásáról. Az aktív szurfaktin detergensszerűen viselkedik, a mikoplazma membránrendszerének permeabilitás-változása révén éri el a membrán dezintegrációját. A szurfaktinok alacsony citotoxicitása lehetővé teszi alkalmazásukat emlős sejtenyészetben a sejtek anyagcseréjének és proliferációjának megváltozása nélkül. A legalacsonyabb mikoplazmagátló koncentráció, mely már 48 óra után hatásosnak bizonyult, 25 $\mu\text{mol/l}$ volt (Fassi Fehri és mtsai. 2007).

A szurfaktinok hatékonyak lárva- és bábstádiumban lévő szúnyogok, mint például a *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* és *Aedes aegypti* fajok ellen (Seydlová és mtsai. 2011), ezáltal a szurfaktin-alapú készítmények inszekticidként a malária elleni küzdelemben is alkalmazhatóak. A szurfaktin antiparazitikus hatása révén a méheknél előforduló nozemózis ellen is hatásos lehet. A házi méhen (*Apis mellifera*) a *Nosema ceranae* okoz parasitikus tüneteket, melyeket a szurfaktinok képesek jelentős mértékben csökkenteni (Porrini és mtsai. 2010).

Fernandes és munkatársai (2007) számos multidrog-rezisztens baktériummal (pl. *Pro. vulgaris*, *Alc. faecalis*, *Pse. aeruginosa*, *Esc. coli* és methicillin-rezisztens *Sta. aureus*) szemben bizonyították a szurfaktin szupresszálo hatását. Vágvölgyi és munkatársai (2013) *in vitro* antagonizmus-tesztjeik során a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs *Pse. syringae* törzsszel szembeni kiemelkedő gátlásáról számoltak be. Kim és mtsai. (2010) a szurfaktin és az iturin *Col. gloeosporioides* növénypatogén gomba elleni szinergista antifungális hatását írták le, Etchegaray és munkatársai (2008) pedig egy Gram-negatív növénypatogén baktérium, a *Xan. campestris* ellen bizonyították a szurfaktin és iturin együttes hatását.

Bais és munkatársai (2004) számoltak be először a szurfaktin biofilmképzésben betöltött, kiemelkedő szerepéről. *Arabidopsis* növényen vizsgálták a *Bac. subtilis* 6051 törzs biofilmképzését, melynek szerepe van a *Pse. syringae* által okozott fertőzés elleni

védekezésben. Ezen törzs szurfaktin-deficiens mutánsa csökkent biofilmképző, ami csökkent kolonizációs képességet, és ezáltal csökkent biokontroll képességet mutatott a vizsgált *Pse. syringae* törzssel szemben.

Kinsinger és munkatársai (2003) bizonyították, hogy a szurfaktin és a szekrécióját stimuláló káliumion fontos szerepet töltenek be a *Bac. subtilis* 6051 törzs mozgékonyágában.

A szurfaktin kulcsszerepet játszik a biofilm kialakulásában. A *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 168-as törzs tartalmaz szurfaktin- és plipasztatin-operonokat, de nem képes funkcionális lipopeptidek termelésére az *sfp* gén hiánya miatt, ezáltal nem képes rajzó mozgásra (*swarming motility*) sem (Julkowska és mtsai. 2005, Patrick és Kearns 2009). A szurfaktin antiadhezív tulajdonságát is leírták, mely során két patogén, az *Esc. coli* és a *Sta. aureus* biofilmképzésének gátlása valósult meg, illetve ezüsttel való szinergista interakciója révén hatékony antibiofilm-ágensnek bizonyult (Rivardo és mtsai. 2009).

A szurfaktin foszfolipáz A2-gátló hatása is ismert, melynek a gyulladáshoz vezető bélbetegségek patofiziológiájában van fontos szerepe. *Bac. subtilis* PB6 patkánymodellekben történt vizsgálata során figyelték meg a szurfaktin 2,4,6-trinitro-benzol-szulfonsav által indukált, vastagbélgyulladást mérséklő hatását, a szurfaktin csökkentette a plazma gyulladáshoz vezető citokinszintjét, míg a gyulladást csökkentő citokinek szintjét növelte (Selvam és mtsai. 2009). A szurfaktin gátolja a gyulladáshoz vezető mediátorok lipopoliszacharid-indukálta kifejeződését (Interleukin-1, indukálható nitrogén-monoxid-szintáz) (Hwang és mtsai. 2005), csökkenti a plazma endotoxin-, TNF- α - és NO-szintjét, melyet a patkányban szepszis sokk hatására vizsgáltak (Hwang és mtsai. 2007).

Kameda és munkatársai (1974) beszámoltak a szurfaktin tumorellenes hatásáról Ehrlich Ascites karcinóma sejteken. Egy másik tanulmány a szurfaktin humán vastagbélrák sejtproliferációt erősen gátló hatásáról számolt be, mely az apoptózis indukciója és a sejtciklus során a sejtek túlélését szabályozó szignálok elnyomása révén valósul meg (Kim és mtsai. 2007). A szurfaktin gátolja a sejtek osztódását és indukálja az apoptózist reaktív oxigénszármazékok/c-Jun N-terminális kináz által mediált mitokondriális kaspáz útvonalon az MCF-7 humán emlőrák-sejtekben. A szurfaktin generálja a reaktív oxigénfajtákat, melyek indukálják a túlélési mediátorokat, az extracelluláris szignál-regulált kinázt (ERK1/2) és a c-Jun N-terminális kinázt. Ezen mediátorok kulcsfaktorai a stresszindukált apoptózisnak, mely egy újfajta stratégia alapja lehet a rák megelőzésére és kezelésére (Cao és mtsai. 2010). Már 30 $\mu\text{mol/l}$ -es szurfaktin szignifikáns antiproliferatív aktivitással bír humán vastagbélrák-sejteken (Kim és mtsai. 2007) és apoptózist indukál humán emlőrák-sejtekben (Cao és mtsai. 2010).

A szurfaktin trombolitikus terápiás szerként történő alkalmazása is kutatott, tüdő-, szívizom- és agyi rendellenességek esetén, fő előnye, hogy kevés mellékhatása van, ezért hosszú távú kezelések alapja is lehet (Seydlová és mtsai. 2011).

A szurfaktin hemolitikus aktivitása gyógyászati alkalmazásának egyik jelentős hátránya lehet. A vörösvértestek 50%-án (HC₅₀) 300 µmol/l-es koncentrációban hemolízist okoz (Dufour és mtsai. 2005).

3.8.1.1.4 Maltacinek

Hagelin és munkatársai (2004) preparatív nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával (HPLC) sikeresen elválasztották a maltacineket a *Bac. subtilis* által termelt ciklikus lipopeptidektől és kitisztították azokat. Ezen vegyületek 1447,7 Da és 1519,8 Da méretűek, lineáris aminosav-szekvenciájuk hasonló a fengicinekéhez. Tíz aminosavból állnak, az N-terminálison lévő két utolsó aminosavban térnek el, mely jelzi, hogy új vegyületekről van szó (Hagelin és mtsai. 2007). Ez a csoport négy különböző aminosav-szekvenciával jellemezhető, a különbségek a 2. pozícióban lévő pirolizin és lizin aminosavakban vannak. Erős antifungális tulajdonságukat írták le *Can. albicans*, *Tri. mentagrophytes* és *Asp. fumigatus* törzsekkel szemben (Hagelin és mtsai. 2004). Egyéb antimikrobiális tulajdonságaikról kevés információ áll rendelkezésre.

3.8.1.1.5 Egyéb, nem-riboszómális peptid-szintetáz termékek

Számos egyéb, a fenti kategóriákba be nem sorolható, eltérő struktúrájú és funkciójú peptid-antibiotikum létezik, mint például a bacilizin, rhizokticin, amikumacin, TL-119, mikobacillin és diketopiperazin (DKP). A bacilizin *Bac. subtilis* törzsek által termelt hidrofíl dipeptid (Hagelin és mtsai. 2007), melynek moláris tömege 270 g/mol, N-terminálisán L-alanin, C-terminálisán pedig L-antikapszin található (Walker és Abaraham 1970a; Walker és Abaraham 1970b). Az antikapszin (3-epoxiciklo-hexanonil-alanin) reaktív epoxiketon funkció csoporttal rendelkezik, melynek jelentős szerepe van az antimikrobiális aktivitásban (Kenig és mtsai. 1976; Parker és Walsh 2012). A bacilizin számos baktérium, illetve gomba ellen hatékony, mint például a *Sta. aureus* (Kenig és Abraham 1976) vagy a *Can. albicans*.

A *Bac. subtilis* ATCC 6633 törzsben fedezték fel 1949-ben a rhizokticineknek nevezett hidrofíl foszfono-oligopeptideket, szerkezeti leírásuk azonban csak 1988-ban történt meg (Rapp és mtsai. 1988). Ezen csoport négyféle variánst tartalmaz (Kugler és mtsai. 1990), melyek di- és tripeptid antibiotikumok az N-terminálisukon variábilis aminosavakkal, illetve argininnel és egy nem proteinogén aminosavval, az L-2-amino-5-foszfono-3-cisz-penténsavval

(APPA). Ezen négy variáns fő struktúrája a következőképpen foglalható össze: Arg-APPA, Val-Arg-APPA, Ile-Arg-APPA és Leu-Arg-APPA (Kino és mtsai. 2009). Úgy vélik, az N-terminális aminosavai azok, melyek szükségesek az antifungális aktivitáshoz, gátolják a treonin-szintáz az APPA aktiválása révén (Borisova és mtsai. 2010).

A *Bac. pumilus*-ból (Itoh és mtsai. 1980) és a *Bac. subtilis*-ből (Li és mtsai. 2012) izolált amikumacinok 12 variánsa ismert, melyek dihidro-izokumarint tartalmaznak hidroxil aminosav-oldallánccal (Hashimoto és mtsai. 2007). Antibakteriális, gyulladáscsökkentő, fekélygátló, gasztroprotektív, valamint *Hel. pylori*-t gátló hatásuk ismert. A C¹² amid funkciós csoport kritikus szerepet játszik a citotoxicitásban és az antibakteriális aktivitásban (Li és mtsai. 2012; Krohn és mtsai. 1997; Pinchuk és mtsai. 2001).

A TL-119 vagy A-3302-B egy peptid antibiotikum, melyet *Bac. subtilis*-ből izoláltak (Sholi és mtsai. 1974; Nakagawa és mtsai. 1975). Antimikrobiális hatását számos baktériummal (*Str. pyogenes*, *Esc. coli* és *Sta. aureus*) szemben vizsgálták (Sholi és mtsai. 1974).

A DKP-k antibakteriális (Rhee 2004; Fdhila és mtsai. 2003), antifungális (Nishanth és mtsai. 2012) és antitumor (Kanzaki és mtsai. 2000; Nicholson és mtsai. 2006; van der Merwe és mtsai. 2008) hatással rendelkező heterociklikus vegyületek, melyek számos sztereoizomerformában előfordulnak (DD, DL, LL) (Martins és Carvalho 2007).

3.8.1.2 Riboszómális szintézis útján létrejövő termékek

Ezen csoportba a lantibiotikumok és egyéb antifungális komponensek tartoznak. A lantibiotikumok két fő csoportja ismert, az A- és B-típusúak. Egyéb *Bac. subtilis* által termelt lipopeptidekkel összehasonlítva megfigyelhető, hogy ezen peptidek számos, nem szokványos aminosavat tartalmaznak, mint például dehidroalanint (Dha), dehidrobutirint (Dhb), lanthionint (Ln) és metillanthionint (Bauer és Dicks 2005).

3.8.1.2.1 A típus: Szubtilin és ericin

Az A-típusba tartoznak a szubtilinek és variánsaik, melyek erős antibakteriális hatással rendelkeznek főleg *Lis. monocytogenes* és *Clo. botulinum* ellen, ezáltal az élelmiszeripar előszeretettel alkalmazza ezen vegyületeket tartósításra. Az A-típusú lantibiotikumok közé tartozik még az ericin A és az ericin S. Az ericin S a *Bac. amyloliquefaciens*, *Lac. lactis*, *Sta. aureus* ellen hatékony, az ericin A ezzel szemben minimális antibakteriális tulajdonsággal rendelkezik (Stein és mtsai. 2002).

3.8.1.2.2 B típus: Merzacidin

B-típusú lantibiotikum a merzacidin, mely szintén lantionintartalmú peptid. Ez a *Bac. subtilis* HIL Y-85 és 54728 törzsek által termelt antibakteriális peptid 20 aminosavból áll. A szubtilinhez és az ericinhez hasonlóan a Gram-pozitív baktériumok, például *Streptococcus*-ok, *Bacillus*-ok és *Staphylococcus*-ok ellen hatékony (Niu és Neu 1991; Barrett és mtsai. 1992).

3.8.1.2.3 Szublancin és Szubtilozin A

A szublancint és a szubtilozin A-t a *Bac. subtilis* 168 törzs termeli (Paik 1998; Babasaki 1985). Mindkét vegyület számos Gram-pozitív baktériummal szemben hatékony, a szublancin *Bac. cereus*, *Str. pyogenes*, *Sta. aureus*, *Lis. monocytogenes* (Zheng és mtsai. 1999; Dubois és mtsai. 2009; Zheng és mtsai. 2000) ellen alkalmazható. A szubtilozin A aktivitást mutat *Lis. monocytogenes*, *Esc. coli*, *Sta. aureus* és *Kle. pneumoniae* törzsekkel szemben (Shelburne és mtsai. 2007).

3.8.1.3 Sejtfalbontó enzimek, proteázok

A *Bac. subtilis* sokféle enzim termelésére képes, mint például az α -amiláz, arabináz, celluláz, dextranáz, β -1,3-glukanáz, levanszukuráz, maltáz, pektát-liáz, xilanáz, aminopeptidáz, észteráz, metalloproteáz, szerin-proteáz, β -laktamáz, alkalikus foszfatáz, 3-nukleotidáz, 5-nukleotidáz és egyéb bakteriolitikus enzimek, pl. endo-N-acetilglükózaminidáz, exo-N-acetilglükózaminidáz, endo-N-acetilmuramidáz, exo-N-acetilmuramidáz, N-acetil-muramil-L-alanin-amidáz (Priest 1977).

A *Bacillus* fajok az extracelluláris proteázok fő termelői. Az ipari szektorban számos enzim termeltetését valósítják meg *Bac. subtilis* törzsekkel. Több növénypatogén gomba sejtfala és citoplazmája gazdag fehérjékben, ezért a biokontroll ágensek proteáztermelése gátolhatja a patogéneket.

A proteázok a peptidkötések hidrolízise révén képesek kisebb egységekre bontani a fehérjéket. A proteolitikus enzimeknek két nagy csoportját az endopeptidázok és az exopeptidázok alkotják. Az endopeptidázok a fehérjén belül, míg az exopeptidázok a láncok végein hasítanak. Az exopeptidázok a hasítás helyének függvényében lehetnek szabad α -aminocsoport mellett hasító aminopeptidázok és szabad α -karboxilcsoport mellett hasító karboxipeptidázok. A proteázok másik jellemző tulajdonsága a specificitásuk. A tripszin-típusú proteázok például kizárólag azokat a peptidkötéseket bontják melyekben a lizin vagy arginin karboxilcsoportja vesz részt, míg a kimotripszin-típusú proteázok apoláros, aromás oldalláncot tartalmazó aminosavak (fenilalanin, tirozin, leucin) mellett bontják a kötéseket (Ma és mtsai. 2005).

3.8.2 A *Bac. subtilis* által termelt nem-peptid antibiotikumok

Ezen csoportba sorolhatók a *Bac. subtilis* által termelt poliketidek és a foszfolipidek, illetve egyéb, nem peptid termékek, mint pl. a difficidin, bacillén, makrolaktin, bacilizocin és a 3,3'-neotrehalóz-diamin (NTD) (Wang és mtsai. 2015). Eddig 18 különböző makrolaktint írtak le, melyek a makrolaktin A–N (Gustafson és mtsai. 1989), 7-O-szukcinilmakrolaktin A, 7-O-szukcinil makrolaktin F (Jaruchoktaweechai és mtsai. 2000), 7-O-malonilmakrolaktin A (Romero-Tabarez és mtsai. 2006) és a makrolaktin S. A poliketidek kiemelkedő antibakteriális aktivitással rendelkeznek, mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumokkal szemben hatékonyak. Antivirális aktivitásukról (Herpesz simplex és HIV) Georgy és munkatársai (2007) számoltak be, antitumor hatásukat pedig B16-F10 patkány melanóma rákos sejteken bizonyították (Schneider és mtsai. 2007).

A difficidin és az oxidifficidin telítetlen makrolidszerű szerkezettel rendelkeznek, melyben a foszfát-észter csoport kapcsolódik a 22-tagú, makrociklikus polién lakton foszfát észter gyűrűhöz (Wang és mtsai. 2015). Széles antibakteriális hatásukat írták le, főleg a növénypatogén *Erw. amylovora* fajjal szemben (Chen és mtsai. 2009).

A bacillén egy lineáris vegyület, mely telítetlen enamint tartalmaz két amidkötéssel. Az első az α -hidroxikarbonsavat és a konjugált hexaént tartalmazó ω -hidroxikarboxilsavat köti össze, míg a második a hexaéntartalmú karboxilsavat köti össze egy $(\omega-1)$ aminokarboxilsavval, amiben konjugált trién található (Butcher és mtsai. 2007). Baktériumok elleni hatását a fehérjeszintézis gátlása révén éri el (Wang és mtsai. 2015).

A bacilizocin - 1-(12-metiltetradekanoil)-3-foszfogliceroglicerol - egy antimikrobiális foszfolipid, melyet a *Bac. subtilis* 168 törzsből izoláltak (Wang és mtsai. 2015). Antimikrobiális aktivitással rendelkezik *Sta. aureus*, *Sac. cerevisiae*, *Can. pseudotropicalis* és *Cry. neoformans* ellen is.

Számos *Bacillus* faj termel NTD antibiotikumot, mely autoinducerként saját bioszintetikus operonját aktiválja (ntdABC) (Inaoka és Ochi 2007), és elsősorban *Sta. aureus* és *Kle. pneumoniae* törzseket képes gátolni (Inaoka és mtsai. 2004).

3.9 *Bac. subtilis*-tartalmú biokontroll készítmények

A kereskedelmi forgalomban számos *Bac. subtilis*-alapú készítmény kapható. Ezen készítmények sikerei is bizonyítják a mikroorganizmus biokontrollban betöltött kiemelkedő szerepét, melyet az extracelluláris enzimek és ciklikus lipopeptidek termelésének, a növényi rezisztencia indukciójának és a növényi növekedés serkentésének köszönhet. Az egyik

legismertebb készítmény a Serenade®, melyet Európa több országában forgalmazznak, és többek között szürkepenészes megbetegedések, fitoftóra, lisztharmat, peronoszpóra és bakteriális foltosodás ellen alkalmazható. Szintén *Bac. subtilis*-alapú készítmény a Németországban forgalmazott RhizoPlus®, mely a növények széles spektrumára használható számos patogénnel szemben. Németországban forgalmazzák az FZB24WG, FZB24LI és FZB24TB nevű készítményeket, melyek széles spektrumon használhatók főleg gyökérronthadást és hervadást okozó patogének ellen. Az USA-ban gyapotültetvényeken *Rhizoctonia* és *Fusarium* betegségek ellen bevált készítmény a *Bac. subtilis*-alapú Kodiak®. Gyepeken, erdőkből, dísznövényeken károkat okozó patogének ellen az USA-ban kapható *Bac. subtilis*-alapú készítmény a Rhapsody®. Szintén az USA-ban egy Companion® nevű, *Bac. subtilis*-alapú terméket árulnak, mely a törzs antibiózisa, kompetíciója, növekedésserkentése, és rezisztencia-indukciója révén sikeres számos patogén ellen (Cawoy és mtsai. 2011).

3.10 Spontán sztreptomycin-rezisztens mutáns *Bac. subtilis* törzsek

Hosoya és munkatársai (1998) egy spontán sztreptomycin-rezisztens *Bac. subtilis* törzs emelkedett antibiotikum-termeléséről számoltak be: a vad típushoz képest ötszörös, vagy akár ötvenszeres növekedést tapasztaltak. A vad típusból izolált túltermelő törzsek gyakorisága 3-46%-ig terjedt. A sztreptomycin-rezisztencia oka az *rpsL* génben bekövetkező pontmutáció. A gén a 30S riboszómális protein S12 alegységét kódolja. A változás során az 56. pozícióban lévő lizin aszparaginra, aszparaginsavra, treoninra vagy glutaminra cserélődik. Az antibiotikum-termelés növekedése attól függ, hogy melyik aminosav kerül a lizin pozíciójába. A változás nem minden esetben jár fokozott termeléssel. Kurosawa és munkatársai (2006) ugyanezt a jelenséget írták le egy másik törzsben, ahol fokozott, 1,3-, illetve 1,4-szeres α -amiláz- és proteáztermelésről számoltak be. Yoneda és Maruo (1975) a jelenséget N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin segítségével indukálták *Bac. subtilis* Marburg törzsben. Két-háromszoros α -amiláz-, valamint 5-16-szoros proteáztermelésről számoltak be.

4 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűztük ki:

1. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J izolátum ökofiziológiai jellemzését, növény- illetve gombapatogén mikrobatörzsekkel szembeni *in vitro* antagonista képességeinek felmérését.
2. Kompetíciós képességeinek háttérben álló extracelluláris enzim-, illetve antibiotikum-termelési képességeinek elemzését.
3. A törzsből spontán sztreptomycin-rezisztens mutánsok izolálását, a mutánsok kimotripszin-típusú proteáz termelésének vizsgálatát, a sztreptomycin-rezisztens törzsek *rpsL* génjének szekvenciájában bekövetkezett változások feltárását.
4. A *Bac. subtilis* SZMC6179J törzs enzimtermelésének vizsgálatát különböző környezeti tényezők függvényében.
5. A törzs által termelt ciklikus lipopeptidek, különösképpen szurfaktin-típusú vegyületek jellemzését.
6. Az általunk izolált *Bac. subtilis* SZMC 6179J és a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 168 típus törzs teljes genomszekvenciájának összehasonlító elemzését.

5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 A kísérletek során felhasznált törzsek

Munkánk során a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteménybe helyezett 6179J jelű *Bacillus subtilis* törzset vizsgáltuk, melyet magyarországi talajmintából, paradicsom rizoszférából izoláltunk (Vágvölgyi és mtsai. 2013). A munka során felhasznált további mikroorganizmusokról az **1. melléklet** nyújt áttekintést.

5.2 Alkalmazott anyagok

5.2.1 A kísérletek során alkalmazott táptalajok

- T1: Táptalaj a törzsek fenntartásához: 0,2% glükóz; 0,2% élesztőkivonat; 2% agar
- T2: Táptalaj a sztreptomycin-rezisztens törzsek fenntartásához: 0,2% glükóz; 0,2% élesztőkivonat; 2% agar; 0,01% sztreptomycin
- T3: Táptalaj a fonalagomba-törzsek fenntartásához: 1% glükóz; 0,25% élesztőkivonat; 0,5% malátakivonat; 2% agar
- T4: Táptalaj baktérium-baktérium antagonizmushoz: 1% glükóz; 0,5% pepton; 2% agar
- T5: Besson-féle táptalaj (Besson és mtsai. 1987): 1% glükóz; 0,5% nátrium-glutamát; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% KCl; 0,0005% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,000016% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 2% agar
- T6: Véres agar: 0,4% pepton; 1% glükóz; 0,9% NaCl; 1,5% agar; 5% defibrinált birkavér (Hemoking Biotechnikai Kft.)
- T7: Sziderofór-táptalaj (Hu és mtsai. 2011): 0,12% krómazurol S (Sigma-Aldrich) desztillált vízben oldva; 0,1 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM HCl-ben oldva; 0,72% hexadecil-trimetil-ammónium-bromid desztillált vízben oldva; 2% agar
- T8: Luria-Bertani táptalaj: 1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 1% NaCl; 2% agar
- T9: 1% tributirin; 0,2% élesztőkivonat; 1,5% agar
- T10: 0,2% glükóz; 0,2% élesztőkivonat; 2% agar; 10% tej
- T11: 0,4% húskivonat; 0,4% pepton; 20% zselatin
- T12: 0,2% élesztőkivonat, 0,2% kolloid kitin oldat, 1,5% agar
- T13: 1% keményítő, 0,5% élesztőkivonat, 1,5% agar

5.2.2 Alkalmazott tápoldatok

- TO1: Burgonya-glükóz tápoldat: 0,65% burgonyakivonat; 2% glükóz
- TO2: Élesztő-glükózos tápoldat: 0,2% glükóz; 0,2% élesztőkivonat
- TO3: 1% glükóz; 0,5% élesztőkivonat
- TO4: Tápoldat antibiotikum-termeltetéshez: Besson-féle tápoldat (Besson és mtsai. 1987 nyomán) 1% glükóz; 0,5% nátrium-glutamát; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% KCl ; 0,0005% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,000016% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
- TO5: 1% glükóz; 0,5% pepton
- TO6: 1,5% pepton; 0,3% élesztőkivonat; 0,6% NaCl
- TO7: Brain-Heart Infusion Broth (Sigma-Aldrich): 0,5% marhaszív-kivonat; 0,125% borjúagy-kivonat; 0,25% Na_2HPO_4 ; 0,2% glükóz; 1% pepton; 0,5% NaCl
- TO8: Brain-Heart Infusion Broth (Sigma-Aldrich): 0,5% marhaszív-kivonat; 0,125% borjúagy-kivonat; 0,25% Na_2HPO_4 ; 0,2% glükóz; 1% pepton; 0,5% NaCl ; 0,01% $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- TO9: 0,3% húskivonat; 0,5% zselatin; 0,003% $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- TO10: 0,5% pepszin; 0,3% élesztőkivonat; 0,1% tejkivonat
- TO11: 1% pepton; 0,5% NaCl ; 0,35% Na_2HPO_4 ; 0,15% KH_2PO_4
- TO12: 10% tejpor (Fluka)
- TO13: 1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 0,5% NaCl
- TO14: 0,4% nátrium-glutamát; 0,2% citromsav; 0,05% K_2HPO_4 ; 0,05% vas (III)-ammónium-citrát; 0,05% MgSO_4
- TO15: Difco Antibiotic Medium 3; 0,15% húskivonat; 0,15% élesztőkivonat; 0,5% pepton; 0,35% NaCl ; 0,368% K_2HPO_4 ; 0,132% KH_2PO_4
- TO16: Luria-Bertani tápoldat: 1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 1% NaCl

5.2.3 Reagensek, pufferek

5.2.3.1 Biokémiai reakciókhoz, valamint tenyésztésekhez alkalmazott reagensek és pufferek

- R1 (McIlvain pufferoldat): A törzsoldat: 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
B törzsoldat: 0,1 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- R2 (Clark-Lubs pufferoldat): A törzsoldat: 0,2 M KH_2PO_4
B törzsoldat: 0,2 M NaOH

	C törzsoldat: 0,2 M H ₃ BO ₃
R3 (foszfát puffer):	A törzsoldat: 9,8 M KH ₂ PO ₄ B törzsoldat: 11,8 M Na ₂ HPO ₄
R4 (foszfát puffer):	(pH=6,6) 57% KH ₂ PO ₄ 0,44% Na ₂ HPO ₄
R5 (Amido Black):	60 ml desztillált víz 30 ml CH ₃ OH 10 ml CH ₃ COOH 0,1% amido black
R6 (Lugol-oldat):	0,33% jód 0,66% KI 100 ml desztillált víz

5.2.3.2 Molekuláris vizsgálatok pufferei, reagentái

TE puffer:	10 mM Tris (pH 7) 2 mM etilén-diamin-tetraecetsav dinátrium sója (EDTA)
TAE puffer:	0,4 M Tris-acetát (pH 8) 0,02 M EDTA
Agaróz gél:	TAE puffer 1% vagy 2% agaróz (Lonza) 10 mg/ml etídium-bromid (Sigma)
Molekulasúly-marker:	100 bp Ladder Plus (Fermentas)
Mintafelvívő puffer:	60% C ₃ H ₈ OH 0,25 M brómfenolkék 0,2 M EDTA

5.2.4 PCR-hez szükséges reagenták, primerek

Reagenták	2 mM dNTP mix (ATP, TTP, GTP, CTP) (Fermentas) 10x <i>DreamTaq</i> -polimeráz puffer (Thermo Scientific) <i>DreamTaq</i> -polimeráz (Thermo Scientific)
-----------	--

Indítószekvencia (primer), 10 μ M-os koncentrációban

A PCR vizsgálatokhoz felhasznált primerekről a **3. táblázat** nyújt áttekintést.

3. táblázat. A kísérletekben használt primerek

Felszaporítandó szakasz neve	Primer neve	Primer bázissorrendje
<i>gyrA</i> gén	<i>gyrA</i> -F	5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3'
	<i>gyrA</i> -R	5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3'
<i>rpsL</i> gén	<i>rpsL</i> -BSF2	5'-GTTATAAAACGTAATGAAGGGAG-3'
	<i>rpsL</i> -BSR2	5'-CTCCCTTCATCAATTATGCGT-3'
ITS régió	<i>EUB</i> -ITSF	5'-GCCAAGGCATCCACC-3'
	<i>EUB</i> -ITSR	5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'
<i>bac</i> gén	<i>BACC</i> -ML-F	5'-CAGAGAGTCTATCATTCCGGAT-3'
	<i>BACCI</i> -R	5'-CGCTGATGACTGTTCATGCT-3'
<i>fen</i> gén	<i>fen</i> -F	5'-GTACAGCTCGCCGAATTCTT-3'
	<i>fen</i> -R	5'-GGCTACAATATGCCGGCTGTG-3'
<i>itu</i> gén	<i>ituD</i> -F	5'-ATGAACAATCTTGCCTTTTAA-3'
	<i>ituD</i> -R	5'-TTATTTTAAAATCCGCAAT-3'
<i>myc</i> gén	<i>mycA</i> -F	5'-GACTGGGATTTATCCCATATC-3'
	<i>mycA</i> -R	5'-GATTTTGGTTGACTCTAGCGC-3'
<i>spf</i> gén	<i>sfp</i> -F	5'-ATGAAGATTTACGGAATTAA-3'
	<i>sfp</i> -R	5'-TTATAAAAGCTCTTCGTACG-3'

5.2.5 Enzimvizsgálatokhoz alkalmazott szubsztrátok

Az enzimmérések során alkalmazott szubsztrátokat a **4. táblázatban** tüntettük fel.

4. táblázat. Enzimvizsgálatokhoz alkalmazott szubsztrátok

Alkalmazott kromogén szubsztrátok	Mérhető enzimaktivitás
N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilid	Kimotripszin-típusú proteáz
N-benzoil-Phe-Val-Arg- <i>p</i> -nitroanilid	Tripszin-típusú proteáz
N- α -benzoil-L-Arg- <i>p</i> -nitroanilid	Proteáz
N-acetil-L-Leu- <i>p</i> -nitroanilid	Proteáz
4-nitrofenil- β -D-glükopiranozid	β -glükozidáz
4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glükózaminid	N-acetil-glükózaminidáz
4-nitrofenil-N,N'-diacetyl- β -D-kitobiozid	Kitobiozidáz
4-nitrofenil-palmitát	Palmitoil-észteráz
4-nitrofenil- β -cellobiozid	Cellobiohidroláz

5.2.6 Az analitikai vizsgálatokhoz alkalmazott vegyszerek

Minden, a munka során felhasznált vegyszer analitikai, vagy az elérhető legnagyobb tisztaságú volt.

Vegyszerek:	37%-os HCl (VWR) CH ₃ OH (VWR) C ₂ H ₃ N (VWR) C ₂ HF ₃ O ₂ (Sigma Aldrich) szurfaktin referenciavegyület (Sigma Aldrich) Analitikai tisztaságú víz ultrafiltrálással előállítva, Millipore Milli-Q GradientA10 víztisztító berendezés segítségével (Merck)
Vékonyréteg-lap (TLC):	TLC Silica gel 60 F 254 nm Aluminium sheet 20×20 cm (Merck)

O1 (Vékonyréteg-lap kromatográfiás futtatóelegy):

65 ml CHCl₃

25 ml CH₃OH

4 ml desztillált víz

5.3 Alkalmazott módszerek

5.3.1 *Bacillus* törzsek izolálása, elővizsgálata, azonosítása

A törzsek izolálása magyarországi talajmintákból, paradicsom-rizoszférából történt. A mintákból 5 grammot 50 ml 0,9% NaCl-ban oldottuk, melyből 95°C-os, 15 perces hőkezelést követően 10-es léptékű hígítási sort készítettünk. Az ilyen módon előkezelt mintákból 50 µl-t szélesztettünk T1-es táptalaj felszínére. Az egy hétig 27 °C-on inkubált csészéken megjelenő telepek tisztítását többszöri egysejt tenyészetek létrehozásával és átoltásával végeztük. A törzseket a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteménybe (SZMC) helyeztük.

Az izolálást követően a törzseket *in vitro* antaginizmus tesztekben vizsgáltuk a T1-es táptalajon az alábbi patogénekkal szemben: *Fus. oxysporum*, *Rhi. solani*, *Xan. campestris*, *Pse. syringae*, *Erw. carotovora*. A konfrontációs vizsgálat során a tesztelt baktériumokat és patogén fonalgombákat egymástól 3 cm távolságban, pontoltással oltottuk le három párhuzamosban. A patogén baktérium esetében pedig a baktériumok szuszpenziójából 50 µl-t szélesztettünk a táptalaj felszínére, erre helyeztünk 6 mm átmérőjű papírkorongot, amire a tesztelt baktériumok szuszpenziójából 5µl-t pipettáztunk. Az inkubáció mindkét esetben 5 napig 27 °C-on történt. Kiértékelés során a gátlási zónák sugarát az alábbi módon értékeltük: 1-5 mm (+), 5-15 mm (++) , >15 mm (+++).

Az *in vitro* antaginizmus tesztek során kiválasztott törzsek azonosítása a *gyrA* gén segítségével történt *gyrA*-F és *gyrA*-R primerek (3. táblázat) felhasználásával (Reva és mtsai. 2004). A törzs taxonómiai pozíciójának meghatározását a Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul és mtsai. 1990) segítségével végeztük az National Center for Biotechnology Information weboldalán (www.ncbi.nlm.nih.gov).

5.3.2 A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs ökofiziológia jellemzése

5.3.2.1 A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata különböző tápoldatokban

A törzsből 5×10^6 sejtet 5 ml TO1-TO16 tápoldatba oltottunk. A tápoldatokat Korsten és Cook (1996) illetve Besson és munkatársai (1987) közleményei alapján választottuk ki. Az inkubálás 27°C -on történt 120 rpm-mel rázatva (IKA KS 4000 ic control). A mintavétel időpontjai a következők voltak: 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80, 96, 104, 120, 128, 144, 152, 168 és 172 óra. Az optikai denzitást 620 nm-en határoztuk meg *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasó (BMG Biotech) segítségével. Minden esetben három párhuzamos leoltást használtunk.

5.3.2.2 A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata eltérő hőmérsékleteken

A törzset 20 ml TO1-es tápoldatba oltottuk 10^6 sejt/ml-es végkoncentrációban. A törzs inkubálása állótenyészetként 5, 10, 20, 30, valamint 40°C -on történt. A fentiekhez hasonlóan 15 időpontos mintavételezést valósítottunk meg a tenyésztési időszak során. A három párhuzamosban leoltott tenyészetek optikai denzitását 620 nm-en mértük.

5.3.2.3 A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata különböző pH-értékeken

A vizsgált törzset 20 ml TO1-es tápoldatba oltottuk 10^6 sejt/ml-es végkoncentrációban. A törzs inkubálása állótenyészetként 27°C -on történt. A vizsgált pH-értékek a következők voltak: 2,2; 4, 6; 8; 10, illetve 6,6; 7; 7,6; 8,6; 9. A mintavételezést, illetve az optikai denzitás meghatározását a fentiekhez hasonlóan valósítottuk meg a három párhuzamos esetén.

5.3.2.4 A törzs növekedési tulajdonságainak vizsgálata különböző vízaktivitási értékeken

A törzset 20 ml TO1-es tápoldatba oltottuk 10^6 sejt/ml-es végkoncentrációban. A törzs inkubálása állótenyészetként 27°C -on történt. A vizsgált vízaktivitási (a_w) értékek 0,995; 0,98; 0,96; 0,9; 0,85 és 0,8 voltak, melyeket NaCl oldattal állítottunk be. A mintavételezést, illetve az optikai denzitás meghatározását a fentiekhez hasonlóan valósítottuk meg mindhárom párhuzamosnál.

5.3.3 Különböző növénypatogén gombákkal, *Trichoderma* törzsekkel, mikotoxintermelő *Aspergillus* törzsekkel, növény- és gombapatogén baktériumokkal szembeni *in vitro* antagonizmus-tesztek

In vitro antagonizmus-tesztekhez az SZMC törzsgyűjteményből növénypatogén gombákat (*Alt. alternata* SZMC 16085, *Alt. solani* SZMC 6241J, *Arm. gallica* SZMC 24095, *Arm. mellea* SZMC 24132, *Arm. ostoyae* SZMC 24129, *Bot. cinerea* SZMC 14526, *Bip. bicolor* SZMC 13055, *Col. gloeosporioides* SZMC 16086, *Cur. spicifera* SZMC 13088, *Fus. culmorum* SZMC 11039, *Fus. graminearum* SZMC11030, *Fus. moniliforme* SZMC 11046, *Fus. oxysporum* SZMC 6237J, *Fus. solani* SZMC 11057F, *Pho. cucurbitacearum* SZMC 16088, *Phy. infestans* SZMC 6246J, *Rhi. solani* SZMC 21048, *Scl. sclerotiorum* SZMC6250J) (**1. melléklet**) választottunk.

Ezen felül a tesztekhez a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményből a *Tri. harzianum*, *Tri. pleurotica*, *Tri. pleuroti* és *Tri. aggressivum* fajokból 29 törzset választottunk (**1. melléklet**). A választott *Trichoderma* törzsek mindegyike a laskagomba, illetve csiperke zöldpenészes megbetegedését okozza. Az *in vitro* antagonizmus-tesztekben a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs toxintermelő *Aspergillus* törzsek elleni hatását is tanulmányoztuk. Ehhez az SZMC-ből az *Asp. awamori*, *Asp. flavus* és *Asp. niger* fajokból 24 bizonyítottan toxintermelő törzset választottunk (**1. melléklet**). A tenyésztést 3 független párhuzamosban végeztük.

A konfrontációs tesztek során a *Bac. subtilis* törzs patogén gombák micéliumnövekedésére gyakorolt hatását T1 illetve T5 táptalajon teszteltük. 6 mm átmérőjű micélium-korongokat vágunk ki dugófúróval a növénypatogén gombák 7 napos telepeinek széléről, majd a konfrontációs táptalajokra helyeztük őket a Petri-csészék közepétől mért 1,5 cm-es távolságra. Ezt követően 5 µl-t pipettáztunk a 2×10^7 sejt/ml koncentrációjú *Bac. subtilis* SZMC 6179J szuszpenzióból a Petri-csészék közepétől mért 1,5 cm-es távolságra, ellenkező irányban. A két táptalajra helyezett mikroorganizmus távolsága az *Armillaria* törzsek kivételével így 3 cm-re lett beállítva. A táplemezeket az *Armillaria* törzsek kivételével 7 napig, 27 °C-on inkubáltuk, fényképeztük majd Nene és Thapliyal (1982) alapján számoltunk biokontroll index-értékeket (BCI) 3 párhuzamos mérésből az alábbiak szerint: $(C - T)/C \times 100$, ahol C a patogén gomba telepének sugara a baktérium jelenléte nélkül, T pedig a patogén gomba telepsugara a baktérium jelenlétében. Az indexet annyiban módosítottuk, hogy minden esetben a patogén gomba telepsugarát maximalizáltuk 30 mm-re.

Az *Armillaria* törzsek esetében a kísérletet a törzsek lassú növekedése miatt módosítottuk, mely szerint a patogén gomba és a vizsgált baktérium között a távolságot 2 cm-

re állítottuk be, illetve a baktérium leoltása a gomba leoltását követő 7. napon történt. A csészék kiértékelését a fent leírt módon, a leoltást követő 4. héten végeztük el.

A baktériumok elleni *in vitro* antagonizmus-tesztekhez rothadó laskagomba-termőestről izolált, számos haszonnövényt (pl. kölest vagy rizst) megtámadó *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16160 törzsét, a gombatermesztésben jelentős károkat okozó *Pse. tolaasii* SZMC 16149 törzsét, illetve a borsó- és paradicsomnövényeken levélfoltosságot okozó *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 törzsét, a paradicsom- illetve burgonyanövényeken klavibakteres betegségeket okozó *Cla. michiganensis* SZMC 0016 törzsét és a gyökérgolyvát okozó *Rhizobium* fajokból a *Rhi. radiobacter* SZMC 21395 és az *All. vitis* SZMC 21396 törzseket választottuk (**1. melléklet**).

A kísérlet során a patogén mikroorganizmusokból 10^7 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk 0,9%-os NaCl oldatban, az elkészített szuszpenzióból 1 ml-t pipettáztunk 20 ml 40 °C-os T4 táptalajba. A bedermedt táptalajok közepére 5 mm átmérőjű papírkorongot helyeztünk, melyre $5 \mu\text{l}$ 5×10^5 sejt/ml koncentrációjú *Bac. subtilis* SZMC 6179J szuszpenziót pipettáztunk. A csészéket 25 °C-on inkubáltuk, a kísérletet három párhuzmosban végeztük. A kiértékelést az inkubáció 3. napján a gátlási zóna sugarának papírkorong szélétől történő lemérésével valósítottuk meg.

5.3.4 A törzs növény-gombapatogén baktériumok növekedésére gyakorolt hatása

Tápotdatban kivitelezett, *in vitro* tesztjeinkhez a *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16160 törzsét, az SZMC 16149-es jelű gombapatogén *Pse. tolaasii*-t, a *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 törzsét, a *Cla. michiganensis* SZMC0016 törzsét, valamint a *Rhi. radiobacter* SZMC 21395 és az *All. vitis* SZMC 21396 törzseket választottuk. Kísérleteink során a TO3-as tápotdatot az R3 reagenssel 6, 7 és 8-as pH-ra állítottunk be. A *Bacillus* törzs és a tesztbaktériumok kezdeti sejtkoncentrációja egyaránt 10^6 sejt/ml volt. A kompetíciót mindhárom pH-értéken három párhuzamosban vizsgáltuk valamennyi fentebb felsorolt baktériumtörzsszel szemben. A lombikokat 6 napig, 27 °C-on, 120 rpm-en rázattuk (IKA KS 4000 ic control). A 2., 4., illetve 6. napon vettünk mintát a tenyészetek különböző pH-n történő növekedésének követéséhez, illetve a későbbi DNS-kinyeréshez. A növekedési vizsgálatoknál optikai denzitást mértünk 620 nm-en *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasóval (BMG Biotech).

A törzsek molekuláris vizsgálatához a DNS-kivonást az AquaGenomic Microbe Protocol alapján végeztük. 1 ml-nyi tenyészet centrifugálását követően $50 \mu\text{l}$ 1 mg/ml

koncentrációjú lizozim oldatot pipettáztunk a sejtekre, majd 1 óra inkubációt követően a sejteket centrifugáltuk (5 perc, 10000 g) és 100 µl Aqua Genomic Solution-t, 50 µg 0,5-1 mm átmérőjű üveggyöngyöt, illetve 1 µl 1 mg/ml koncentrációjú proteináz K-t mértünk a sejtekre. Ezt követően a sejteket 65 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd egy rövid, magas hőmérsékletű inkubációt (95 °C, 10 perc) követően a mintákat kémcsőkeverő segítségével kevertük, centrifugáltuk, majd izopropanollal kicsaptuk a DNS-t. A DNS-t még háromszor mostuk 70%-os etanollal, majd vákuumban szárítottuk. Az üledéket ddH₂O-ban vettük föl, mely már alkalmas volt PCR-es munkákhoz.

Az általunk létrehozott mikrobiális közösséget a riboszómális intergénikus elválasztó szakasz analízisével (RISA) vizsgáltuk. A baktériumok esetében a riboszóma kis és nagy alegységeinek 16S és 23S RNS-eit kódoló génszakaszok közötti területet nevezik *internal transcribed spacer* (ITS) régiónak. Ez a szakasz nem csak nukleotid-szekvenciájában, de méretében is jelentős eltéréseket mutat az egyes fajok esetében, ezáltal alkalmas a törzsek azonosítására ez a módszer. Az egyes baktériumfajok ITS-méretét *in silico* PCR-rendszer segítségével vizsgáltuk (<http://insilico.ehu.es/PCR>); San Millán RM és mtsai. 2013). Az ITS-régiók felszaporítását a **3. táblázat**ban feltüntetett *EUB-ITSF* és *EUB-ITSR* indítószekvenciák segítségével végeztük. A PCR-elegyek összetétele a következő volt (25 µl-re): 2,5 µl 10x *DreamTaq*-polimeráz puffer (Thermo Scientific), 200 µM dNTP mix (Fermentas), 0,25-0,25 µM forward és reverz indítószekvencia, 1 egység *DreamTaq*-polimeráz enzim (Thermo Scientific), 100 ng DNS-templát. A felszaporításhoz MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD) készüléket alkalmaztunk a következő hőmérsékleti profil beállításával: 95 °C, 5 perc; melyet 30 ciklus (95 °C, 90 másodperc; 55 °C, 1 perc; 72 °C, 90 másodperc) követett, majd zárásként 5 perc 72 °C-on. A 4 V/cm-es elektroforézis 2%-os agaróz gélben történt, etídium-bromidos utófestést alkalmazva. A gél kiértékeléséhez az UVP BioDoc-It™ System UV Transilluminator készüléket használtuk.

5.3.5 A törzs sziderofórtermelésének, lipáz, kazeináz, zselatináz, kitináz aktivitásának és keményítóbontásának vizsgálata

A sziderofór termelés vizsgálata során T7-es táptalajt készítettünk, melyre T8-as fedőagart öntöttünk, majd 10⁶ sejt/ml-es koncentrációjú, 24 órás három párhuzamosban leoltott *Bac. subtilis* SZMC 6179J tenyészetből 5 µl-t pipettáztunk a táplemez közepére helyezett, 6 mm átmérőjű papírkorongra. A Petri-csészéket 1 hétig, 25 °C-on inkubáltuk, majd mértük a telepek körül megjelenő narancssárga gyűrű sugarát.

A törzs lipáz aktivitását a tributirintartalmú T9-es táptalajon, a kazeináz aktivitást a T10-es táptalajon, az extracelluláris kitináz termelésének vizsgálatát a T12-es táptalajon, a keményítő bontásának detektálását a T13-as táptalajon valósítottuk meg. A táptalajokra kacsapontban oltottuk le a törzset, három párhuzamosban. Vizsgáltuk az SZMC 6179J törzs zselatináz aktivitását is zselatin-elfolyósítási teszttel a T11-es táptalajon. Öt ml táptalajt öntöttünk félkémcsövekbe és annak felszínére oltottuk a törzset. A Petri-csészéket, illetve a félkémcsöveket 1 hétig, 25 °C-on inkubáltuk. A zselatináz aktivitás vizsgálata során detektáltuk a zselatin elfolyósítását a kémcsövekben. A kiértékelést megelőzően a kitináz vizsgálata során 5 ml R5-ös oldatot, a keményítő bontásának vizsgálata során pedig 5 ml R6-os oldatot pipettáztunk a csészékre. A csészék kiértékelése során a feltisztulási zónák sugarát mértük a telep szélétől.

5.3.6 Extracelluláris enzimek termelésének vizsgálata kromogén szubsztrátokkal

A törzs 24 órás tenyészetéből 10^6 sejt/ml végkoncentrációban a TO1, a TO3, a TO4, a TO6 és a TO15 tápoldatok kerültek leoltásra, három párhuzamosban. A tenyésztés 27 °C-on történt 5 napig, 120 rpm-el rázatva (IKA KS 4000 ic control). Az 5. napon a tenyészetek optikai denzitását 620 nm-en mértük *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasóval (BMG Biotech). Az enzimaktivitások mérése a sejtmentes fermentléből történt a **4. táblázatban** feltüntetett kromogén szubsztrátok segítségével.

Az enzimmérések céljára a szubsztrátokból 3 mM-os törzsoldatot készítettünk dimetilszulfoxid (DMSO) felhasználásával. A mikrotiterlemez mintahelyeire 50 µl-t pipettáztunk a sejtmentes fermentléből, melyhez 50 µl-t adtunk a szubsztrát-törzsoldatokból, és szintén 50 µl-t a pH=6,6-os foszfát pufferből. Az enzimek működése során az egyébként színtelen szubsztrátok paranitrofenol, illetve paranitroanilin része lehasad, sárgulást eredményezve, mely 405 nm-es hullámhosszon mérhető. A mérést *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasóval (BMG Biotech) végeztük, 20 perc 27 °C-on történő inkubációt követően. Az enzimaktivitások mértékét unitban (U) adtuk meg, 1 U az az enzim mennyiség, amely percenként 1 µmol paranitrofenolt/paranitroanilint szabadít fel adott reakciókörülmények között.

5.3.7 Sztreptomicin-rezisztens törzsek izolálása, spontán sztreptomicin-rezisztens mutáns törzsek kimotripszin-típusú proteáz-termelésének vizsgálata, a törzsek *rpsL* génszekvenciáinak elemzése

A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs sejtjeit 0,9%-os NaCl oldatban szuszpendáltuk 5×10^7 sejt/ml koncentrációban. Ezt követően 50 μ l szuszpenziót szélesztettünk T2 táplemezekre. A kapott telepeket egysejt-tenyészetek létrehozásával és átoltásával tisztítottuk, továbbra is 100 μ g/ml sztreptomicint tartalmazó táptalajon.

A kapott sztreptomicin-rezisztens mutánsokat T2 táptalajon tartottuk fenn szobahőmérsékleten. Hosszútávú tárolásuk -20 °C-on, glicerines tápoldatban történt.

Az enzimtermelés vizsgálata során a 24 órás tenyészeteket 10^6 sejt/ml végkoncentrációban oltottuk le, három párhuzamosban a TO4 tápoldatba. A tenyésztés 5 napon keresztül történt 27 °C-on, 120 rpm-mel rázatva (IKA KS 4000 ic control). Az enzimaktivitások mérése a sejtmentes fermentléből történt. Szubsztrátként az N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid kimotripszin-típusú proteáz szubsztrátot alkalmaztuk. Az enzim mérése az **5.3.6 fejezetben** leírt módon történt.

A törzsek molekuláris vizsgálatához a DNS-kivonást az **5.3.4 fejezetben** részletezett AquaGenomic Microbe Protocol alapján végeztük 24 órás tenyészetből. A DNS-kinyerést követően az *rpsL* gén felszaporítását a saját tervezésű *rpsL*-BSF2 és *rpsL*-BSR2 primerpárral valósítottuk meg (**3. táblázat**). A PCR-elegyek összetétele a következő volt (25 μ l-re): 2,5 μ l 10x *DreamTaq*-polimeráz puffer (Thermo Scientific), 200 μ M dNTP mix (Fermentas), 0,25-0,25 μ M forward és reverz primer, 1 egység *DreamTaq*-polimeráz enzim (Thermo Scientific), 100 ng DNS templát. A felszaporításhoz MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD) készüléket alkalmaztunk a következő hőmérsékleti profil beállításával: 94 °C, 5 perc; melyet 35 ciklus (94 °C, 30 másodperc; 50 °C, 40 másodperc; 72 °C, 1 perc) követett, majd zárásként 3 perc 72 °C-on. A gél kiértékeléséhez az UVP BioDoc-It™ System UV Transilluminator készüléket használtuk. A 4 V/cm-es elektroforézis 2%-os agaróz gélben történt, etídium-bromidos utófestést alkalmazva.

A Szegedi Biológiai Kutatóközpont munkatársai ABI 373A DNS automata szekvenáló készülékkel végezték el a PCR-termékek nukleotidsorrendjének megállapítását. Az adatok kiértékelését a CLUSTAL X 2.1 programmal végeztük (Thompson és mtsai. 1997).

5.3.8 Kimotripszin-típusú proteáz termelésének időbeni vizsgálata

Az izolátumot TO4-es tápoldatba oltottuk. A tápoldatokban a baktériumsejtek végkoncentrációja 10^6 sejt/ml volt. Az inkubáció $27\text{ }^\circ\text{C}$ -on történt 7 napon keresztül, 120 rpm-mel rázatva (IKA KS 4000 ic control). Napi mintázást követően a sejtmentes felülúszóból történt enzimmérés az N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid szubsztrát segítségével az **5.3.6 fejezetben** leírtak szerint. Minden esetben három párhuzamos leoltást végeztünk.

5.3.9 Különböző szén-illetve nitrogénforrások hatása a kimotripszin-típusú proteáz termelésére

A szén- és nitrogénforrások kimotripszin-típusú proteáz termelésére gyakorolt hatásának vizsgálata módosított TO4-es tápoldatban történt, melyben a glükózt 1% (m/V%) koncentrációban az alábbi szénforrásokra cseréltük: adonit, cellobióz, D-alanin, D-ribóz, D-xilóz, eritrit, etanol, fruktóz, galaktóz, glicerin, keményítő, L-arabinóz, L-ramnóz, L-triptofán, mannit, m-inozit, nátrium-acetát, szacharóz, szorbit, trehalóz.

A nitrogénforrások hatásának vizsgálatokor a nátrium-glutamátot ammónium-szulfátra, L-alaninra, L-aszparaginsavra, L-ornitinre, L-prolinra, L-szerinre, L-tirozinra, L-treoninra és nátrium-nitrátra cseréltük 0,5% (m/V%) koncentrációban. Minden esetben 10 ml tápoldatot készítettünk, melyet 24 órás 10^7 *Bac. subtilis* SZMC 6179J sejtinokulummal oltottunk le. Az inkubáció 5 napon keresztül történt 120 rpm-mel rázatva (IKA KS 4000 ic control) $27\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A tenyésztést 3 független párhuzamosban végeztük. Az 5. napon optikai denzitást mértünk 620 nm-en. Illetve az **5.3.6 fejezetben** leírt enzimmérési metodika alapján az N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid szubsztrát segítségével a kimotripszin-típusú proteáz termelését vizsgáltunk.

5.3.10 Növekedés- és enzimtermelés-optimalizálási kísérletek

Az első kísérlethez a TO3 tápoldatban a glükóz és az élesztő mennyiségét, illetve a mintavételi időpontokat változtattuk az **5. táblázat** szerint. A második kísérlet során a TO4-es tápoldatot alapul véve változtattuk a glükóz, a nátrium-glutamát és a réz koncentrációját a **6. táblázat** alapján. A harmadik kísérlet során a TO4-es tápoldatot alapul véve változtattuk a glükóz, a nátrium-glutamát és a vas koncentrációját a **7. táblázat** szerint.

A kísérleteknél a baktériumsejtek végkoncentrációját mindhárom párhuzamos esetében 10^6 sejt/ml értékre állítottuk be. Az inkubáció $27\text{ }^\circ\text{C}$ -on történt 10 napig, 120 rpm-mel rázatva (IKA KS 4000 ic control). A második és a harmadik kísérlet során a mintavételezést az 5. napon

valósítottuk meg. A mintavételi időpontokban 620 nm-en optikai denzitást, illetve a kimotripszin-típusú proteáz termelődését vizsgáltuk az **5.3.6 fejezetben** leírtak szerint. A kísérletben a változó faktorok generálását, valamint az adatok kiértékelését és ábrázolását a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével valósítottuk meg. Az ábrázolás során a kísérlettervezésben használt válaszfelületi módszerként a Box-Behnken elrendezést alkalmaztuk.

5. táblázat. A Design-Expert 7.1 szoftver segítségével generált kísérlet-kombinációk a glükóz, élesztőkivonat és a tenyésztési idő növekedésre és kimotripszin-típusú proteáz termelésére gyakorolt hatásának vizsgálatára

A kombináció sorszáma	Glükóz (g/l)	Élesztőkivonat (g/l)	Mintavétel napja
1.	11	1	10
2.	2	5,5	1
3.	11	5,5	5,5
4.	11	5,5	5,5
5.	2	10	5,5
6.	2	5,5	10
7.	20	5,5	10
8.	2	1	5,5
9.	11	5,5	5,5
10.	20	1	5,5
11.	11	10	10
12.	11	5,5	5,5
13.	20	5,5	1
14.	11	5,5	5,5
15.	20	10	5,5
16.	11	1	1
17.	11	10	1

6. táblázat. A Design-Expert 7.1 szoftver segítségével generált kísérlet-kombinációk a glükóz, nátrium-glutamát és réz-szulfát növekedésre és kimotripszin-típusú proteáz termelésére gyakorolt hatásának vizsgálatára

A kombináció sorszáma	Glükóz (g/l)	Nátrium-glutamát (g/l)	CuSO ₄ ×5H ₂ O (mg/l)
1.	15,5	10	1
2.	15,5	5,5	20,5
3.	15,5	10	40
4.	15,5	5,5	20,5
5.	15,5	1	40
6.	1	5,5	1
7.	1	10	20,5
8.	1	5,5	40
9.	30	5,5	40
10.	1	1	20,5
11.	15,5	5,5	20,5
12.	30	1	20,5
13.	15,5	1	1
14.	15,5	5,5	20,5
15.	15,5	5,5	20,5
16.	30	10	20,5
17.	30	10	20,5

7. táblázat. Változtatott faktorok és variációik a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével generálva glükóz, nátrium-glutamát és vas-szulfát növekedésre és kimotripszin-típusú proteáz termelésére gyakorolt hatásának vizsgálatára

A kombináció sorszáma	Glükóz (g/l)	Nátrium-glutamát (g/l)	FeSO ₄ ×7H ₂ O (mg/l)
1.	30	5,5	40
2.	15,5	5,5	20,5
3.	15,5	5,5	20,5
4.	30	1	20,5
5.	15,5	5,5	2,5

6.	15,5	5,5	20,5
7.	15,5	10	1
8.	15,5	1	40
9.	30	5,5	1
10.	1	5,5	1
11.	1	1	20,5
12.	15,5	10	40
13.	15,5	1	1
14.	1	10	20,5
15.	15,5	5,5	20,5
16.	1	5,5	40
17.	30	10	20,6

5.3.11 Különböző fémek hatása a kimotripszin-típusú proteáz termelésére és aktivitására

A vizsgált baktériumtörzs 24 órás tenyésztését három párhuzamosban 10^6 sejt/ml végkoncentrációban módosított TO4 tápoldatba oltottuk. A TO4 tápoldatot a leoltást megelőzően 0,1, 0,5 és 1 mM-os koncentrációban, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$, illetve $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ nehézfémekkel egészítettük ki. Kontrollként további fémionok nélküli TO4 tápoldatot alkalmaztunk. A 120 rpm-el rázatott (IKA KS 4000 ic control), 27 °C-os inkubációt követően az 5. napon optikai denzitást mértünk 620 nm-en, *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasóval (BMG Biotech). A sejtmentes felülúszóból a kimotripszin-típusú proteáz enzim termelését az **5.3.6 fejezetben** leírtak szerint vizsgáltuk.

A vizsgálatba bevont törzs 24 órás előtenyésztését követően a TO4 tápoldatot 10^6 sejt/ml végkoncentrációban oltottuk le az enzim aktivitásának vizsgálatához. Kontrollként további, fémionok nélküli TO4 tápoldatba oltottuk le az SZMC 6179J jelű törzset. Minden esetben három párhuzamos leoltást végeztünk. A 120 rpm-el rázatott (IKA KS 4000 ic control), 27 °C-os inkubációt követően az 5. napon a sejtmentes felülúszóból kimotripszin-típusú proteáz enzim termelődését vizsgáltuk $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$, illetve $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ jelenlétében, az N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid szubsztrát felhasználásával. 50 μl sejtmentes felülúszóhoz 50 μl -t pipettáztunk 4 mM, 2 mM és 0,4 mM koncentrációban a fent felsorolt oldatokból. A szubsztrátból 50 μl 4 mM-os DMSO-ban oldott

oldatot vittünk a mikrotiterlemezre, majd a pH-t 50 μ l, 6,6-os pH-jú foszfát pufferrel állítottuk be a reakció során. A felszabaduló *p*-nitroanilin mennyiségét 405 nm hullámhosszon *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasóval (BMG Biotech) mértük 20 perc inkubációt követően.

5.3.12 Herbicidek és fungicidek hatása az enzimtermelésre és az enzimaktivitásra

Kísérleteinkhez öt olyan vegyületet választottunk, melyek napjainkban számos növényvédőszerben megtalálhatók. Három herbicid, a klór-toluron, a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav és a linuron, valamint két fungicid, a karbendazim és mankozeb hatását vizsgáltuk. A kísérlet során 10 ml TO4-es tápoldatba oltottunk 10^7 sejtet a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzsből. A vizsgált vegyületekből 2,5, 1,25, 0,625 és 0,3125 mM-os törzsoldatokat készítettünk metanolban, melyekből 100 μ l-t mértünk a tápoldatokba, ezáltal 25, 12,5, 6,25 és 3,125 μ M-os koncentráció-értékeket beállítva a vizsgált anyagokból. Kontrollként 100 μ l metanollal kiegészített tápoldatot használtunk. Az inkubáció rázatott tenyészetben (120 rpm, IKA KS 4000 ic control) 27 °C-on 9 napig zajlott, a 3., 6. és 9. napon történt mintavétellel. A mintavételi napokon, 620 nm-en optikai denzitást mértünk, illetve a kimotripszin-típusú proteáz enzim termelődését detektáltuk az **5.3.5 fejezetben** leírtak szerint. Kísérleteinket minden esetben 3 biológiai párhuzamosban végeztük.

A három párhuzamosban leoltott *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs 24 órás előtenyésztését követően szuszpenziót készítettünk, majd 10^6 sejt/ml végkoncentrációban TO4 tápoldatba oltottuk az enzimaktivitás vizsgálatához. Kontrollként peszticidek nélküli TO4 tápoldatba oltottuk le a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzset 3 párhuzamosban. A 120 rpm-el rázatott (IKA KS 4000 ic control), 27 °C-os inkubációt követően az 5. napon a sejtmentes felülúszóból a fent leírt enzimméréseket alapul véve N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid szubsztrát segítségével kimotripszin-típusú proteáz enzim termelődését vizsgáltuk klór-toluron, 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, linuron, karbendazim és mankozeb jelenlétében. Az enzimmérés során 50 μ l sejtmentes felülúszóhoz pipettáztunk 100, 50, 25, 12,5 és 6,5 μ M-os koncentrációban a fent vizsgált vegyületek oldataiból. A szubsztrátból 50 μ l 4 mM-os DMSO-ban oldott oldatot vittünk a mikrotiter-lemezre, majd a pH-t 50 μ l 6,6-os pH-jú foszfát pufferrel állítottuk be. A felszabaduló *p*-nitroanilin mennyiségét 405 nm hullámhosszon *Spectrostar Nano Control* mikrotiterlemez-olvasóval (BMG Biotech) mértük 20 perc inkubációt követően.

5.3.13 A törzs fengicin- és bacilizin-termelésének vizsgálata bioteszttel

Ezen kísérleteinkhez az 5.3.8 fejezetben és 5.3.9 fejezetben ismertetett mintákat vizsgáltuk, illetve ugyanezen kísérleti körülmények között a későbbiekben az 5.3.14 fejezetben részletezett, metanolban felvett, tisztított antibiotikum-tartalmú mintáink fengicin- illetve bacilizintartalmát is elemeztük ezen bioteszttel.

Mivel a törzs esetleges bacilizin-termelése szintén gátlólag hathatott volna a vizsgált növénypatogénre, a vizsgálatban használt T1-es táptalajt kiegészítettük 0,1% N-acetil-glükózammal, semlegesítve ezáltal a bacilizin gátló hatását (Kenig és Abraham 1976). A vizsgálatához az SZMC 6179J törzs által egyik legjobban gátolt *Bip. bicolor* SZMC 13055 fonalagombát választottuk. A bacilizintermelést a *Can. albicans* SZMC 1463 törzsszel követtük nyomon, mely rendkívül érzékeny bacilizinre, de rezisztens fengicinnel és szurfaktinnal szemben (Kenig és Abraham 1976, Vanittanakom és mtsai. 1986). Mindkét kísérleti rendszer során a tesztorganizmusokat masszív oltással a táptalajok felszínére vittük. A táptalajokba 5 mm átmérőjű lyukakat fúrtunk dugófúró segítségével, melyekbe 20 µl-t pipettáztunk a fent említett mintákból. A fermentlevekben előzőleg elvégeztük az enzimek inaktiválását, mintáinkat 95 °C-on inkubáltuk fél órán keresztül. A lyukak szélétől a feltisztulási zóna sugarát 27 °C-on történő, 1 hetes inkubációt követően mértük.

5.3.14 A *Bac. subtilis* SZMC 6179J hemolitikus tulajdonságainak vizsgálata és a szurfaktintermelés vizsgálata direkt bioautográfias módszerrel

Birka-vörösvértesteket tartalmazó T6-os táptalajt készítettünk, melynek közepére 6 mm átmérőjű dugófúróval lyukat fúrtunk. Ebbe a lyukba pipettáztunk 50 µl-t a tisztítási eljárás során kapott, metanolban oldott sejtmentes preparátumokból. A tisztítást Cao és munkatársai (2009) cikke alapján végeztük el. Az inkubáció 27 °C-on történt, 120 rpm rázatási sebesség mellett, három párhuzamosban. Az 5. napon a sejteket centrifugálással kiülepítettük (10000 rpm, 20 perc), majd a felülúszót 37%-os sósav segítségével pH 2-es értékre állítottuk be. A mintát egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a lesavanyított felülúszóból centrifugálással kiülepítettük az antibiotikumokat (4 °C-on, 10000 rpm, 20 perc), felvettük 4 ml desztillált vízben, majd fagyasztva szárítottuk. A szárazanyagot 4 ml metanollal háromszor extraháltuk, nitrogén alatt beszáritottuk és 1 ml metanolban vettük fel. A csészéket 7 napig 27 °C-on inkubáltuk. Egy hét elteltével mértük a lyuk körül feltisztult, áttetsző zóna sugarát.

A direkt bioautográfia módszer kivitelezéséhez húsz ml TO5-es tápoldatba 2×10^7 *Bac. subtilis* SZMC 6179J sejtet oltottunk, három párhuzamosban. A lombikokat 5 napig 27 °C-on,

120 rpm-mel rázattuk (IKA KS 4000 ic control). A tisztítást az **5.3.14 fejezetben** leírtak alapján valósítottuk meg. Az 1 ml metanolban felvett mintákból 10 µl-t Kiesegel 60 F254 vékonyréteg-kromatográfiás lemezre vittük fel, majd kloroform:metanol:víz 65:25:4 arányú elegyével elvégeztük az elválasztást. Ezt követően az egyes sávok előhívását desztillált vízzel valósítottuk meg, és megállapítottuk a detektált vegyületek retenciós faktor (Rf) értékeit, majd a vékonyréteg-lapot műanyag Petri-csészébe helyeztük, és birka-vörösvértesteket tartalmazó T6-os táptalajt öntöttünk rá. A 27 °C-on történő inkubáció harmadik napján megmértük a szurfaktinok hatására keletkező, áttetsző feltisztulási zóna átmérőjét.

5.3.15 Antibiotikumok termelődéséért felelős gének azonosítása

A törzsek molekuláris vizsgálatához a DNS-kivonást az **5.3.4 fejezetben** részletezett Aqua Genomic Microbe Protocol alapján végeztük 24 órás tenyészetből. A DNS-kinyerést követően az azonosítani kívánt szakaszok felszaporítását *BACCI*-R indítószekvencia (Gond és mtsai. 2015) és az iturin gén (Zhu és mtsai. 2013) kivételével általunk tervezett primerpárok segítségével valósítottuk meg (**3. táblázat**).

A primerek tervezését a primertervezés általános szabályainak figyelembevételével a kívánt gén NCBI adatbázisában (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) való megkeresésével kezdtük, majd a primerek tervezését az NCBI Primer-Blast programjának segítségével végeztük el (Ye és mtsai. 2012).

A PCR-elegyek összetétele a következő volt (25 µl-re): 2,5 µl 10x *DreamTaq*-polimeráz puffer (Thermo Scientific), 200 µM dNTP mix (Fermentas), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 1 egység *DreamTaq*-polimeráz enzim (Thermo Scientific), 100 ng DNS templát. A felszaporításhoz MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD) készüléket alkalmaztunk. A bacillomicin, fengicin és mikoszubtilin esetében a következő hőmérsékleti profilt alkalmaztuk: 95 °C, 4 perc; melyet 35 ciklus (94 °C, 1 perc; 56 °C, 1 perc; 72 °C, 1 perc) követett, majd zárásként 10 perc 72 °C-on. Iturin és szurfaktin esetében az alábbi paramétereket használtuk: 95 °C, 4 perc; melyet 35 ciklus (94 °C, 1 perc; 50 °C, 1 perc; 72 °C, 1 perc) követett, zárásként pedig 10 perc 72 °C következett. A gél kiértékeléséhez az UVP BioDoc-It™ System UV Transilluminator készüléket használtuk. A 4 V/cm-es elektroforézis 2%-os agaróz gélben történt, etidium-bromidos utófestést alkalmazva.

Az adatok elemzését 2016. 06. 10-én az internetes *in silico* PCR szerver (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) segítségével végeztük.

5.3.16 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás vizsgálatok

A különböző szurfaktin-vegyületek analitikai vizsgálatára első lépésként a *Bac. subtilis* SZMC6179J törzs TO4 tápoldatba (200 ml) történő leoltását végeztük el három párhuzamos leoltásban. Az Erlenmeyer-lombikokat 5 napon keresztül 27 °C-on, 120 rpm-mel rázattuk (IKA KS 4000 ic control). A tisztítást Cao és munkatársai (2009) cikke alapján végeztük. A N₂ alatt beszárított anyagot 200 µl HPLC-tisztaságú metanolban vettük fel.

Az SZMC 6179J törzs által termelt szurfaktin-homológok azonosítását HPLC/ESI-IT-MS módszerrel valósítottuk meg. Az izokratikus HPLC-elválasztást Akpa és munkatársai (2001) munkája alapján végeztük el Agilent 1090 HPLC-rendszeren (Agilent, Palo Alto, CA, USA), Phenomenex Prodigy analitikai oszlopon (100 × 2,0 mm, 3 µm, Gen-Lab, Budapest, Magyarország) 0,05% trifluoecetsavval kiegészített H₂O és MeCN 20:80 arányú elegyét használva eluensként, 0,2 ml/perc áramlási sebesség mellett. Az oszloptermosztát hőmérséklete 40 °C, míg az injektálási térfogat 1 µl volt. Az MS és MS² vizsgálatok ESI ionforrással ellátott Varian 500-MS ioncsapdás tömegspektrométer segítségével kerültek megvalósításra (**2. melléklet**).

A molekulák nátrium adduktjainak MS² vizsgálata szintén a fent említett ESI- és általános MS-beállítások (**2. melléklet**) mellett zajlott a következő excitációs tárolási szint (m/z)/excitációs amplitúdó (V) értékekkel: m/z 1016 (273,5/3,91), m/z 1030 (277,4/9,96), m/z 1044 (281,3/4,02) és m/z 1058 (285,3/4,07).

A szurfaktin izomerek elnevezése Bonmatin és munkatársai (2003) alapján történt kisebb módosításokkal. Az elsőként felfedezett szurfaktinszekvenciát (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) [Sur] jelöléssel láttuk el, valamint a később leírt szekvenciák esetében a különbségek szemléltetésére [Val2], [Val7] és [Val2,7] jelöléseket alkalmaztunk, a Glu-Val-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Val és Glu-Val-Leu-Val-Asp-Leu-Val szekvenciáknak megfelelően. Ezen alkalmazott technika nem képes megkülönböztetni a Leu és Ile izobár aminosavakat, így ezeket a szekvenciaelemeket Leu/Ile jelöléssel láttuk el. A szurfaktinok szekvenciáiban jelen lévő aminosavak általában AA_n jelöléssel vannak ellátva, ahol n az aminosavak a peptidlánc N-terminális végétől számított pozícióját jelöli. Az MS² spektrumon megfigyelt fragmensionok nevezéktana Roepstorff és Fohlman (1984) illetve Biemann (1990) munkája alapján került alkalmazásra. A nátrium-addicionált fragmensionok belső fragmenseinek elnevezése az y_nb_m nevezéktannak (Hue és mtsai. 2001) megfelelően történt.

5.3.17 A törzs teljes genomjának szekvenálása

A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs izolálása két évvel teljes genomjának szekvenálása előtt történt. Ez idő alatt T1-es táptalajon tartottuk fenn a törzset, és mintegy 50 alkalommal oltottuk át. Mivel a teljes genomszekvenálás ennyi átoltást követően történt, a kapott szekvencia a törzs populáció-genomikai tulajdonságait is tükrözi.

A szekvenálás a BayGen Intézet és a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont Szekvenáló Platformjának közreműködésével történt. A genom szekvenálását új generációs szekvenálási módszerrel, ciklikus ligáló szekvenálással *SOLiD V4* (Life Technologies) rendszeren végeztük. A szekvenciák összerendezéséhez a *CLC Genomics Workbench 4.7.2* (CLC Bio) és az *Omixon Gapped SOLiD Alignment 1.2 plug-in* (Omixon) programokat használtuk. Az annotációban az NCBI *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAAP) programja volt segítségükre (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>).

Az összerendezett read-eket a típus-törzs *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 168 genomjára a *Genomics Workbench 4.7.2* programmal térképeztük. A referenciatörzs genomjának GenBank-i azonosítója: NC_000964. Az NCBI GenBank adatbázisában az általunk feltöltött genom azonosítója CP015004.1.

A törzs teljes genomjának tulajdonságait bemutató diagram a DNAPlotter program segítségével készült (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/dnaplotter>) (Carver és mtsai. 2009).

A törzs pontos taxonómiai pozíciójának meghatározására multilókusz szekvencia-tipizálást (MLST) alkalmaztunk, mellyel Kamada és munkatársai (2015) már sikerrel vizsgálták a *Bac. subtilis*-csoportot. Hét gén (*purH*, *glpF*, *pycA*, *ilvD*, *rpoD*, *tpiA* és *pta*) belső fragmentjét vizsgálták az MLST adatbázis javaslatára (PubMLST; <http://pubmlst.org/bsubtilis/>). Munkánk során a már korábban ismertett, teljes *gyrA* és *gyrB* gén szekvenciák mellett ezt a 7 gént tanulmányoztuk az SZMC 6179J törzsben és további 173 teljes *Bacillus* genomban. Az illesztéseket PRANK v.140603 (Löytynoja 2014) program segítségével, alapértelmezett beállítások mellett végeztük, a szekvencia-illesztések összehangolását és az adatok rendszerezését 9 lókuszra a SequenceMatrix 1.8 (Vaidya és mtsai. 2011) programmal kiviteleztük.

A Maximum Likelihood (ML) fák létrehozásához a raxmlGUI 1.5b1 (Silvestro és Michalak 2012) és a RAxML 8.2.7 (Stamatakis 2014) szoftvereket használtuk, GTR

(Generalised Time Reversible) modellben, gamma eloszlású heterogenitás és 1000 rapid bootstrap ismétlés mellett.

Az egy nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNP) és a deléció/inszerció típusvariánsok (DIP) azonosításához a *CLC Sequence Viewer 6.5.3.* és a *CLC Genomics Workbench 5.1.* szoftvereket használtuk. A feltételezett antimikrobiális génklaszterek kereséséhez az antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org>) szerverét használtuk (Blin és mtsai. 2013, Medema és mtsai. 2011, Weber és mtsai. 2015). A *Bacillus* genomban található profágszekvenciák analízisét a PHAST (<http://phast.wishartlab.com>) kereső rendszerrel valósítottuk meg (Zhou és mtsai. 2011). A profágszerű ICEBs1 elem eloszlását a *Bacillus* törzsekben BLAST segítségével vizsgáltuk (Zhang és mtsai. 2000), a szemléltetést pedig a Kablammo szerverrel végeztük (Wintersinger és Wasmuth 2015).

5.3.18 Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analíziséhez a *GraphPad Prism* (v 6.01 for Windows, GraphPad Software) programot használtuk. A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analízisével, illetve a nem parametrikus teszt *Kruskal-Wallis post hoc* tesztjével végeztük el.

6 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

6.1.1 *Bacillus* törzsek izolálása, elővizsgálata és azonosítása

Az egyesített tenyészetek létrehozását követően 20 *Bacillus* törzssel végeztünk el konfrontációs tesztek (8. táblázat).

8. táblázat. Az izolált *Bacillus* törzsek gátlási zónái.

Izolált baktériumok SZMC számai	<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i>	<i>Erwinia</i> <i>carotovora</i>
SZMC 6157J	++	++	++	-	-
SZMC 6158J	++	+++	++	-	-
SZMC 6159J	+	+++	+	-	-
SZMC 6160J	-	+	++	-	-
SZMC 6161J	++	++	+++	++	-
SZMC 6162J	++	++	++	-	-
SZMC 6163J	+++	+++	++	++	-
SZMC 6164J	+	+++	+	-	-
SZMC 6165J	+	++	-	-	-
SZMC 6166J	+	+++	-	-	-
SZMC 6167J	++	+	++	+	-
SZMC 6168J	+	+++	++	++	-
SZMC 6169J	+++	++	++	-	-
SZMC 6170J	+	+++	+	+	-
SZMC 6171J	+	++	+	-	-
SZMC 6172J	-	+	-	++	-
SZMC 6173J	+	+++	+	++	-
SZMC 6174J	+	+++	++	++	-
SZMC 6179J	+++	+++	+	+++	-
SZMC 6225J	+++	+++	+++	++	-

1-5 mm (+), 5-15 mm (++), >15 mm (+++).

Az *in vitro* antagonizmus-teszteket követően 7 törzsnél tapasztaltunk kiemelkedő antagonista képességeket, ezek azonosítását végeztük el. A *gyrA* gén szekvenciaelemzése alapján az izolált törzseket a **9. táblázat** foglalja össze. További vizsgálatainkhoz a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzset választottuk.

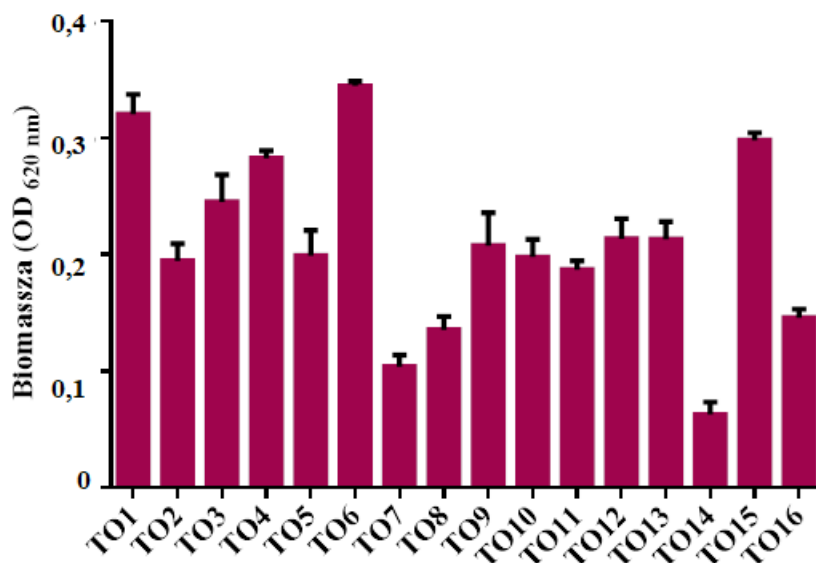
9. táblázat. A kiemelkedő antagonista képességekkel rendelkező 7 azonosított *Bacillus* törzs.

SZMC kód	Faj név	Génbank azonosító
SZMC 6158J	<i>Bac. mojavensis</i>	JX683904
SZMC 6161J	<i>Bac. velezensis</i>	JX683905
SZMC 6163J	<i>Bac. mojavensis</i>	JX683903
SZMC 6168J	<i>Bac. mojavensis</i>	JX683902
SZMC 6170J	<i>Bac. soronensis/licheniformis</i>	JX683907
SZMC 6179J	<i>Bac. subtilis</i>	JX683908
SZMC 6225J	<i>Bac. amyloliquefaciens</i>	JX683906

6.2 A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs ökofiziológia jellemzése

6.2.1 A törzs növekedési tulajdonságai különböző tápoldatokban

A vizsgálat során 16 különböző tápoldatban végeztük a tenyésztést (**4. ábra**).

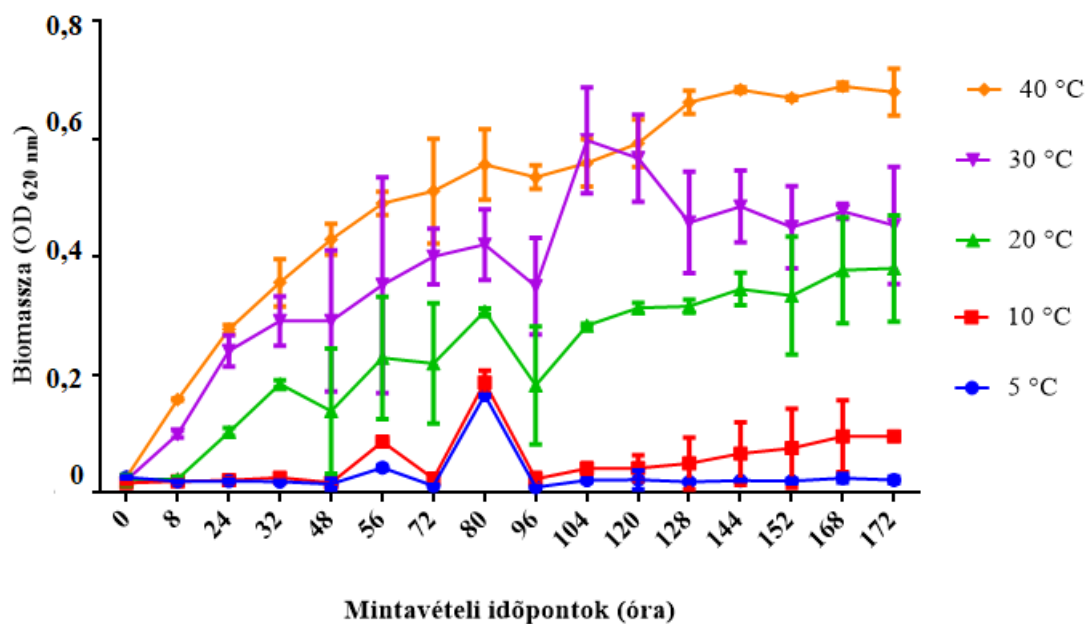


4. ábra. A kísérlet során használt 16 tápoldatban mért optikai denzitások 620 nm-en, 96 óra inkubáció után.

Későbbi enzimvizsgálatainkhoz az 5 szaporodást leginkább támogató tápoldatot (TO1, TO3, TO4, TO6 és TO15) választottuk. A törzs további ökofiziológiai vizsgálatait a TO1-es tápoldatban végeztük el, míg enzimvizsgálatainkhoz a TO4-es tápoldatot választottuk. Korsten és Cook (1996) munkájuk során a burgonya-glükóz táptalajt nevezték meg a legjobbnak a *Bac. subtilis* B246 törzs számára, a legnagyobb hozamot ezen a táptalajon érték el, mely a költséghatékony felhasználás szempontjából is előnyös.

6.2.2 A törzs növekedési tulajdonságai különböző hőmérséklet-, pH- és vízaktivitás-értékeken

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a 40 °C-os hőmérséklet kedvezett leginkább a baktérium növekedésének (5. ábra). A 30 °C, illetve 20 °C-on történő tenyésztés során a 620 nm-es hullámhosszon mért optikai denzitás 0,4 körüli értéket mutatott a tenyésztési időszak végén. A vizsgálatban szereplő legalacsonyabb tenyésztési hőmérsékleteken (5 °C és 10 °C) nem tapasztaltunk számottevő növekedést.

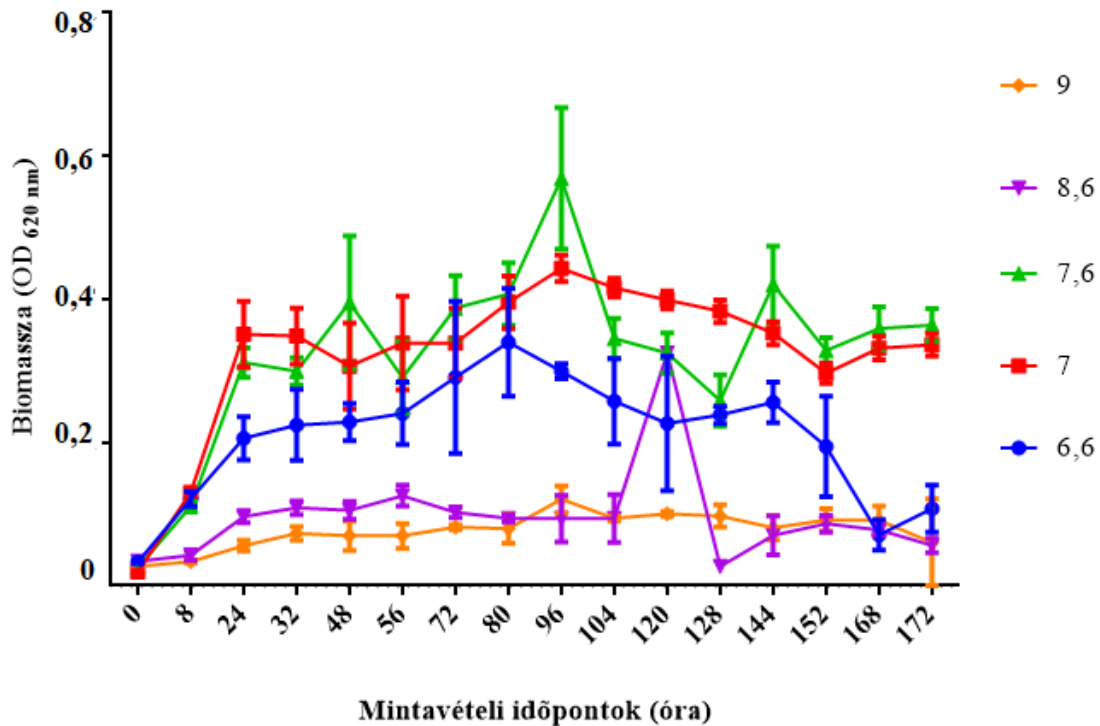


5. ábra. A kísérlet során vizsgált hőmérsékleti értékekhez tartozó optikai denzitások.

Az optimális pH-érték megállapításához az első kísérleti rendszerben 2,2-es; 4-es; 6-os; 8-as és 10-es pH-értékeket állítottunk be.

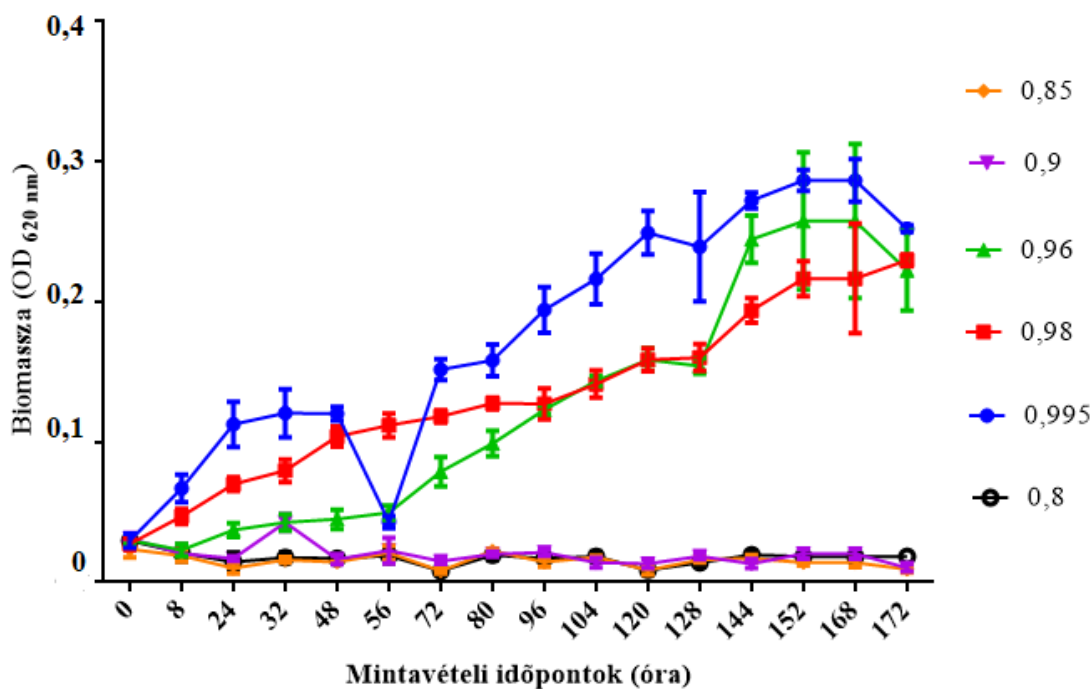
A 6. ábra bemutatott eredmények alapján a 6-os és 8-as pH-értékek között található a vizsgált törzs pH-optimuma. A két kísérletből kiderült, hogy az izolátum növekedéséhez az

optimális pH-érték 7 és 7,6 között található. A magasabb pH-értékeken a biomassza-értékek jelentős mértékben elmaradtak az optimálisnak ítélt pH-n mért adatoktól.



6. ábra. A pH hatása a törzs növekedésére.

A vízakaktivitás növekedésre gyakorolt hatását hat különböző értéken vizsgáltuk 0,8-0,995 között a fentieknek megfelelő, 170 órás tenyésztési időszak alatt. Három vizsgált vízakaktivitás-értéken (0,8, 0,85 és 0,9) nem tapasztaltunk növekedést. A magasabb vízakaktivitás-értékek esetében a vizsgált *Bac. subtilis* törzs hasonló növekedési kinetikát mutatott. A legnagyobb denzitást a 0,995-ös vízakaktivitási értéken mértük, ez tekinthető optimálisnak (7. ábra).



7. ábra. A törzs növekedési kinetikája különböző vízaktivitási értékeknél.

A fenti három ábrán is jól látható a *Bac. subtilis* spórás jellegéből adódó sajátosság növekedési ciklusa.

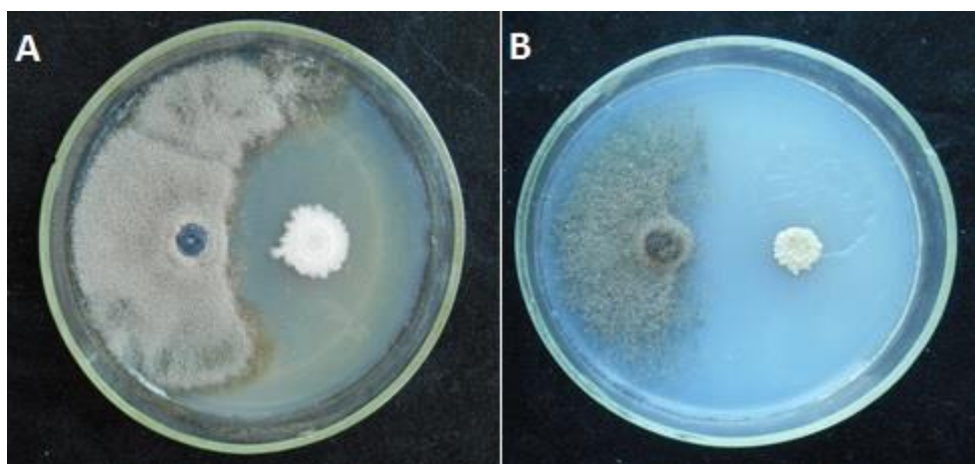
6.3 A törzs különböző növénypatogén gombákkal, *Trichoderma* törzsekkel, mikotoxintermelő *Aspergillus* törzsekkel, növény-gomba patogén baktériumokkal szembeni *in vitro* antagonizmusa

Vizsgálatainkat kétféle táptalajon végeztük: T1-es táptalajon, illetve az enzim- és antibiotikum-termelésnek kedvező, T5-ös, Besson-féle módosított táptalajon (Besson és mtsai. 1987, 5.2.1 fejezet). A 10. táblázatban feltüntetett BCI-értékeket az 5.3.3 fejezetben leírtak szerint határoztuk meg. Az *Arm. mellea* SZMC 24132, *Bot. cinerea* SZMC 14526, *Fus. solani* SZMC 11057F, *Pho. cucurbitacearum* SZMC 1608, *Phy. infestans* SZMC 6246J, *Rhi. solani* SZMC 21048, *Scl. sclerotiorum* SZMC 6250J, *Asp. awamori* SZMC 2997, *Asp. awamori* SZMC 3213, *Asp. awamori* SZMC 3214, *Asp. awamori* SZMC 3218, *Asp. awamori* SZMC 3220, *Asp. awamori* SZMC 3222, *Asp. flavus* SZMC 3234, *Asp. niger* SZMC 2759, *Asp. niger* SZMC 2760, *Asp. niger* SZMC 2764, *Asp. niger* SZMC 2765 és *Asp. niger* SZMC 2769 törzsekkel szembeni antagonizmusok kivételével a T1-es táptalajon mértünk magasabb BCI-értékeket.

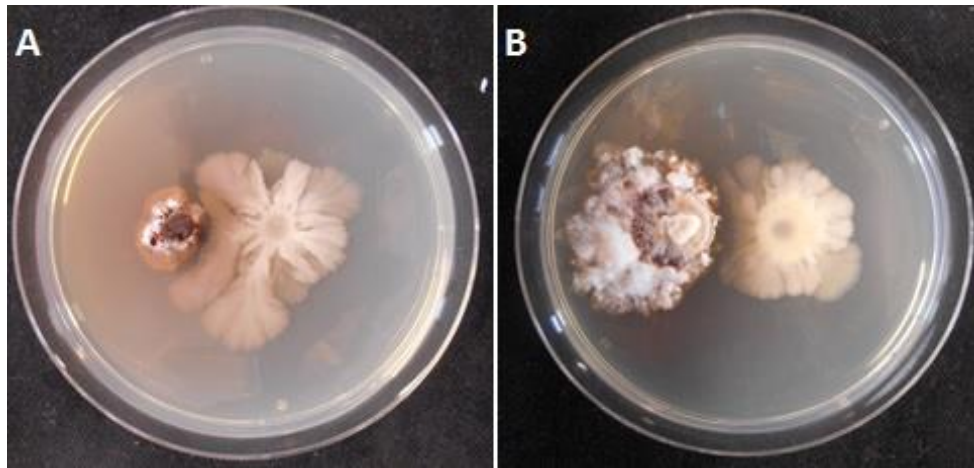
10. táblázat. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs BCI-értékei növénypatogén gombákkal szemben

Növénypatogén gombatörzs	BCI	
	T1 táptalaj	T5 táptalaj
<i>Alt. alternata</i> SZMC 16085	32±10,58	23,53±5,88
<i>Alt. solani</i> SZMC 6241J	22,92±9,55	16,67±0,00
<i>Arm. gallica</i> SZMC 24095	63,46±8,81	51,35±14,04
<i>Arm. mellea</i> SZMC 24132	55,00±13,22	66,67±5,55
<i>Arm. ostoyae</i> SZMC 24129	75,00±5,00	62,50±7,50
<i>Bot. cinerea</i> SZMC14526	66,67±0,00	80,00±3,33
<i>Bip. bicolor</i> SZMC 13055	64,44±3,85	51,11±3,85
<i>Col. gloeosporioides</i> SZMC 16086	42,31±10,18	33,33±6,67
<i>Cur. spicifera</i> SZMC 13060	56,67±3,33	44,44±1,92
<i>Fus. culmorum</i> SZMC 11039	44,44±3,85	0,00±0,00
<i>Fus. graminearum</i> SZMC 11030	18,89±7,70	0,00±0,00
<i>Fus. moniliforme</i> SZMC 11046	26,67±14,05	15,56±5,09
<i>Fus. oxysporum</i> SZMC 6237J	27,27±7,87	22,22±9,62
<i>Fus. solani</i> SZMC 11057F	20,29±12,55	26,67±3,33
<i>Pho. cucurbitacearum</i> SZMC 16088	34,67±4,62	34,72±15,77
<i>Phy. infestans</i> SZMC 6246J	27,78±5,09	63,33±3,33
<i>Rhi. solani</i> SZMC 21048	20,37±3,21	29,33±8,33
<i>Scl. sclerotiorum</i> SZMC 6250J	35,56±13,47	45,56±5,09

Az 50% feletti BCI-értékek vastaggal kiemelve.



8. ábra. *Botrytis cinerea* SZMC14526 törzsszel szembeni *in vitro* antagonizmus-teszt T1 (A ábra) illetve T5 (B ábra) táptalajon az inkubációt követő 7. napon.



9. ábra. *Armillaria gallica* SZMC 24095 (**A ábra**) és *Armillaria ostoyae* SZMC24129 törzssel (**B ábra**) szembeni *in vitro* antagonizmus-teszt T1-es táptalajon a leoltást követő 14. napon.

A vizsgált növénypatogén gombák közül az izolátum a *Bot. cinerea* SZMC 14526 (**8. ábra**), az *Arm. mellea* SZMC 24132, *Arm. gallica* SZMC 24095, az *Arm. ostoyae* SZMC 24129 (**9. ábra**), a *Bip. bicolor* SZMC 13055, *Cur. spicifera* SZMC 13060 és a *Phy. infestans* SZMC 6246J törzsekkel szemben bizonyult a leghatékonyabbnak.

Számos tanulmány bizonyítja a *Bac. subtilis* faj biokontrollban betöltött szerepét. A teljesség igénye nélkül több, a dolgozatban is vizsgált növénypatogénnel szembeni hatékonyságát az alábbi példák is bizonyítják. Touré és munkatársai (2004) a *Bac. subtilis* GA1 törzset *in vitro* és *in vivo* vizsgálták almán szürkepenészes tüneteket okozó *B. cinerea* ellen. Munkájuk során számos, a törzs által termelt fengicin-, iturin- és szurfaktin-családba tartozó homológot és izoformát azonosítottak, és az antibiózis fő okaként erős fungitoxikus hatással rendelkező fengicin-homológokat jelölték meg. Mindemellet a fengicin, szurfaktin és iturin szinergikus gátló hatása sem kizárható. Tatagiba és munkatársai (1998) rózsán tüneteket okozó *Bot. cinerea*-val szemben hatékony izolátumok között *Bac. subtilis* törzset is azonosítottak. Hang és munkatársai (2005) egy, eperlevelekről izolált *Bot. cinerea*-val szemben *in vitro* tesztekben hatékony *Bac. subtilis* S1-0210 törzset vizsgáltak. Abbo és munkatársai (2014) *Alt. alternata* növekedésének gátlására egy *Bac. subtilis* és egy *Bac. megaterium* törzset találtak alkalmasnak. A *Col. gloeosporioides* OGC1 törzs ellen egy chili rizoszférájából izolált *Bac. subtilis* törzs bizonyult hatékonynak (Ashwini és Srividya 2013), a tanulmányban mikroszkópos vizsgálatokkal bizonyították a patogén gomba hifájának lízisét és a sejtfal degradációját. Szubsztrátként *Col. gloeosporioides* OGC1 micéliumot alkalmazva kitináz, glukánáz és celluláz aktivitásokat írtak le, melyek az UV-val kezelt mutánsok esetében nem voltak megfigyelhetők. Az enzimek antagonizmusban betöltött szerepét bizonyították még az

enzimek hővel történő inaktiválásával, tripszines emésztésével és triklórecetsavas kezelésével. Asaka és Shoda (1996) a sztreptomicin-rezisztens *Bac. subtilis* RB14C törzset vizsgálták, mely *in vitro* antibiotikus aktivitást mutatott paradicsom palántadőlését okozó *Rhi. solani* törzssel szemben, iturin A és szurfaktin termelése révén. Az iturin A- és a szurfaktintermelés biokontrollban betöltött szerepét az *lpa-14* gén mutáns törzs előállításával bizonyították. Ezen deletált törzs sem iturin A-t, sem szurfaktint nem termelt, ezáltal a betegség elnyomásában nem is volt olyan hatékony. A törzs *lpa-14* gént hordozó plazmiddal történő transzformálásával visszanyerték a törzs *Rhi. solani*-val szembeni hatékonyságát.

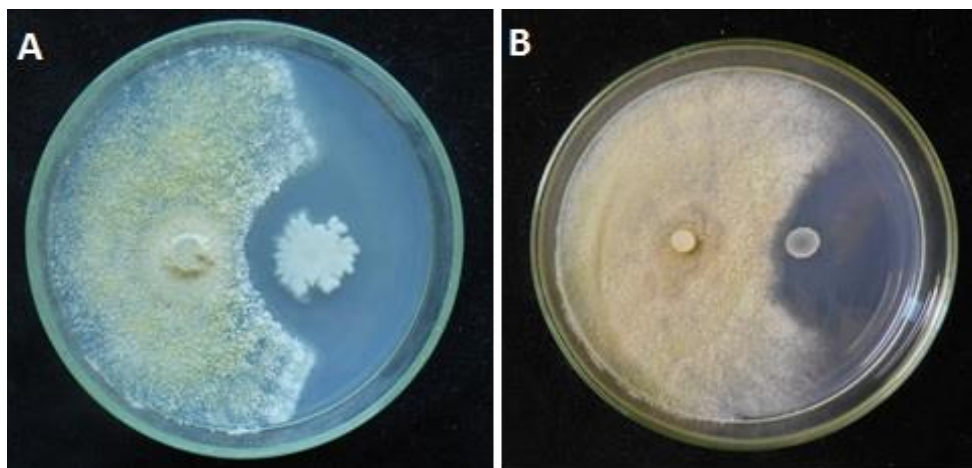
Az általunk vizsgált *Trichoderma* törzsek csiperke- illetve laskagombán okoznak zöldpenészes megbetegedéseket. A legnagyobb gátlást a *Tri. pleuroti* SZMC 12450 törzssel szemben tapasztaltuk T1-es táptalajon (**11. táblázat, 10. ábra**), illetve további 3 *Tri. pleuroti* (SZMC12437, SZMC 12440, SZMC 12450) törzssel szemben tapasztaltunk 50% feletti BCI értéket.

11. táblázat. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs BCI-értékei *Trichoderma* törzsekkel szemben.

<i>Trichoderma</i> törzsek	BCI	
	T1	T5
<i>Tri. aggressivum f. europaeum</i> SZMC 1811	34,44±8,38	21,11±1,92
<i>Tri. aggressivum f. europaeum</i> SZMC 1746	21,11±10,72	18,89±6,94
<i>Tri. harzianum</i> SZMC 1844	31,11±3,84	10,00±0,00
<i>Tri. harzianum</i> SZMC 1847	33,33±0,00	14,44±3,84
<i>Tri. harzianum</i> SZMC 1849	43,33±8,81	12,22±5,09
<i>Tri. harzianum</i> SZMC 12430	30,00±6,66	0,00±0,00
<i>Tri. harzianum</i> SZMC 12431	31,66±41,14	0,00±0,00
<i>Tri. harzianum</i> SZMC 12432	40,00±6,66	0,00±0,00
<i>Tri. harzianum</i> SZMC 12433	46,66±3,33	10,00±3,33
<i>Tri. pleurotica</i> SZMC 1729	38,88±9,62	16,66±6,66
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12436	44,44±9,62	0,00±0,00
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12437	50,00±0,00	0,00±0,00
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12438	47,77±6,93	0,00±0,00
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12439	43,33±8,81	1,11±1,92
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12440	51,11±1,92	0,00±0,00
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12441	38,88±5,09	5,55±1,92

<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12442	47,77±3,84	15,55±10,18
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12443	37,77±3,84	18,88±6,93
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12444	21,11±3,84	13,33±5,77
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12445	53,33±5,77	8,88±1,92
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12446	45,71±12,01	23,33±3,33
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12447	42,22±8,38	36,66±3,33
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12448	44,44±9,62	33,33±0,00
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12449	44,44±50,9	33,33±0,00
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12450	65,55±29,87	43,33±3,33
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12451	40,00±6,66	11,11±5,09
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12452	34,44±1,92	30,00±3,33
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12453	40,00±3,33	3,33±3,33
<i>Tri. pleuroti</i> SZMC 12454	48,88±4,20	10,33±3,33

Az 50% feletti BCI-értékek vastaggal kiemelve.



10. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs *Trichoderma pleuroti* SZMC 12450 törzsszel szembeni *in vitro* antagonizmusa T1 (**A ábra**) és T5 táptalajon (**B ábra**) 1 hét inkubációt követően.

A *Bac. subtilis* gombatermesztésben történő alkalmazására kiváló példa a kereskedelmi forgalomban is kapható Serenade[®] nevű készítmény, mely a *Bac. subtilis* QST713-as törzset tartalmazza. Ezen készítményt Franciaországban sikerrel alkalmazzák a zöldpenészt okozó *Trichoderma* fajok ellen (Védie és Rousseau 2008). Pandin és munkatársai (2016) szintén a *Bac. subtilis* QST713 törzset vizsgálták, melynek protektív hatását írták le *Aga. bisporus* kompozitban, *Tri. aggressivum* törzsszel szemben. Ez a védő hatás a csiperke-termőtesteket is megvédelheti a patogén *Pseudomonas* és *Tri. aggressivum* törzsekkel szemben. Ezen

mikroorganizmusok biofilmképzése során a *Bac. subtilis* tápanyagért folytatott versengésbeli sikere és lipopeptidtermelése előnyt jelent számára. Nagy és munkatársai (2012) laskagomba zöldpenészes megbetegedést okozó *Tri. pleuroti* elleni *in vivo* biológiai védekezésről számoltak be. Munkájuk során *Bac. subtilis*, *Bac. amyloliquefaciens* és sztreptomycin-rezisztens *Bac. amyloliquefaciens* törzsek hatékonyságát bizonyították. Ez azért is fontos, mivel az Európai Unió nem engedélyezi a termesztés során a kémiai peszticidek alkalmazását, így a biológiai védekezés kiemelt szerephez jut a laskagomba termesztésében.

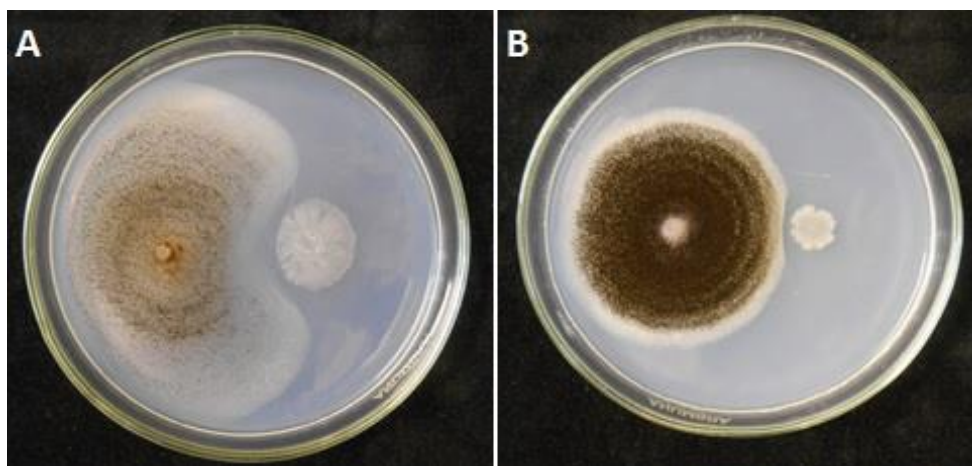
Az *in vitro* antagonizmus-tesztekbe bevont gombák közül az *Aspergillus* fajokkal szemben volt a legkevésbé hatékony a vizsgált törzs. Az *Aspergillus* törzsek közül 3 *Asp. awamori* (SZMC 2985, SZMC 3213, SZMC 3218), 1 *Asp. flavus* SZMC 3233 és 2 *Asp. niger* (SZMC 2761, SZMC 2764) törzs esetében tapasztaltunk 30%-nál nagyobb BCI-értéket, 50%-nál nagyobb biokontroll értékeket egyik törzsszel szemben sem tapasztaltunk (**12. táblázat**). A **11. ábra** mutatja be a *Bac. subtilis* SZMC 6179J izolátum *Asp. niger* SZMC 2761 törzsszel szembeni csekély gátló hatását mind T1, mind T5 táptalajokon.

12. táblázat. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs BCI-értékei *Aspergillus* törzsekkel szemben.

<i>Aspergillus</i> törzsek	BCI	
	T1	T5
<i>Asp. awamori</i> SZMC 2979	18,89±1,92	16,67±0,00
<i>Asp. awamori</i> SZMC 2984	20,00±3,33	18,89±1,92
<i>Asp. awamori</i> SZMC 2985	31,11±3,84	15,56±1,92
<i>Asp. awamori</i> SZMC 2997	6,67±3,33	18,89±3,84
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3006	18,89±17,10	16,67±3,33
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3212	20,00±12,01	14,44±3,84
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3213	37,78±3,84	40,00±8,81
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3214	6,67±2,03	11,11±9,62
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3218	9,33±6,11	35,56±27,14
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3220	0,00±0,00	7,78±1,92
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3221	7,69±3,84	5,56±9,62
<i>Asp. awamori</i> SZMC 3222	4,00±4,00	8,89±1,92
<i>Asp. flavus</i> SZMC 3233	35,56±3,84	17,78±1,92
<i>Asp. flavus</i> SZMC 3234	20,00±17,63	33,33±0,00
<i>Asp. niger</i> SZMC 2759	14,44±3,84	15,56±5,09

<i>Asp. niger</i> SZMC 2760	0,00±0,00	18,89±1,92
<i>Asp. niger</i> SZMC 2761	35,56±3,84	26,67±6,66
<i>Asp. niger</i> SZMC 2764	24,44±8,38	32,22±5,09
<i>Asp. niger</i> SZMC 2765	0,00±0,00	11,11±5,09
<i>Asp. niger</i> SZMC 2766	15,56±1,92	13,33±0,00
<i>Asp. niger</i> SZMC 2769	13,33±12,01	16,67±0,00
<i>Asp. niger</i> SZMC 2770	23,33±8,81	3,33±5,77
<i>Asp. niger</i> SZMC 2772	24,44±8,38	11,11±1,92
<i>Asp. niger</i> SZMC 2773	25,56±6,93	17,78±8,38

A 30% feletti BCI-értékek vastaggal kiemelve.



11. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs *Aspergillus niger* SZMC 2761 törzsszel szembeni *in vitro* antagonizmusa T1 (A ábra) és T5 táptalajon (B ábra) 7 nap inkubációt követően.

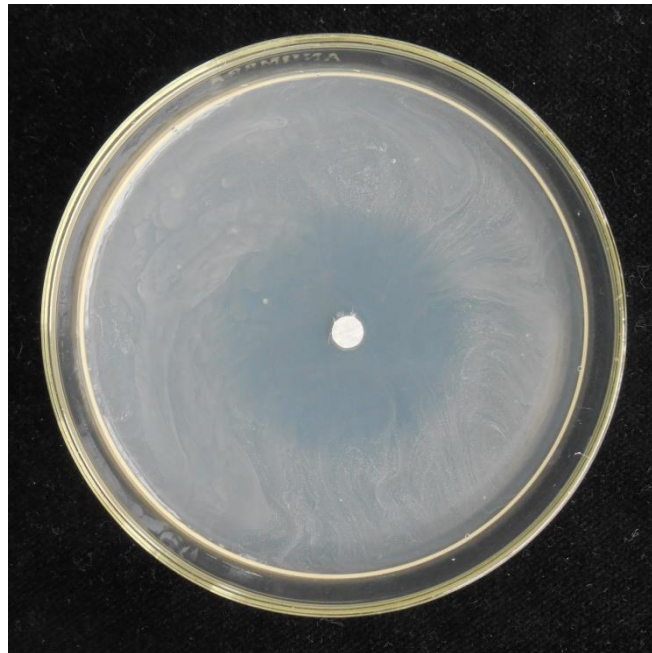
A *Bac. subtilis* törzsek *Aspergillus* törzsekkel szembeni nagyfokú gátlásáról ismertek szakirodalmi adatok. Kimura és Hirano már 1988-ban ismertettek egy *Bac. subtilis* izolátumot, mely kukoricán az *Asp. flavus* NRRL 3357, földimogyorón pedig az *Asp. parasiticus* NRRL 2999 törzs növekedését és aflatoxin-termelését gátolta. Nesci és munkatársai (2005) egy olyan *Bac. subtilis* törzsről (RCB55) számoltak be, melynek antifungális aktivitása van az *Aspergillus* nemzetség Flavi szekciójának törzseivel szemben. Reddy és munkatársai (2009) *Asp. flavus* ellen vizsgálták egy *Bac. subtilis* törzs biokontroll képességeit. Az izolált *Bacillus* törzs 80%-kal csökkentette az *Asp. flavus* növekedését, 72,2%-kal pedig az aflatoxin B1-termelését.

A növénypatogén baktériumokkal szembeni *in vitro* antagonizmus-tesztek során a *Bac. subtilis* SZMC 6179J általi legnagyobb gátlást *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16160 törzsszel szemben tapasztaltuk (13. táblázat, 12. ábra). A *Pse. syringae* pv. *panici* számos gazdaságilag

fontos növényt fertőz, legismertebb példa erre a kölesen és rizsen megjelenő barna levélfoltosodás.

13. táblázat. A patogén baktériumok *in vitro* antagonizmus-tesztjének eredményei.

Növény/gomba-patogén baktériumok	Gátlási zóna (r=mm)
<i>Rhi. radiobacter</i> SZMC 21395	0,66±0,57
<i>All. vitis</i> SZMC 21396	0,66±0,57
<i>Cla. michiganensis</i> SZMC 0016	0,33±0,57
<i>Pse. syringae</i> pv. <i>panici</i> SZMC 16160	15,00±0,00
<i>Pse. tolaasii</i> SZMC 16149	0,00±0,00
<i>Xan. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> SZMC 6185	4,33±0,57



12. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs *Pseudomonas syringae* pv. *panici* SZMC 16160 törzssel szembeni antagonizmusa T4 táptalajon 3 nap inkubációt követően.

A *Bac. subtilis*-t tartalmazó Serenade[®] nevű készítmény egyéb növénypatogén baktériumokkal (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* törzsekkel) szemben is hatékonynak bizonyult (Cawoy és mtsai. 2011). Bais és munkatársai (2004) *Pse. syringae* által fertőzött *Arabidopsis* növények gyökerén vizsgálták a *Bac. subtilis* ATCC 6051 törzs növénypatogén baktérium elleni sikeres hatását. Jung és munkatársai (2014) *Bac. subtilis* DJM-51 törzs erős antibakteriális hatását írták le a paradicsompatógén *Cla. michiganense* subsp. *michiganense*

ATCC 7429 törzsével szemben. Tajalipour és munkatársai (2014) csiperkegombán barnulást okozó *Pse. tolaasii* törzs ellen izoláltak 36 antagonista baktériumtörzset, melyek közül 6, a *Pse. putida*, *Pse. reactants*, *Pse. fluorescens* és *Bac. subtilis* fajokba tartozó baktériumtörzs mutatott kiemelkedő aktivitást a betegséget okozó baktérium ellen.

6.4 A törzs növény-gomba patogén baktériumok növekedésére gyakorolt hatásának elemzése

A kísérletek során három pH-értéken (pH 6, pH 7 és pH 8) vizsgáltuk a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs patogén baktériumokkal (ld. **5.3.5 fejezet**) szembeni elnyomását RISA módszer segítségével. Elsőként a 2., a 4. illetve a 6. napon mintát vettünk a tiszta tenyészetekből, hogy megállapítsuk a törzsek pH-optimumát. Az optikai denzitások mérése során kiderült, hogy mindegyik törzsnek leginkább a pH 8-as érték kedvezett.

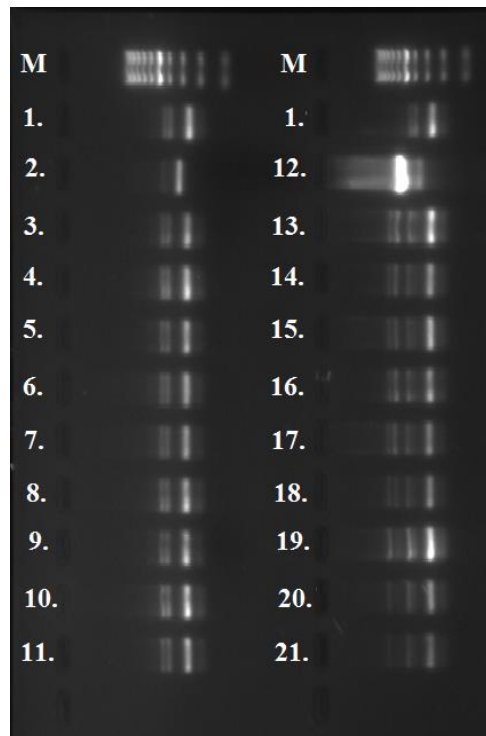
Az ITS-régió felszaporítását az *EUB-ITSF* és *EUB-ITSR* indítószekvenciák segítségével végeztük (lásd **5.3.4 fejezet**). Ezen primerek segítségével minden törzsre jellemző, méretben eltérő szakaszt tudunk amplifikálni (**13. ábra, 15. ábra**).

In silico PCR segítségével meghatároztuk az ITS-szakaszok méretét a vizsgált fajokban. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzsből felszaporított szakaszok 433, 256, 253 bp hosszúak. *Rhi. radiobacter* esetében 1381, 1380, 1299 bp, *All. vitis* esetében 1359 bp, *Cla. michiganensis* esetében 513 bp, *Pse. syringae* pv. *panici* esetében 622 bp, *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* esetében pedig 577 bp hosszúságú szakasz szaporodik fel. A szakaszok mérete az általunk vizsgált törzsekben némileg eltérhet az adatbázisban szereplő törzsekétől.

A vizsgált *Cla. michiganensis* SZMC 0016 törzsben az amplifikált szakaszok hossza 300, illetve 400 bp. Ilyen nukleotidhosszúságú szakaszok már a 2. napon nem voltak kimutathatók a tenyészetekben. A **13. ábra** szemlélteti a 8-as pH-jú tápoldatban növekedő törzsek egymásra gyakorolt hatását, de a 6-os, illetve a 7-es pH-jú közegekben is hasonló eredményeket kaptunk. Az *in vitro* antagonizmus-teszt eredményeivel összevetve, ahol a *Cla. michiganensis* SZMC 0016 esetében a három párhuzamos mérést átlagolva 0,33 mm sugarú feltisztulási zónát kaptunk, ezen a pH-értéken a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs képes volt a *Cla. michiganensis* SZMC 0016 növekedését gátolni.

A *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 törzsben felszaporodó szakasz 577 bp hosszúságú. A kompetíciós vizsgálat 6. napján is mindkét általunk vizsgált törzs megtalálható volt a 8-as pH-jú tenyészetekben. A 6-os pH-jú tenyészetekben is ezt tapasztaltuk, míg a 7-es pH-jú tápközegekben a 2. nap még kimutatható volt mindkét törzs, de a 4. naptól kezdve csak

a *Bac. subtilis* törzsre jellemző 433, 256, 253 bp méretű szakaszokat láthatjuk. A *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 esetében az *in vitro* antagonizmus-tesztekben a feltisztulási zóna átmérője a párhuzamosok átlagában 4,33 mm volt (**6.3 fejezet**). Ezzel szemben ezen kísérleti rendszerben 6-os és 8-as pH-n nem sikerült a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzsnek elnyomni ezt a patogént, 7-es pH-n viszont képes volt gátolni azt.

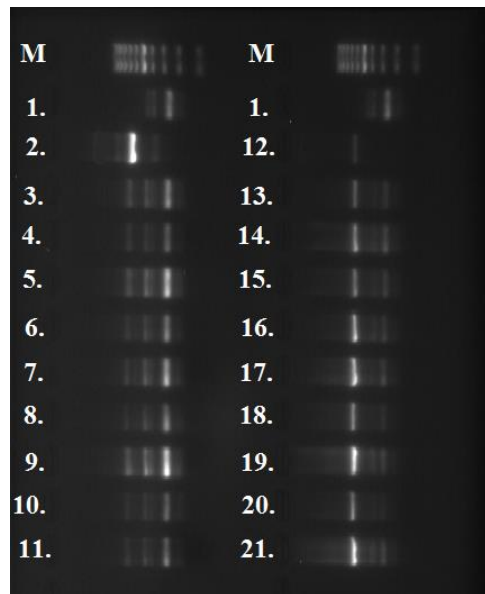


13. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J és a *Clavibacter michiganensis* SZMC 0016, valamint a *Bac. subtilis* SZMC 6179J és a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 törzsek egymásra gyakorolt hatása kompetíciós tesztben (pH=8).

M: Marker 100 bp Ladder Plus; 1: *Bac. subtilis* SZMC 6179J; 2: *Cl. michiganensis* SZMC 0016; 3, 4, 5: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Cl. michiganensis* SZMC0016 a 2. napon vett mintában; 6, 7, 8: *Bac. subtilis* SZMC6179J és *Cl. michiganensis* SZMC0016 a 4. napon vett mintában; 9, 10, 11: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Cl. michiganensis* SZMC0016 a 6. napon vett mintában. 12: *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185; 13, 14, 15: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 a 2. napon vett mintákban; 16, 17, 18: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 a 4. napon vett mintában; 19, 20, 21: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6185 a 6. napon vett mintában.

A *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16149 esetében 622 bp méretű szakasz amplifikálódik. Kísérletünk időtartama alatt mindhárom pH-értéken mindkét törzs jelen volt a tenyészetekben, ezzel szemben *in vitro* antagonizmus-tesztjeink során ezzel a törzsszel szemben értük el a legnagyobb gátlást (**6.3 fejezet**).

A *Pse. tolaasii* SZMC 6185 szintén egy megközelítőleg 600 bp méretű szakasz amplifikálódik. A törzsek az általunk beállított pH-értékeken nem gátolták egymás növekedését. Az *in vitro* antagonizmus-tesztekben sem tapasztaltunk gátlást a *Pse. tolaasii* SZMC 6185 törzssel szemben (6.3 fejezet).

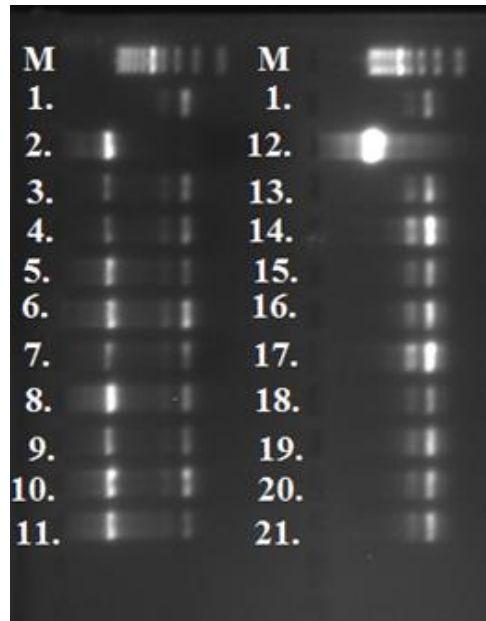


14. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J és a *Pseudomonas syringae* pv. *panici* SZMC 16149, valamint a *Bac. subtilis* SZMC 6179J és a *Pse. tolaasii* SZMC 6185 törzsek egymásra gyakorolt hatása kompetíciós tesztben (pH=8).

M: Marker 100 bp Ladder Plus; 1: *Bac. subtilis* SZMC 6179J; 2: *P. syringae* pv. *panici* SZMC 16149; 3, 4, 5: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16149a 2. napon vett mintában; 6, 7, 8: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16149 a 4. napon vett mintában; 9, 10, 11: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16149 a 6. napon vett mintában. 12: *Pse. tolaasii* SZMC 6185; 13, 14, 15: *Bac. subtilis* és *Pse. tolaasii* SZMC 6185 a 2. napon vett mintában; 16, 17, 18: *Bac. subtilis* és *Pse. tolaasii* SZMC 6185 a 4. napon vett mintában; 19, 20, 21: *Bac. subtilis* és *Pse. tolaasii* SZMC 6185 a 6. napon vett mintában.

A *Rhi. radiobacter* SZMC 21395 esetében 3 egymáshoz nagyon közeli méretű szakasz amplifikálódik (1381, 1380 és 1299 bp, **15. ábra**). Kísérletünk időtartama alatt mindhárom pH-értéken mindkét törzs jelen volt a tenyészetekben. Az *in vitro* antagonizmus-tesztjeink során csekély gátlást tapasztaltunk ezen *Rhizobium* törzssel szemben. Az *All. vitis* SZMC 21396 esetében az általunk használt indítószekvenciák egy 1359 bp méretű szakaszt eredményeznek. 6-os pH-n mindkét törzs megtalálható a tenyészetben a 4. napig, 7-es pH-értéken a 2. napig, míg 8-as pH-n már a 2. napon is csak az SZMC 6179J törzs detektálható. Megállapíthatjuk, hogy a 6. napra mindhárom pH-értéken sikerült a törzsnek elnyomni ezen szőlőpatogént. *In*

in vitro antagonizmus-tesztjeinkben csak minimális gátlást tapasztaltunk az *All. vitis* SZMC 21396 törzssel szemben (6.3 fejezet).



15. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J és a *Rhizobium radiobacter* SZMC 21395, valamint a *Bac. subtilis* SZMC 6179J és az *Allorhizobium vitis* SZMC 21396 törzsek egymásra gyakorolt hatása kompetíciós tesztben (pH=8).

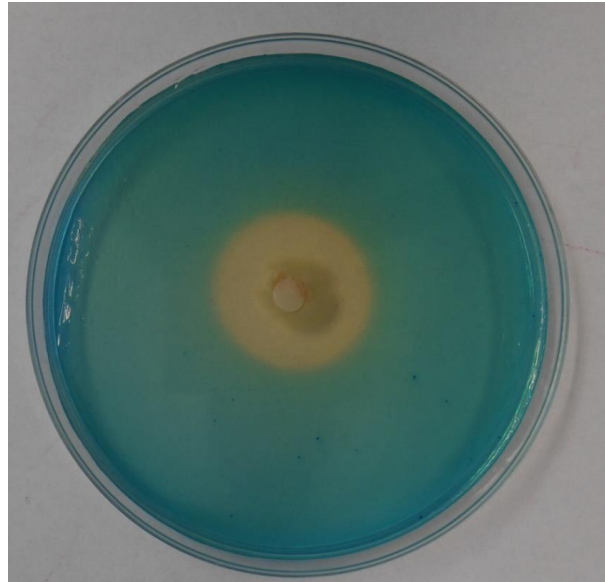
M: Marker 100 bp Ladder Plus; 1: *Bac. subtilis* SZMC 6179J; 2: *R. radiobacter* SZMC 21395; 3, 4, 5: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *R. radiobacter* SZMC 21395 a 2. napon vett mintában; 6, 7, 8: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *R. radiobacter* SZMC 21395 a 4. napon vett mintában; 9, 10, 11: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *R. radiobacter* SZMC 21395 a 6. napon vett mintában. 12: *All. vitis* SZMC 21396; 13, 14, 15: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *All. vitis* SZMC 21396 a 2. napon vett mintában; 16, 17, 18: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *All. vitis* SZMC 21396 a 4. napon vett mintában; 19, 20, 21: *Bac. subtilis* SZMC 6179J és *A. vitis* SZMC 21396 a 6. napon vett mintában.

6.5 A törzs sziderofórtermelésének, lipáz, kazeináz, zselatináz, kitináz aktivitásának és keményítóbontásának elemzése

Számos biokontroll ágens rendelkezik a vasat megkötő metabolitok termelésének képességével. A vas nagyon kis mennyiségben van jelen a környezetben, viszont az aerob mikroszervezetek anyagcseréjében kiemelkedő szerepet tölt be. A sziderofór kis molekulatömegű, a Fe^{3+} -hoz nagy affinitással kötődő molekula, melynek ezen tulajdonságából adódóan jelentős szerepe van a biológiai védekezés során előnyt jelentő vasért zajló kompetícióban. Az általunk alkalmazott módszer azon alapul, hogy a sziderofórok a $Fe(III)$ ionokhoz való nagy affinitásuk miatt szerkezetüktől függetlenül detektálhatók. A táptalajban található festék (krómazurol S) a vassal komplexet képez, melyhez a termelődő sziderofór

ligandumként kapcsolódik, ligand-vas komplexet létrehozva. A komplex létrejöttével a festékanyag felszabadulását színváltozás kíséri: narancssárga színű gyűrű jelenik meg.

A kiértékelés során a baktériumtelepek körül megjelent, sziderofórok jelenlétére utaló narancssárga gyűrű sugarát mértük 1 hét elteltével, melynek átlaga a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs esetében 18 ± 2 mm volt (**16. ábra**).



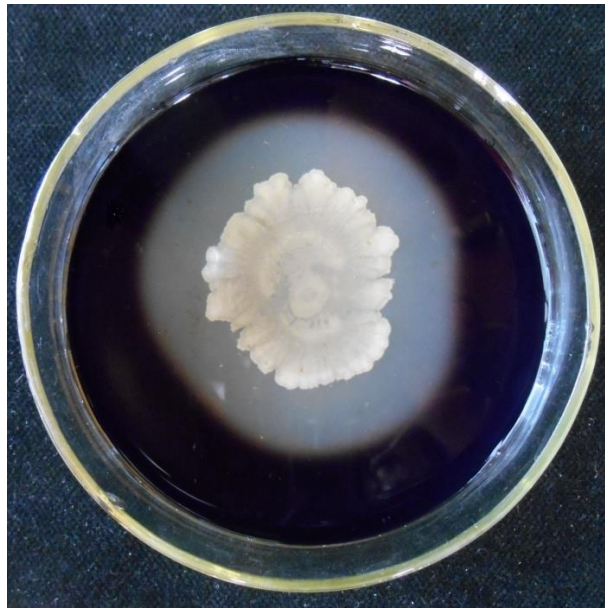
16. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs sziderofórtermelésének vizsgálata T7-es alap és T8-as fedőaggarral ellátott táptalajon 1 hét inkubációt követően.

May és munkatársai (2001) izoláltak először *Bac. subtilis*-ből bacillibaktinnak (sziderofór-2,3-dihidroxibenzoát-glicin-treonin-trimer észter) nevezett sziderofór molekulát, melyet korábban már Budzikiewicz és munkatársai (1997) is leírtak *Corynebacterium glutamicum* esetében. Yu és munkatársai (2011) a *Bac. subtilis* CAS15 törzs kiemelkedő bacillibaktin-termeléséről számoltak be. Munkájuk során leírták a törzs szisztémás indukált rezisztenciára kifejtett hatását: a törzs a fuzáriumos rothadás gyakoriságát csökkentette paprikán. Vaspótlás esetén elmaradt ez a pozitív hatás, ami e vegyület szisztémás indukált rezisztenciában betöltött szerepére enged következtetni. A kezelt növények magassága szignifikánsan nagyobb volt, mint a kezeletlen kontroll növényeké (27,24-54,53%-kal). A törzs a virágzási idő lerövidülésében, a termések átlagos súlyának emelkedésében és a terméshozam növekedésében is szerepet játszott. Patil és munkatársai (2014) *Bac. subtilis* CTS-G24 hidroxamát típusú sziderofór termelését hozták összefüggésbe *Fus. oxysporium f. sp. ciceri* és *Mac. phaseolina* fitopatogének gátlásával. Ferreira és munkatársai (2019) *Bac. subtilis* DSM10 törzsben katekol-típusú sziderofór molekulákat detektáltak. Grossman és mtsi. (1993) elsőként tárták fel *Bac. subtilis* 168-as törzsben szintén katekol típusú sziderofór (2,3-dihidroxibenzoil

glicin) szekrécióját. Munkájuk során feltehetőleg elsőként írták le a Gram-pozitív baktériumok esetében a sziderofór bioszintézisben szerepet játszó gének klónozását és karakterizálását.

A *Bac. subtilis* SZMC 6179J lipáz-, kazeináz- és kitináz-aktivitásának vizsgálata során egyik esetben sem tapasztaltunk feltisztulási zónát a telepek körül. Vizsgáltuk a törzs zselatináz aktivitását is zselatin-elfolyósítási teszttel, melynek lényege, hogy a táptalajt szilárdító zselatint bontja el a törzs által termelt zselatináz, ezáltal a táptalaj elfolyósodik. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs nem termel zselatinázt.

A keményítő bontásának detektálása során a törzs körül megjelent feltisztulási zóna sugara 15 ± 1 mm volt (**17. ábra**).

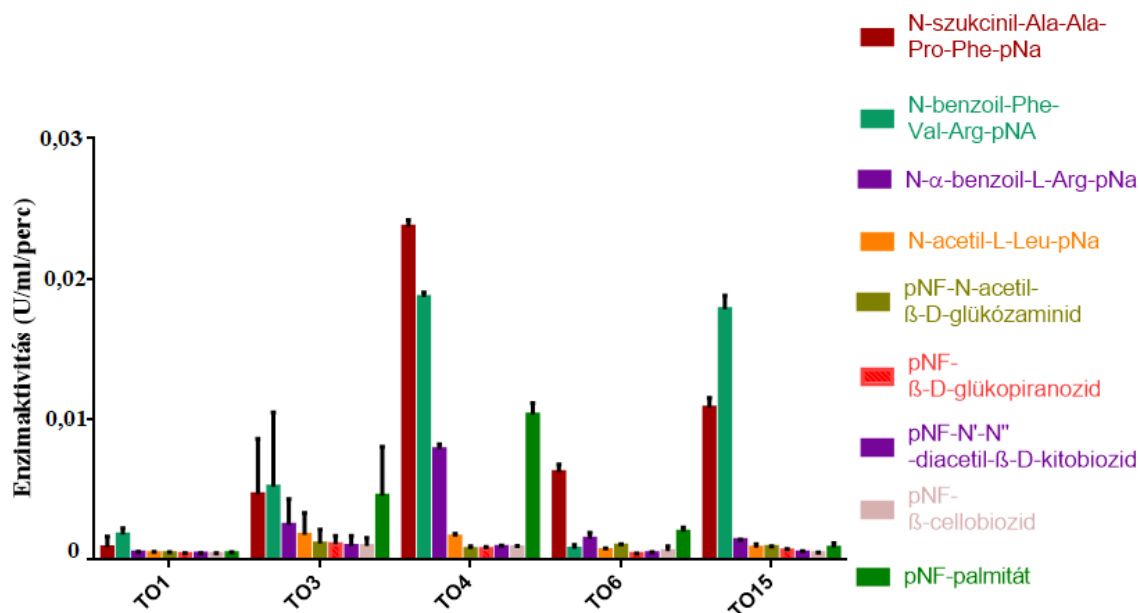


17. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs keményítóbontó képességének vizsgálata T13-as táptalajon 7 nap inkubációt követően.

6.6 A törzs extracelluláris enzimek termelésére való képességének kiértékelése

A kísérlet során megállapítható, hogy a sejtszám, illetve az enzimaktivitás is a TO4-es tápoldatban volt a legmagasabb (**18. ábra**), ezért további enzimvizsgálatainkhoz a TO4-es tápoldatot választottuk.

A vizsgált enzimek közül a tripszin-és a kimotripszin-típusú proteáz (0,0232 U/ml/ perc) termelődését tapasztaltuk kiemelkedőnek. A későbbiekben a kimotripszin-típusú proteáz termelődését detektáló N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid szubsztráttal dolgoztunk.



18. ábra. Extracelluláris enzimaktivitások TO1, TO3, TO4, TO6 és TO15 tápoldatokban 5 nap inkubációt követően.

A *Bacillus* fajok extracelluláris enzimeit már sokan vizsgálták. A *Bacillus* fajok, különösen a *Bac. subtilis*, *Bac. amyloliquefaciens*, *Bac. licheniformis* magas hozamú (20-25 g/l) extracelluláris enzim termelők (van Dijl, Hecker 2013). Számos törzs képes a biokontrollban is szerepet játszó lítikus enzimek termelésére (Priest 1977). Az SZMC 6179J törzsre leginkább a proteázok termelése jellemző, melyek biotechnológiai és biokontrollban betöltött szerepük miatt is fontosak.

Liang és munkatársai (2012) *Bac. cereus* TKU022 törzs proteáz-termelésének vizsgálatát végezték tirozin standard kalibrációjának segítségével. Öt nap előtenyésztést követően 0,5 U/ml/perc proteáz aktivitást tapasztaltak az általuk vizsgált reakció-körülmények között. Wang és Yeh (2006) *Bac. subtilis* TKU007 törzs proteáztermelése során 0,86 U/ml/perc proteáz aktivitást írtak le, szintén Wang és mtsai. (2006) *Bacillus* sp. TKU004 törzs proteáz-termelése során 0,065 U/ml/perc aktivitást tapasztaltak.

6.7 Sztreptomycin-rezisztens törzsek izolálása, spontán sztreptomycin-rezisztens mutáns törzsek kimotripszin-típusú proteáz termelése és *rpsL* génszekvenciái

A szélesztések során számos spontán sztreptomycin-rezisztens mutánst izoláltunk (19. ábra). További kísérleteinkhez 169 törzset tisztítottunk.



19. ábra. Az izolálás során megjelent, spontán sztreptomycin-rezisztens telepek.

A sztreptomycin-rezisztens baktériumtörzseket fokozott enzim- illetve antibiotikum-termelés jellemezheti. Ez a jelenség nem kizárólag sztreptomycin-rezisztens mutánsok esetében figyelhető meg. Wang és munkatársai (2008) számoltak be *Str. coelicolor* fokozott antibiotikum-termeléséről, rifampicin-, paromomicin- és gentamicin-rezisztens mutánsok esetében. Ez a technika akár egy nagyságrenddel is növelheti az antibiotikum-termelést. *In vitro* proteinszintézis-vizsgálatok demonstrálták, hogy a túltermelés oka a riboszóma mutációjában keresendő, melynek következtében aberrált fehérje képződik és magasabb lesz a guanozin-pentózfoszfát szintézisének aktivitása. Ez a fajta riboszóma-“*engineering*” kevesebb időt igényel, költséghatékonyabb, és kevesebb laboratóriumi munkával jár, mint más, hasonló eredményt hozó technikák.

Kurosawa és munkatársai (2006) sztreptomycin-rezisztens *Bac. subtilis* törzsekben írtak le fokozott enzimtermelést. A mutáns törzsekben az enzimtermelés 1,3-1,4-szeresére emelkedett. A szerzők munkájuk során a törzsek proteáz- és α -amiláz-termelését vizsgálták. A jelenség a 30S riboszóma alegység S12 fehérjéjét kódoló *rpsL* génben megjelenő pontmutációkkal mutatott összefüggést.

A 3. melléklet 169 spontán sztreptomycin-rezisztens mutáns N-szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid szubsztrát segítségével, 405 nm-en detektált kimotriszpszin-típusú proteáztermelését mutatja be. 100%-nak a kontrollként használt szülői törzset vettük, és ehhez

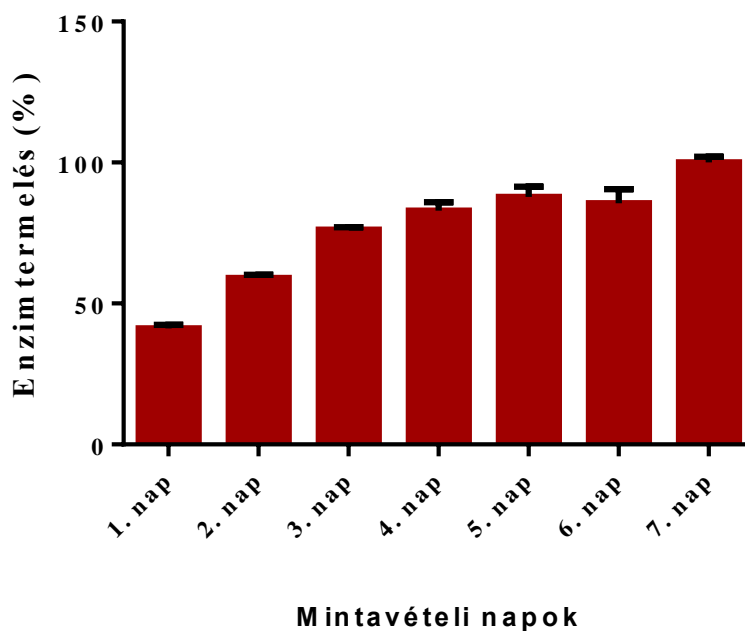
viszonyítottuk a mutánsokat. A mellékletben vastagon szedett, 12 fokozott enzimtermelődést mutató törzs aktivitása 113%-tól (0,0238 U/ml/perc) 258%-ig (0,0536 U/ml/perc) terjedt, míg a többi törzs csökkent enzimtermelődést mutatott, ezek közül a legkevesebb enzimet termelő törzs enzimtermelése 9%-ra (0,0023 U/ml/perc) esett vissza.

A spontán sztreptomycin-rezisztens mutánsok gyakran pontmutációkat hordoznak az *rpsL* génben (Hosoya és mtsai. 1998). A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs teljes genomszekvenciája alapján tervezett primerpárral felszaporított génszakasz 487 bp hosszú. A kapott szekvenciák összerendezését követően 430 bp-nyi fragmens nukleotideltéréseit vizsgáltuk. Az alábbi nukleotideltéréseket tapasztaltuk a 12 legnagyobb kimotripszin-típusú proteáz aktivitást mutató törzsnél a vad típussal összehasonlítva: az első pozícióban az STR 5, STR 98, STR 101 és STR 102 törzsekben timin-adenin tranzíció valósult meg. A következő eltérést, egy adenin-guanin tranzíciót a 146. pozícióban tapasztaltuk az STR 5 és az STR 6 törzsekben. Az általunk izolált mutánsokban az *rpsL* génben történő nukleotidváltozások nem korrelálnak a kimotripszin-típusú proteáz fokozott termelésével, ami arra enged következtetni, hogy a spontán sztreptomycin-rezisztens mutáns törzsek fokozott enzimtermelése nem minden esetben okoz genetikai változásokat az *rpsL* génben.

Tojo és munkatársai (2014) szintén izoláltak sztreptomycin alacsony koncentrációja mellett sztreptomycin-rezisztens *Bac. subtilis* törzseket, melyeket fokozott antibiotikum-termelés jellemezett. Komparatív genomszekvencia-analízissel a mutáció hordozójaként az *mthA* gént azonosították. Ez a gén az S-adenozil-homocisztein/metil-tio-adenozin-nukleozidát kódolja, melynek az S-adenozil-metionin újrahasznosítási útvonalában van szerepe. E mutánsok egy riboszómális szintézis útján létrejövő antibiotikum, a bacilizin termelésében mutattak háromszoros növekedést a szülői törzshöz képest.

6.8 Kimotripszin-típusú proteáz termelésének időbeni jellemzése

Kísérletünk során 7 napon keresztül, naponta mértük a törzs kimotripszin-típusú proteáz aktivitását, és a 7. napon, 405 nm-en mért enzimaktivitási értékeket 100%-nak vettük. Az enzimtermelés már az első napon 40%-a volt a 7. nap enzimtermelésének (20. ábra).

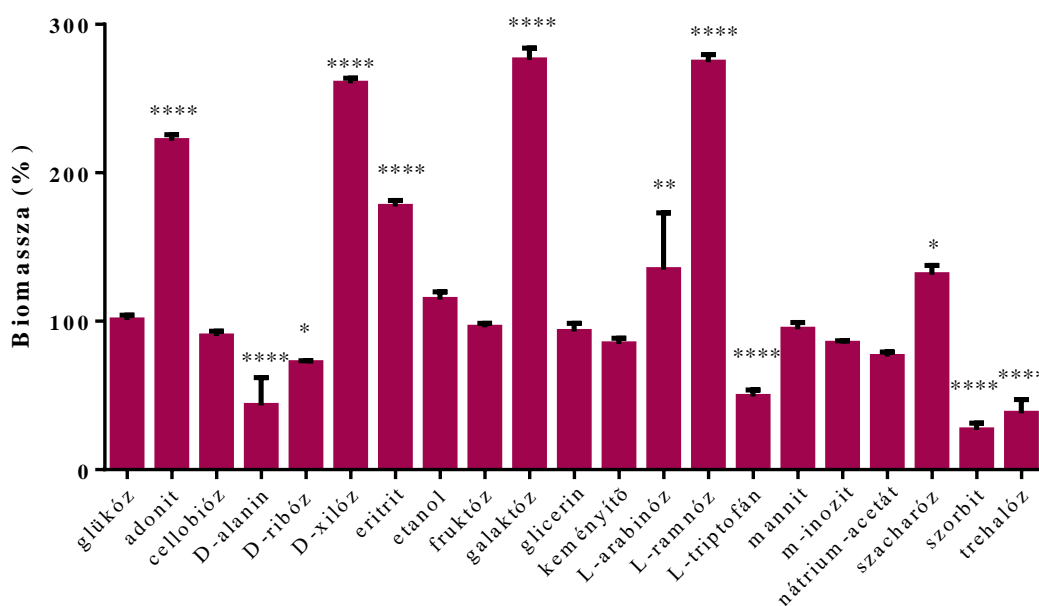


20. ábra. A TO4-es tápoldatban mért kimotripszin-típusú proteáz enzim termelésének vizsgálata 20 perc szubsztráttal történt inkubációt követően.

A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs által termelt kimotripszin-típusú proteáz időbeli termelésének vizsgálata során a 3. naptól kezdve már nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést az enzimtermelésben. Liang és mtsai. a *Bac. cereus* TKU022 törzs esetében az 5. napon tapasztalták a legnagyobb enzimaktivitást; a mi eredményeinkkel ellentétben a 7. napra csökkenést tapasztaltak. Wang és mtsai. (2006) a 4. naptól kezdve tapasztaltak csökkent proteáztermelést a *Bac.sp.* TKU004 törzs vizsgálata során. Wang és Yeh (2006) pedig a 2. napi maximális enzimaktivitást követően csökkent enzimaktivitásról számoltak be a *Bac. subtilis* TKU007 törzs esetében.

6.9 Különböző szén- illetve nitrogénforrások hatásának elemzése a kimotripszin-típusú proteáz termelésére

A kísérlet során a glükózt a **5.3.9 fejezetben** feltüntetett szénforrásokra cseréltük a tápoldatban. A glükózos tápoldatban történő növekedést 100%-nak vettük.

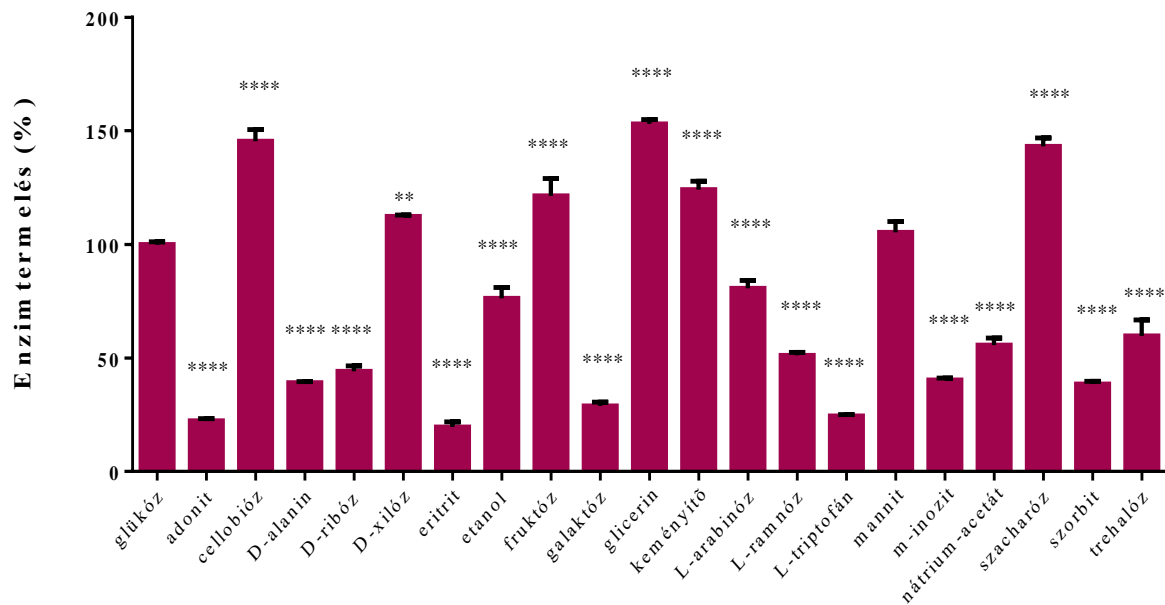


21. ábra. Különböző szénforrások hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs növekedésére.

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analizisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz (glükóz) viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, **: $p < 0,005$, *: $p < 0,05$.

A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs az adonitot, D-xilózt, eritritet, galaktózt, L-arabinózt, L-ramnózt és szacharózt a glükóznál jobban volt képes hasznosítani, ezáltal gyorsabban növekedett. Kiemelkedő növekedést tapasztaltunk az adonit ($2,17 \times$ nagyobb optikai denzitás), a D-xilóz ($2,56 \times OD$), az eritrit ($1,74 \times OD$), a galaktóz ($2,7 \times OD$) és az L-ramnóz esetében ($2,71 \times OD$).

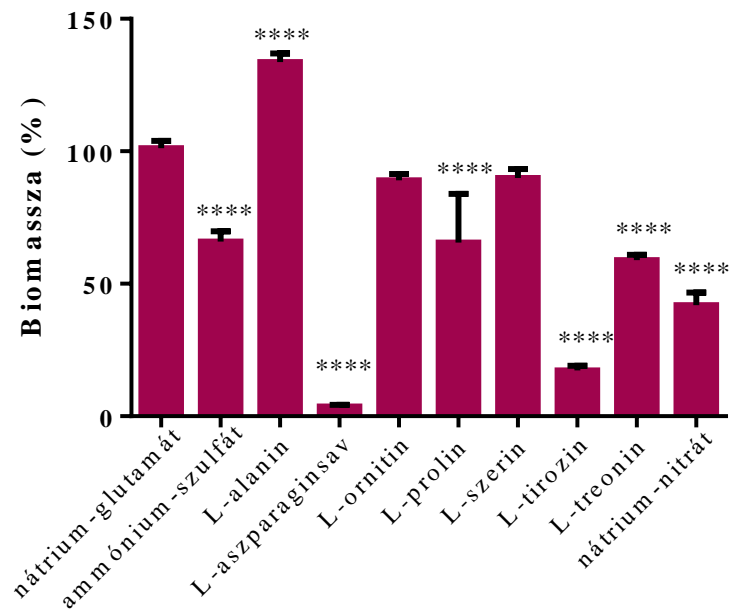
A törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelésének vizsgálata során a glükóz cseréjét követően számos szénforrás esetében tapasztaltuk a kimotripszin-típusú proteáz fokozottabb termelését (**22. ábra**). A cellobióz, D-xilóz, fruktóz, glicerín, keményítő, szacharóz esetében beszélhetünk szignifikáns kimotripszin-típusú proteáz termelésről. A törzs legnagyobb kimotripszin-típusú proteáz termelését glicerín jelenlétében tapasztaltuk ahol a termelés a kontroll 153,03%-a. A legalacsonyabb teremtést pedig az eritrit jelenlétében történt ahol a termelés 19,55%-ra esett vissza.



22. ábra. A kísérlet során alkalmazott szénforrások hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz termelésére.

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analizisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz (glükóz) viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,005$.

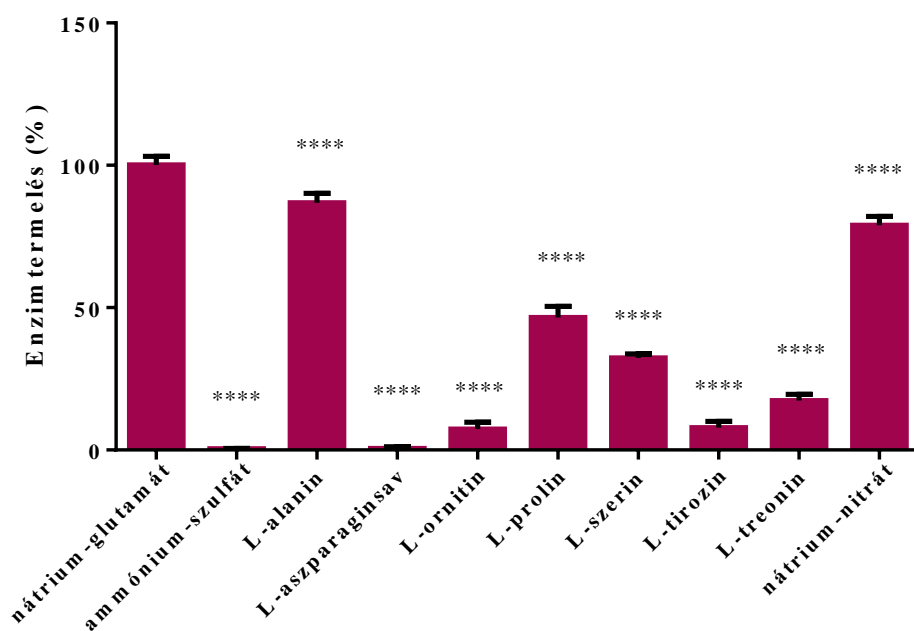
A nitrogénforrások változtatását követően az L-aszparaginsav és az L-tirozin esetében tapasztaltunk jelentős sejtszám-csökkenést (**23. ábra**). A nátrium-glutamát alaninra történő cseréje 33%-os emelkedést okozott a sejtszámban a kontrollhoz képest.



23. ábra. Különböző nitrogénforrások hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs növekedésére.

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analizisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz (nátrium-glutamát) viszonyítva határoztuk meg. *****: $p < 0,0001$.

A nitrogénforrások enzimtermelésre gyakorolt hatásának vizsgálatát a **24. ábra** szemlélteti. A nitrogén források cseréje során minden esetben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kimotripszin-típusú proteáz termelésben. Az ammónium-szulfát és az L-aszparaginsav esetében jelentős csökkenést tapasztaltunk, mindkét esetben 1% alá esett vissza az enzim termelése.



24. ábra. Nitrogénforrások hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz termelésére. A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analizisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz (nátrium-glutamát) viszonyítva határoztuk meg. *****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$.

Pant és munkatársai (2015) *Bac. subtilis* proteáztermelését vizsgálták tirozin kalibráció segítségével. A módszer a mi detektálási módszerünktől eltérő, ellenben az általuk vizsgált öt szénforrás (szacharóz, maltóz, xilulóz, galaktóz, keményítő) közül a galaktózt találták a legjobb szénforrásnak, míg a legkevesebb enzimtermelést a keményítő jelenlétében írták le. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs növekedésének vizsgálata során a galaktózt találtuk a legjobb szénforrásnak, de ezen a szénforráson a kimotripszin-típusú proteáz termelése szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. Az általunk vizsgált törzs enzimtermelése a glicerin jelenlétében kiemelkedő.

Sevinc és Demirkan (2011) *Bac. sp.* tirozin kalibrációra alapuló proteáztermelésének vizsgálatát követően a szénforrások hatásának eredményeként az alábbi sorrendet állították fel: fruktóz>szacharóz>maltóz>glükóz> keményítő>glicerol. Naidu és Devi (2005) *Bac. sp.* K-30 törzs esetében a keményítőt, szacharózt és laktózt találták kiemelkedőnek a proteáz termeléséhez. Maltóz, keményítő és cellobióz jelenlétében történő alacsonyabb proteáztermelésről számolnak be Shafee és munkatársai (2005) *Bac. cereus* 146 törzs esetében, míg Johnvesly és Naik (2001) a citromsav, keményítő, fruktóz és raffinóz proteáz szekrécijára kifejtett kiemelkedő hatásáról tudósítottak *Bacillus sp.* JB-99 törzsnél.

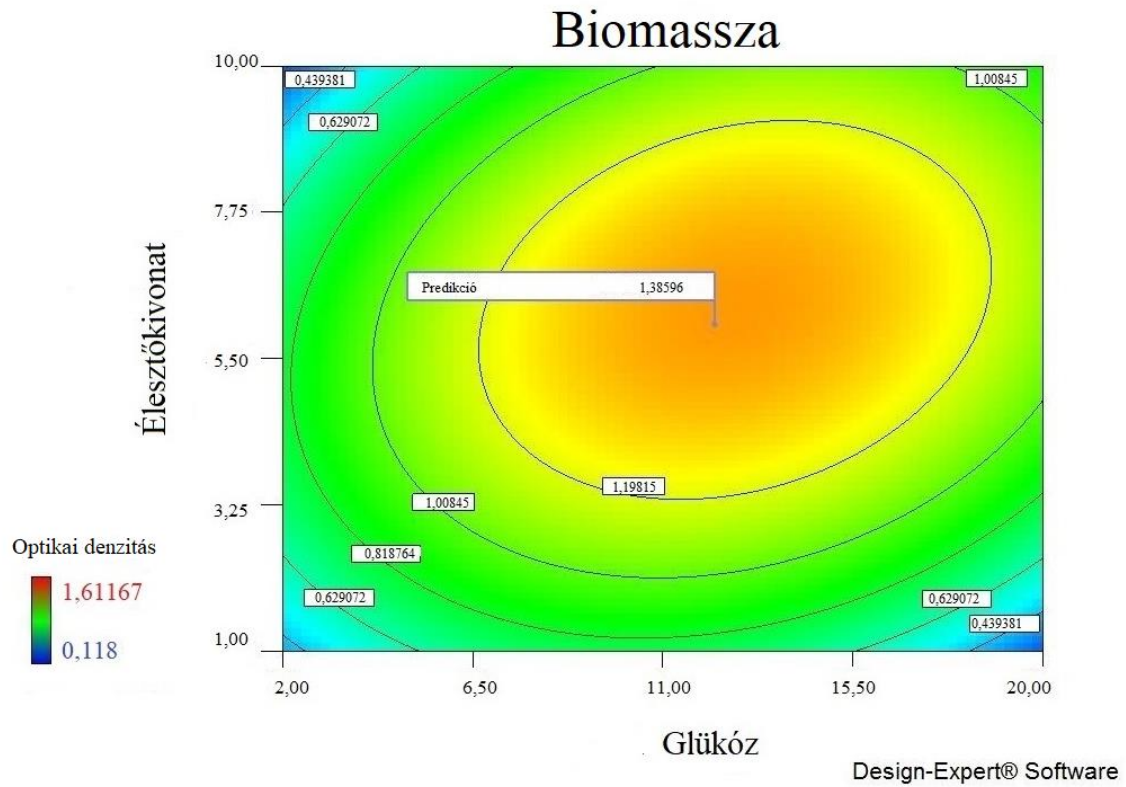
Yang és munkatársai (2000) *Bac. subtilis* Y-108 proteáz enzimtermelésének optimalizálása során szénforrásként rákpáncélpórt, glükózt, laktózt, karboximetil-cellulózt, arabinózt, xilózt, cellulózt; nitrogénforrásként húskivonatot, polipepton, élesztőkivonatot, baktópepton, nátrium-glutamát, nátrium-nitrát és ammónium-nitrát hatását vizsgálták. A szénforrások vizsgálata során 5% rákpáncélpórt, illetve laktózt és arabinózt további hozzáadása során tapasztaltak fokozott enzimtermelődést. A nitrogénforrások vizsgálata során egyedül a nátrium-nitrát esetében tapasztaltak fokozott enzimtermelést, az optimális koncentrációt 1,5%-nak (m/V%) határozták meg. Munkájuk során a unit (U) értékek meghatározásához tirozinkalibrációt alkalmaztak.

Pant és munkatársai (2015) nitrogénforrások (ammónium-szulfát, pepton, ammónium-nitrát, urea, ammónium-klorid) hatását is vizsgálták szintén tirozinkalibráció segítségével egy *Bac. subtilis* törzs proteáztermelésére. Munkájuk során a peptonot találták a termelés számára a legjobbnak, a leggyengébb termelést pedig ammónium-klorid jelenlétében tapasztalták. Johnvesly és Naik (2001) a *Bacillus* sp. JB-99 törzs proteáztermelésének optimalizálása során a legjobb nitrogénforrásnak a NaNO_3 -ot és a KNO_3 -ot találták. Sevinc és Demirkan (2011) *Bacillus* sp. proteáztermelésének vizsgálatakor a nitrogénforrások cseréje során az alábbi sorrendet állították fel: fölözött tej>kazein>kontroll (pepton, élesztőkivonatot)>tripton>szójabab>kukoricacsíra-kivonatot. Szervetlen nitrogénforrások alkalmazása (nátrium-nitrát, ammónium-szulfát) során szignifikáns csökkenést tapasztaltak már a törzs növekedése során is.

6.10 Növekedés és enzimtermelés optimalizálása

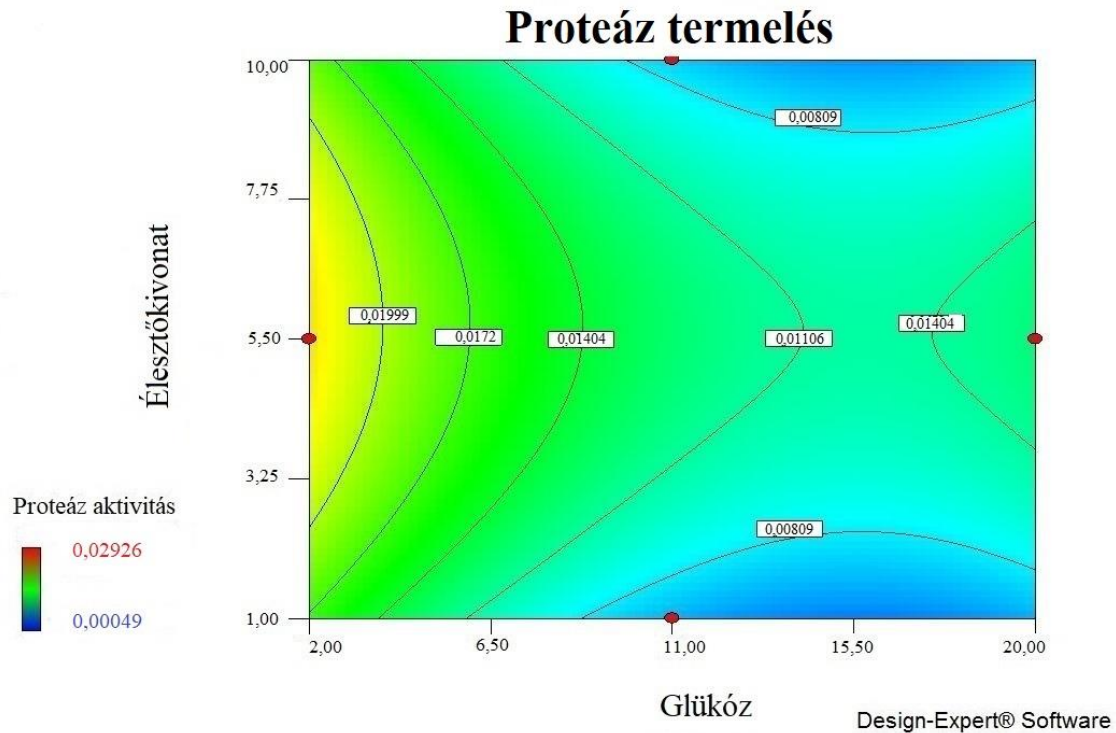
6.10.1 Glükóz, élesztőkivonatot és a tenyésztési idő hatása a törzs növekedésére és kimotripszin-típusú proteáz-termelésére

A bemutatott diagram (25. ábra) az 5,5 napon tapasztalt biomasszát mutatja az 5. táblázatban bemutatott kombinációk függvényében. A prediktált biomassza a kísérlet során az 5,5 nap elteltével volt a legmagasabb ($\text{OD}_{620} = 1,385$). Glükóz esetében 11 g/l koncentráció alkalmazása mellett mutatkoztak ezen magas optikai denzitások, míg élesztőkivonatot esetében 5,5 g/l koncentráció kedvezett leginkább a sejtek szaporodásának.



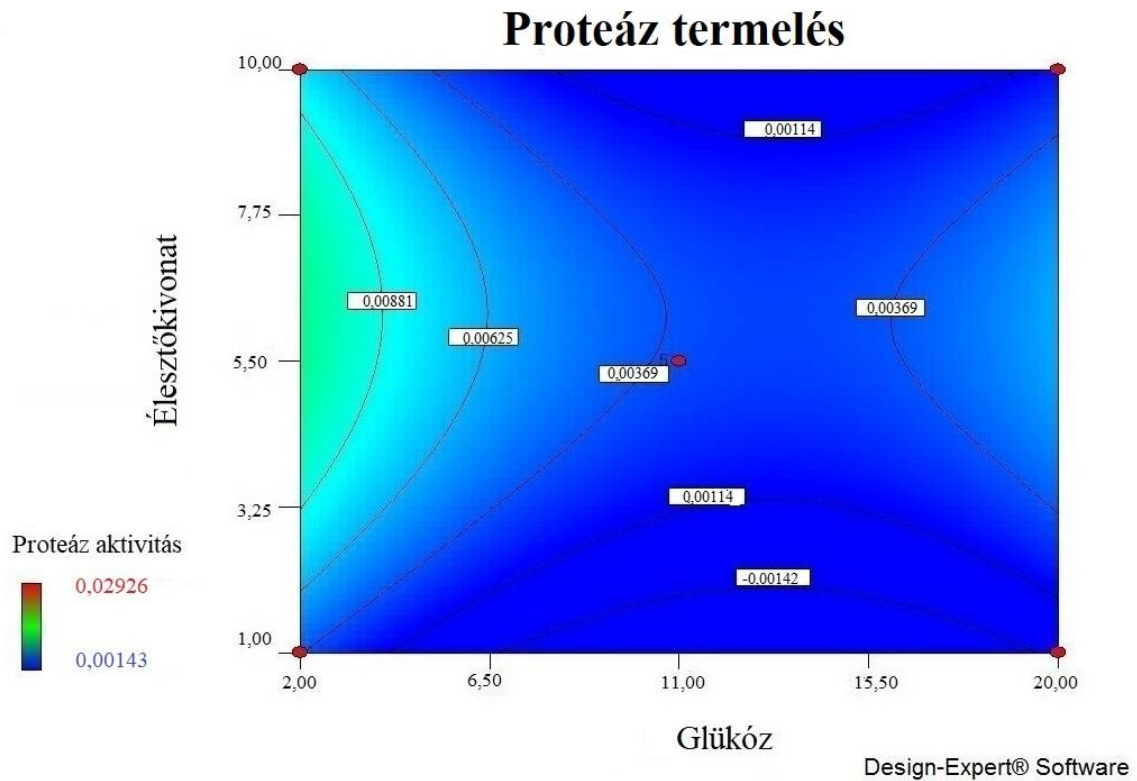
25. ábra. A glükóz- és élesztőkivonat-koncentráció változásának hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J tenyészet optikai denzitására 5,5 nap elteltével (a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével létrehozott diagram).

A **26. ábra** bemutatott diagram az első napon mért kimotripszin-típusú enzimaktivitásokat mutatja, mely a 2. kombináció (2 g/l glükóz és 5,5 g/l élesztőkivonat) esetében volt a legmagasabb.



26. ábra. A glükóz- és élesztőkivonat-koncentráció változásának hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelésére az 1. napon (a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével létrehozott diagram).

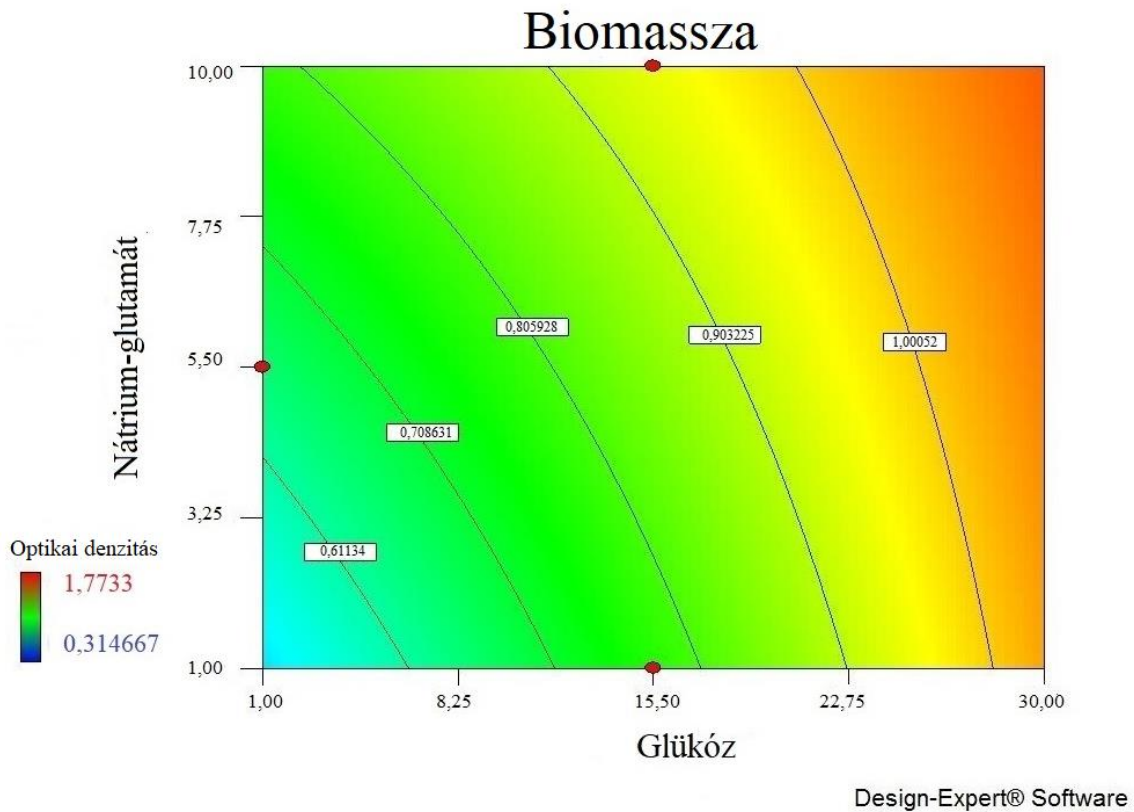
Az 1. napon mértük a legnagyobb kimotripszin-típusú enzimaktivitást, mely az idő előrehaladtával nem nőtt (**27. ábra**). A biomasszával szemben a kimotripszin-típusú proteáz termelésének nem kedvezett a magas glükózkoncentráció. A legmagasabb proteáz aktivitást az 1. napon érték el 2 g/l glükóz jelenlétében. A legnagyobb biomasszájú kombinációhoz (11 g/l glükóz, 5,5 g/l élesztő) tartozó proteáz aktivitás alacsony. A tenyészetekben mért magas sejtszám nem eredményezett nagyobb proteáz aktivitást.



27. ábra. A glükóz- és élesztőkivonat-koncentráció változásának hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelésére az 5,5 napon (a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével létrehozott diagram).

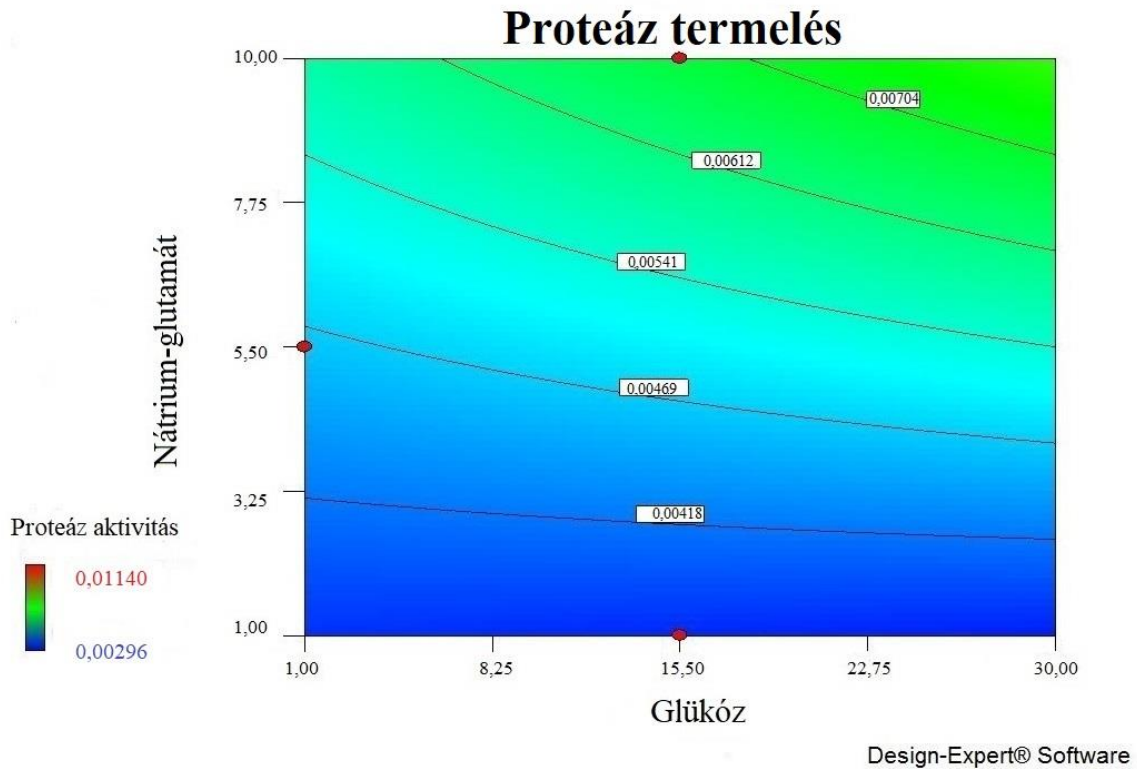
6.10.2 Glükóz, nátrium-glutamát, valamint fémszulfátok hatása a törzs növekedésére és kimotripszin-típusú proteáz-termelésére

A 30 g/l glükóz, 10 g/l nátrium-glutamát és 1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ koncentrációk mellett tapasztaltuk a legnagyobb biomasszát (**28. ábra**). A réz-szulfát nagyobb koncentrációjának alkalmazása nem eredményezett nagyobb biomasszát, míg a glükóz és a nátrium-glutamát legmagasabb vizsgált koncentrációja volt a legkedvezőbb a törzs növekedésére.



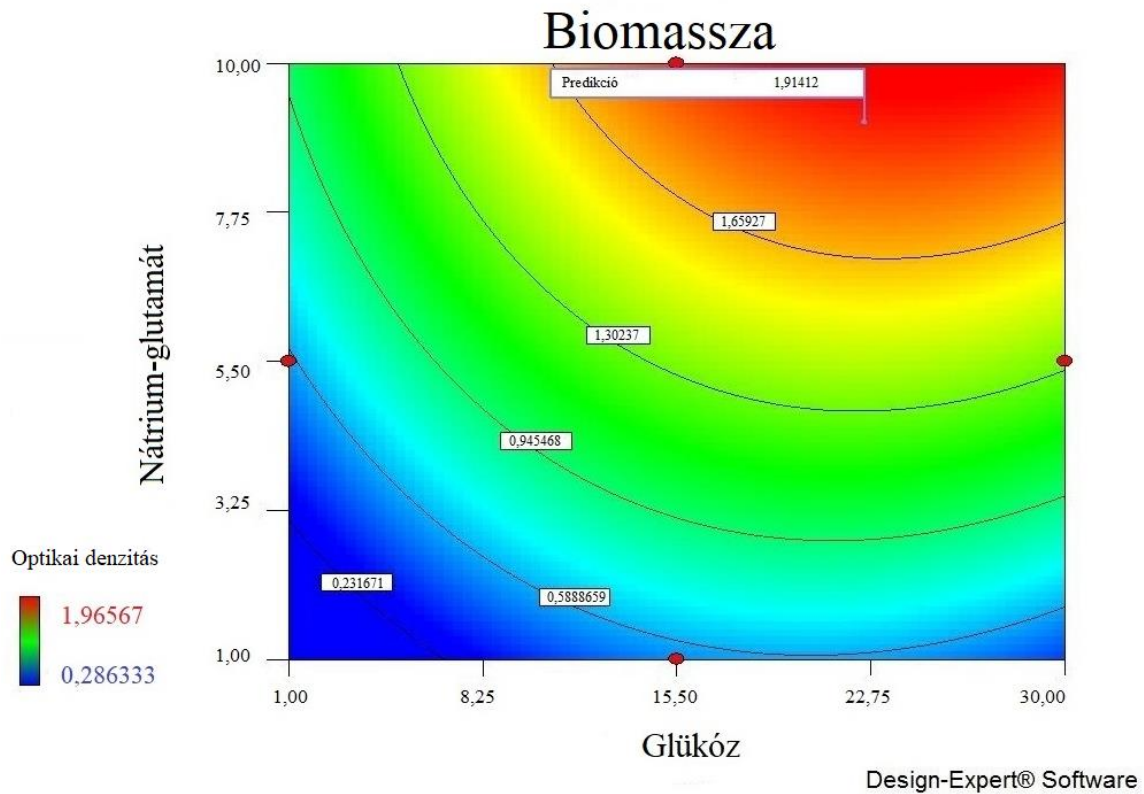
28. ábra. A glükóz- és nátrium-glutamát koncentráció-változásának hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs biomasszájára 1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ jelenlétében (a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével létrehozott diagram).

A kimotripszin-típusú proteáz termelődésének a 30 g/l glükóz és a 10 g/l nátrium-glutamát kedvezett leginkább, 1 mg/l koncentrációjú $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ jelenlétében (**29. ábra**). A nagyobb $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ koncentrációk alkalmazása csökkenő proteáz aktivitást eredményezett. Ebben az esetben a legnagyobb biomasszát eredményező kísérleti kombinációk megegyeztek a legnagyobb proteáz aktivitást mutató kombinációkkal.



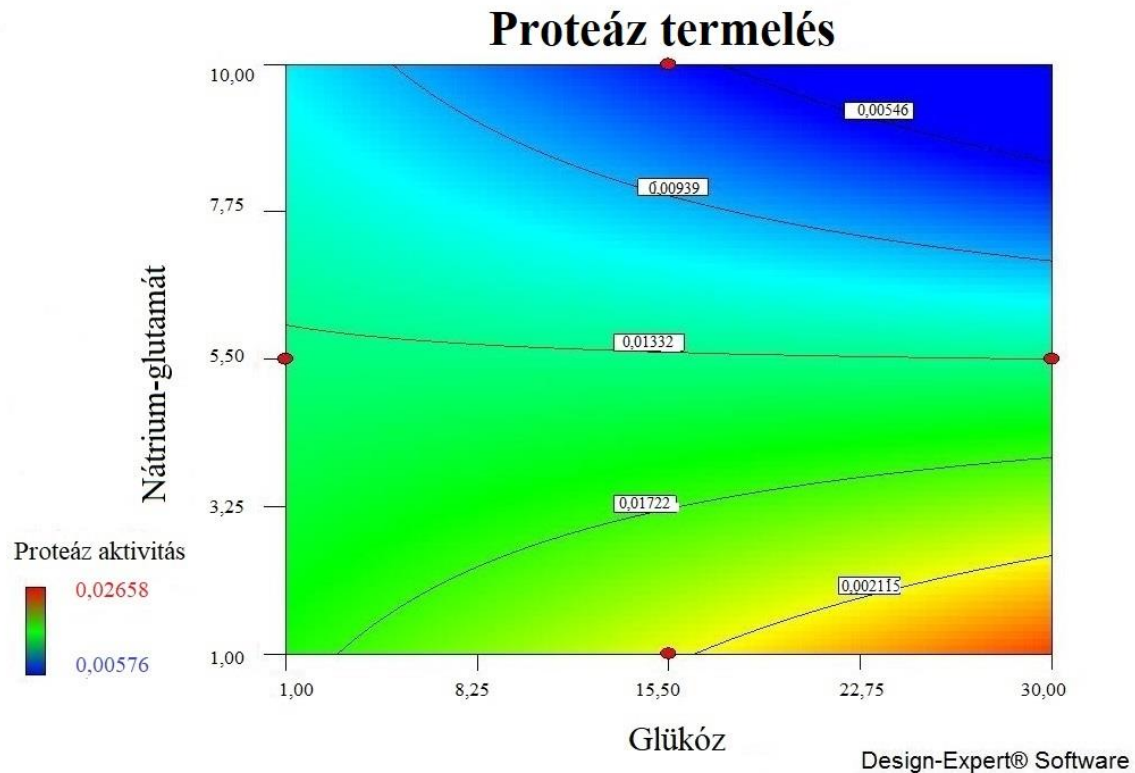
29. ábra. A glükóz- és nátrium-glutamát koncentráció-változásának hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelésére 1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ jelenlétében (a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével létrehozott diagram).

Vas-szulfát esetében a legnagyobb biomasszát 15,5 g/l glükóz, 10 g/l nátrium-glutamát és 40 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ mellett tapasztaltuk, ebben az esetben a 620 nm-en mért optikai denzitás 1,914 volt (**30. ábra**). Kisebb koncentrációjú $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ oldat alkalmazása kisebb biomasszát eredményezett, a legnagyobb koncentráció bizonyult a legjobbnak.



30. ábra. A glükóz és nátrium-glutamát koncentráció változásának hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs biomasszájára 40 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ jelenlétében (a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével létrehozott diagram).

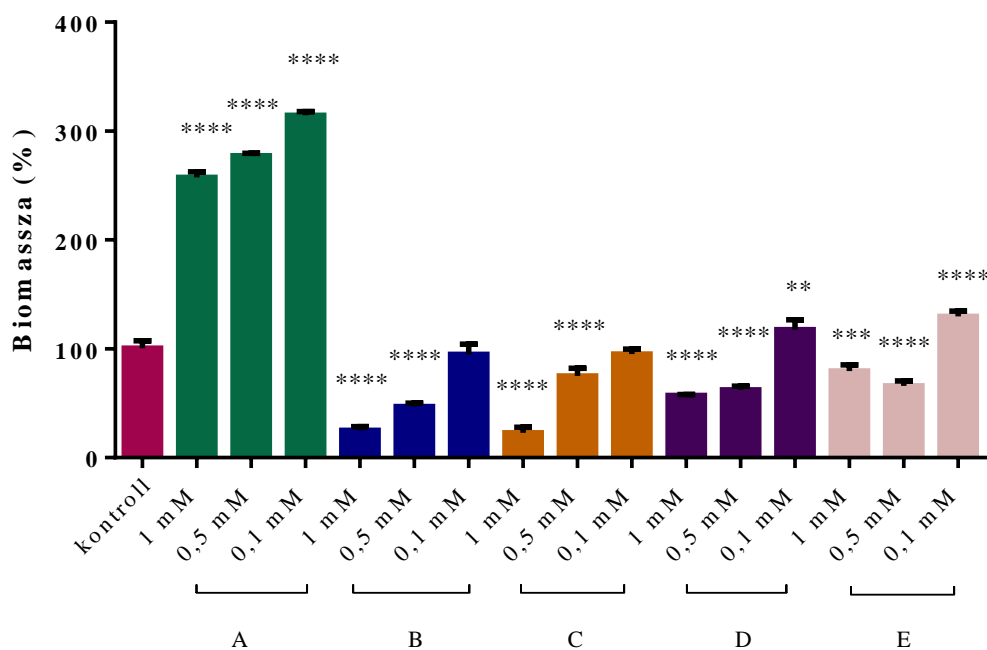
A legnagyobb kimotripszin-típusú proteáz aktivitást a 30 g/l glükózt, 1 g/l nátrium-glutamátot és 40 mg/ml $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazó fermentlében tapasztaltuk, a proteáztermelésnek tehát a legmagasabb glükóz, a legalacsonyabb nátrium-glutamát és a legmagasabb $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ koncentráció kedvezett (**31. ábra**). A biomasszával ellentétben a proteáz aktivitásra a magas nátrium-glutamát koncentráció gátlólag hatott, tehát nem a legtöbb sejtet tartalmazó fermentlevekben mértük a legnagyobb proteáz aktivitást.



31. ábra. A glükóz és nátrium-glutamát koncentráció változásának hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelésére 40 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ jelenlétében (a Design-Expert 7.1 szoftver segítségével létrehozott diagram).

6.11 Különböző fémek hatásának jellemzése a kimotripszin-típusú proteáz termelésére és az enzimaktivitására

A 100%-nak vett kontroll nem tartalmaz hozzáadott fémet, e körülményhez mérten vizsgáltuk a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs növekedését 620 nm-en (**32. ábra**). A hozzáadott mangán-szulfát jelenlétében a törzs növekedése jelentősen megemelkedett, a legkisebb koncentráció esetében megháromszorozódott. A többi fém esetében kizárólag a 0,1 mM-os koncentráció volt az, ami nem befolyásolta jelentősen a biomasszát. A törzs a réz-szulfát, a vas-szulfát, a nikkell-szulfát és a kadmium-szulfát 0,1 mM-os koncentrációjával szemben jelentős toleranciát mutatott. A magasabb koncentrációk gátolták az izolátum szaporodását.

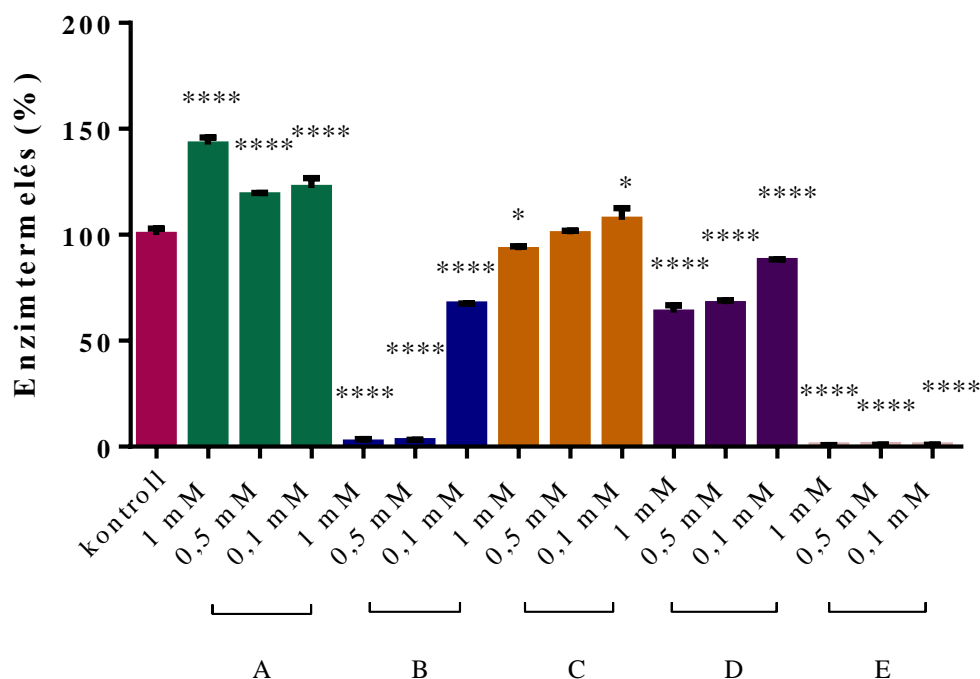


32. ábra. Fémek hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs növekedésére.

A: Mn, B: Cu, C: Fe, D: Ni, E: Cd

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analizisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,005$.

A mangán minden koncentrációban pozitívan hatott a vizsgált törzs kimotripszin-típusú proteáz enzimtermelésére (**33. ábra**). Számos szakirodalmi adatot találunk egyes *Bac. subtilis* törzsek esetében a mangán szurfaktintermelésre kifejtett pozitív hatásáról (Cooper és mtsai. 1981). Kísérleteinkben a mangán-szulfát jelenléte a törzs növekedését és a kimotripszin-típusú proteáz termelését is fokozta. Ezen esetben a legtöbb mangán-szulfátot tartalmazó tenyészetekben termelődött a legtöbb enzim. A tápoldatokban jelen lévő vas-szulfát a legkisebb koncentrációban is csak kis mértékben emelte az enzimaktivitást. A nikkell-szulfát a legnagyobb alkalmazott koncentrációban 64%-ra csökkentette az enzimtermelődést. A réz-szulfát esetében egyedül a legkisebb koncentrációnál maradt meg az enzimaktivitás 67%-a, a többi esetben ez az érték 3% alá csökkent. A kadmium-szulfát esetében mindhárom alkalmazott koncentráció jelentősen gátolta a kimotripszin-típusú proteáz termelődését. A törzs növekedését tekintve réz-szulfáttal és kadmium-szulfáttal szembeni toleranciával rendelkezik, ezzel szemben a proteáz termelést a kadmium mindhárom alkalmazott koncentrációja teljesen blokkolta.



33. ábra. Fémek hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelésére.

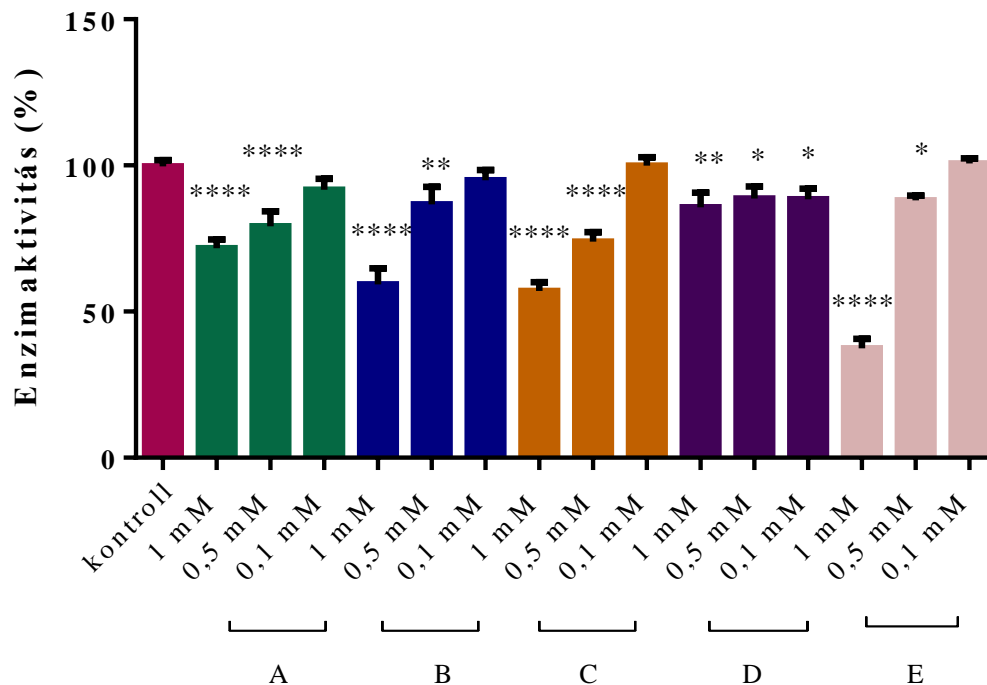
A: Mn, B: Cu, C: Fe, D: Ni, E: Cd

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analizisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p -érték) a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, *: $p < 0,05$.

Számos tanulmány számol be a Mn^{2+} és a Ca^{2+} proteáztermelésre kifejtett pozitív hatásáról (Sevinc és Demirkan 2011, Nascimento és Martins 2004), míg Ba^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} jelenlétében Sevinc és Demirkan (2011) csökkent enzimtermelést tapasztaltak. Johnvesly és Naik (2001) *Bacillus* sp. JB-99 törzs proteáztermelése során 10 mM Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} és Co^{2+} jelenlétében tapasztaltak fokozottabb enzimtermelést, míg gátlást a Fe^{3+} , Hg^{2+} és a Zn^{2+} ionok jelenlétében írtak le. Yang és munkatársai (2000) *Bac. subtilis* Y-108 proteáz enzimaktivitásának vizsgálata során 5 mM koncentrációban alkalmazott Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} és Co^{2+} ionok erős aktivátor hatásáról számoltak be, míg a Hg^{2+} ion gátló hatását tapasztalták.

A kontroll tenyészet nem tartalmazott további hozzáadott fémionokat, ezt tekintettük 100%-nak, melyhez képest vizsgáltuk a fémek hatását a kimotripszin-típusú enzimaktivitásra (34. ábra). Elmondható, hogy a legalacsonyabb koncentrációk nem befolyásolták szignifikánsan az enzim aktivitását a mangán-szulfát, a réz-szulfát, a vas-szulfát és a kadmium-szulfát jelenlétében, míg a nikkelszulfát esetében 0,1 mM-os koncentráció mellett is szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A magasabb koncentrációk mind arányosan

csökkentették az enzim aktivitását 20 percet követően. Az 1 mM kadmium jelenlétében esett vissza a legjobban az enzim aktivitása, 38%-ra.



34. ábra. Különböző koncentrációban alkalmazott fémek hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú enzimaktivitására.

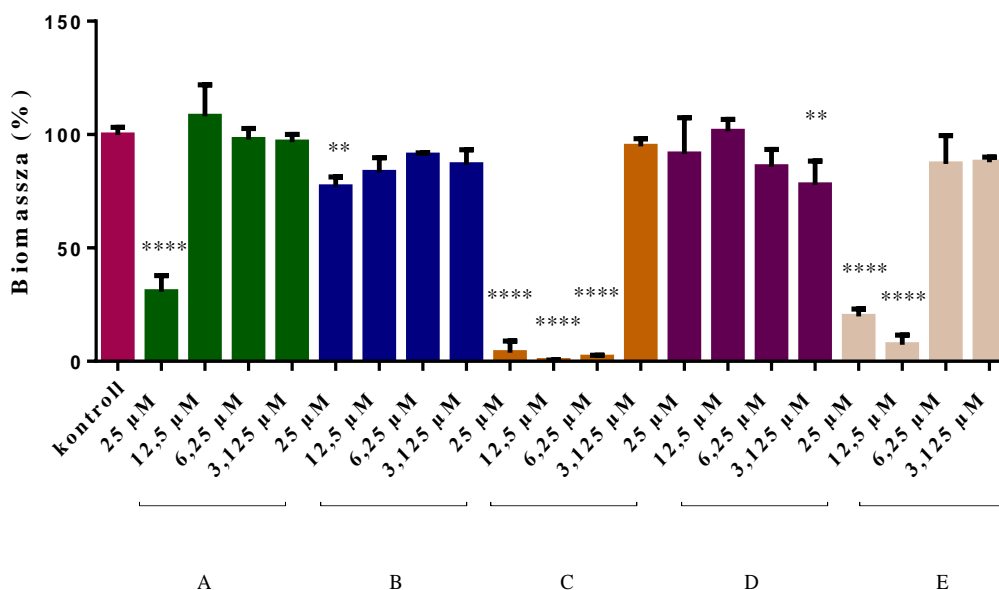
A: Mn, B: Cu, C: Fe, D: Ni, E: Cd

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analízise segítségével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, **: $p < 0,005$, *: $p < 0,05$.

6.12 Herbicidek és fungicidek hatásának jellemzése az enzimtermelésre és az enzimaktivitásra

A kísérlet során alkalmazott kontrollt metanollal egészítettük ki, a kontrollnál mért értékeket 100%-nak tekintettük. A vizsgálat 9 napig tartott, a mintavételezés 3 naponta történt. A 3., illetve még a 6. napon sem befolyásolja jelentősen a sejtszámot a karbendazim, a klórtoluron, a két legalacsonyabb koncentrációjú 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav és a mankozeb (**35. ábra**). Minden hozzáadott vegyület kivétel a 12,5 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav és a 12,5 μM karbendazim a 9. napra csökkentette a sejtszámot, a legnagyobb mértékben a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, a linuron és a mankozeb legmagasabb koncentrációi. A 25 μM 2,4-diklór-fenoxi-

ecetsav és klór-toluron, a 25 μM , 12,5 és 6,25 μM linuron, a 3,125 μM karbendazim, továbbá a 25 és 12,5 μM mankozeb viszont szignifikánsan gátolja a törzs szaporodását.

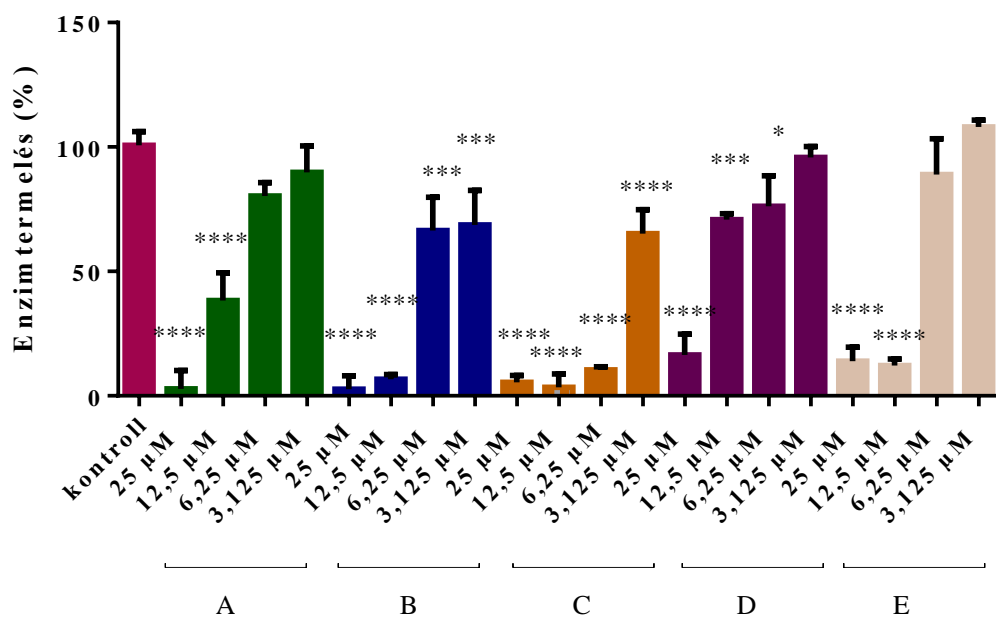


35. ábra. A vizsgált herbicidek és fungicidek hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs 620 nm-en mért optikai denzitására a tenyésztés 9. napján.

A: 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, B: klór-toluron, C: linuron, D: karbendazim E: mankozeb.

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analízisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, **: $p < 0,005$.

A 6. napi mintavételezés során csak a 6,25 és 3,125 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav-, 3,125 μM karbedazim-, valamint a 6,25 és 3,125 μM mankozeb-koncentrációk mellett nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a kimotripszin-típusú proteáz enzimtermelésében (**36. ábra**). A 25 és 12,5 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, a 25 és 12,5, 6,25 és 3,125 μM klór-toluron, a 25, 12,5 és 6,25, 3,15 μM linuron, a 25 és 12,5 μM karbendazim és a 25 és 12,5 μM mankozeb mellett tapasztaltunk szignifikáns csökkenést.



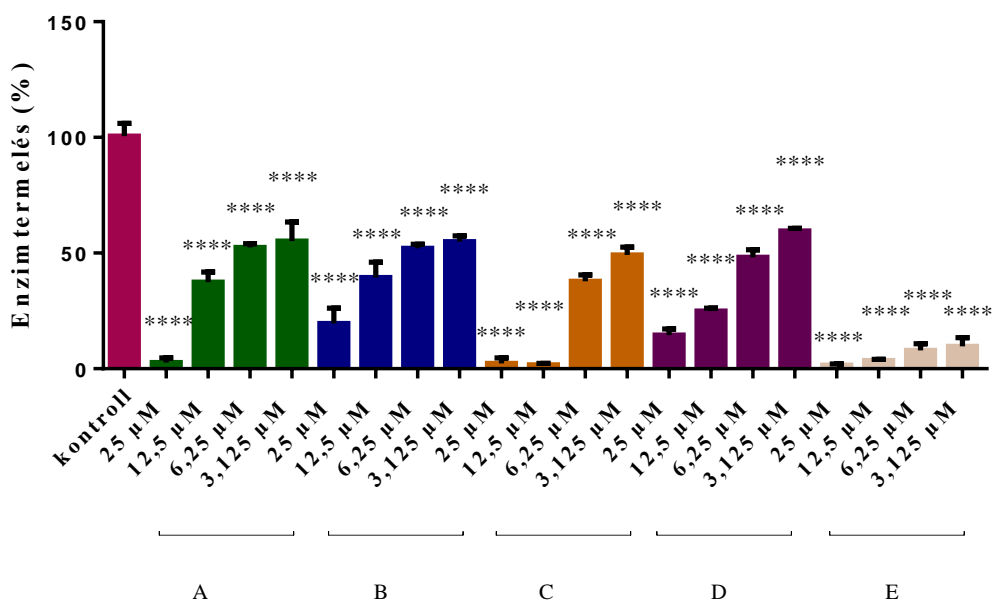
36. ábra. A vizsgált vegyületek hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz enzimtermelésére a kísérlet 6. napján.

A: 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, B: klór-toluron, C: linuron, D: karbendazim, E: mankozeb.

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analizisével végeztük.

A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$, *: $p < 0,05$.

A 9. napon a vegyületek hatása az izolátum enzimtermelésére jelentős negatív hatással van (**37. ábra**). A legnagyobb visszaesést a 25 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, a 25 és 12,5 μM linuron, valamint a 25, 12,5, 6,25 és 3,125 μM mankozeb esetében tapasztaltuk, mind a hét esetben 20%-alá esett vissza a termelődés mértéke.



37. ábra. A vizsgált vegyületek hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz enzimtermelésére a kísérlet 9. napján.

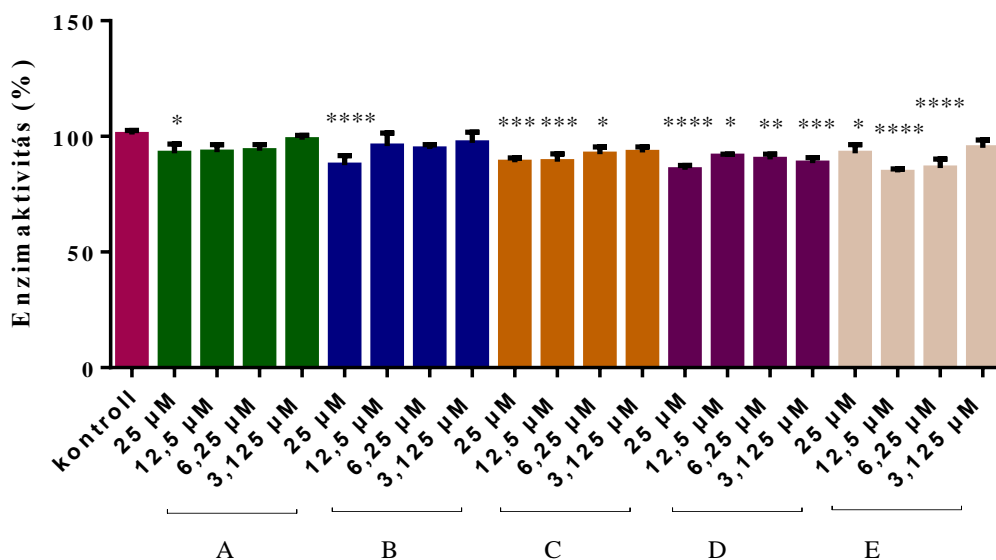
A: 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, B: klór-toluron, C: linuron, D: karbendazim, E: mankozeb.

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analízisével végeztük. A szignifikancia-értékeket (p -érték) a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$.

Floch és munkatársai (2011) számos talajenzim (arilamidáz, arilszulfatáz, celluláz, fluoreszcein-diacetát-hidroláz, β -galaktozidáz, β -glükózidáz, fenol-oxidáz, lúgos és savas foszfomonoészteráz, foszfodiészteráz, foszfortriészteráz) aktivitásának detektálásával végezték el a herbicidek, fungicidek, inszekticidek, akaricidek hatásának vizsgálatát a talaj mikrobaközösségre. Az aktivitási vizsgálatokat 2, 6 és 12 hónap elteltével végezték el. 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav hatásának vizsgálata során a celluláz, fluoreszcein-diacetát-hidroláz, β -galaktozidáz, lúgos foszfomonoészteráz és foszfortriészteráz aktivitások esetében találtak szignifikáns csökkenést. A mankozeb esetében az arilamidáz, arilszulfatáz, fluoreszcein-diacetát-hidroláz, β -glükózidáz, lúgos és savas foszfomonoészteráz és foszfodiészteráz aktivitások mutattak szignifikáns csökkenést. Az arilamidáz, arilszulfatáz, celluláz, β -galaktozidáz, β -glükózidáz, lúgos és savas foszfomonoészteráz, foszfodiészteráz, foszfortriészteráz aktivitásban szignifikáns csökkenést tapasztaltak linuron hatására (Floch és mtsai. 2011). Salunkhe és munkatársai (2014) 4 kiváló biokontroll tulajdonságokkal rendelkező *Bac. subtilis* törzs esetében vizsgálták a karbendazim szénforrásként történő hasznosítását. A sejtszám vizsgálata során szignifikáns csökkenést nem tapasztaltak a kontrollként alkalmazott

glükózhoz képest. Vizsgálataink során csupán a 3,125 μM (legalacsonyabb koncentrációjú) karbendazim esetében tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a sejtszámban. Mohiddin és Khan (2013) munkájuk során hat peszticid biokontroll gombára (*Tri. harzianum*, *Tri. virens*, *Poc. chlamydosporia*) és baktériumokra (*Bac. subtilis* és *Pse. fluorescens*) gyakorolt hatását tanulmányozták. Vizsgálataikba a karbendazim, mankozeb, metalaxil, kaptán és tirám mellett a nemacur nevű szert vonták be. A vizsgált *Bac. subtilis* törzs esetében a maximálisan tolerált karbendazim-koncentrációt 261,78 μM -nak; a maximálisan tolerált mankozeb-koncentrációt pedig 1,1 μM -nak határozták meg. Fantroussi és munkatársai (1999) egy gyümölcsösből származó talajmintát tíz éven keresztül, évente kezeltek különböző fenilurea-származékokat tartalmazó herbicidekkel; diuronnal, linuronnal és simazinnal, vagy klór-toluronnal. A heterotróf baktériumok száma mindhárom kezelt minta esetében szignifikánsan kisebb volt, mint a kezeletlen mintában.

Az enzimaktivitás vizsgálata során a kontroll mintát peszticidvegyületet nem tartalmazó metanollal egészítettük ki, és ehhez viszonyítottuk az egyes peszticidvegyületek hatását. Nem kaptunk szignifikáns csökkenést a 12,5, 6,25 és 3,125 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, a 12,5, 6,25 és 3,125 μM klór-toluron, valamint a 3,125 μM linuron és mankozeb esetében, míg a 25 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, a 25 μM klór-toluron, a 25, 12,5 és 6,25 μM linuron, a 25, 12,5 és 6,25 μM mankozeb, továbbá a karbendazim mind a négy alkalmazott koncentrációja szignifikáns csökkenést eredményezett a törzs által termelt kimotripszin-típusú proteáz aktivitásában (**38. ábra**).



38. ábra. Vizsgált vegyületek hatása a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs kimotripszin-típusú proteáz enzimaktivitására.

A: 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, B: klór-toluron, C: linuron, D: karbendazim, E: mankozeb.

A szignifikancia megállapítását a variancia *Bonferroni post hoc* tesztjének egyirányú analízisével végeztük.

A szignifikancia-értékeket (p-érték) a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,005$, *: $p < 0,05$.

6.13 A törzs fengicin- és bacilizin-termelésének jellemzése

A törzs fengicintermelésének vizsgálata során történt napi mintavételezésnél jól látszik, hogy mind a fermentlében, mind a tisztított minták esetében a 2. napon jelenik meg olyan komponens, melyre a *Bip. bicolor* tesztörzs érzékeny (14. táblázat). A tisztított minták esetében nagyobb gátlást értünk el.

A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs bacilizintermelésének vizsgálata során mindkét vizsgált mintasorozat esetében már a második napon tapasztaltuk a *Can. albicans* SZMC 1463 törzs érzékenységét.

14. táblázat. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs fengicintermelésének vizsgálata *Bip. bicolor* SZMC 13055 törzssel, bacilizin-termelésének vizsgálata *Can. albicans* SZMC 1463 törzssel szemben napi mintázás során (gátlási zónák sugarának átlaga mm-ben).

mintaazonosító	<i>Bipolaris bicolor</i> SZMC 13055		<i>Candida albicans</i> SZMC 1463	
	hőkezelt fermentlé	tisztított antibiotikum- preparátumok	hőkezelt fermentlé	tisztított antibiotikum- preparátumok
0. nap	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1. nap	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
2. nap	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00
3. nap	4,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	3,00±0,00
4. nap	5,00±0,00	7,00±0,00	6,00±0,00	4,00±0,00
5. nap	5,00±0,00	7,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00
6. nap	5,00±0,00	7,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00
7. nap	5,00±0,00	7,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00

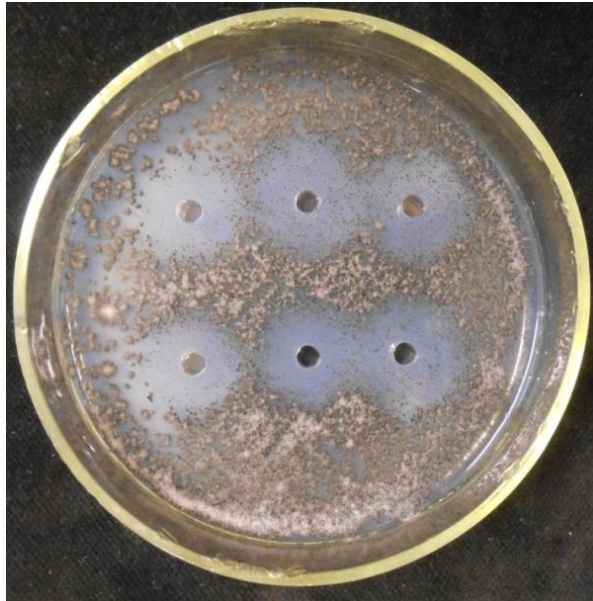
A fengicintermelésben a különböző szén- és nitrogénforrások hatásának vizsgálata során a cellobiózra, galaktózra, glicerinre, keményítőre, mannitra, L-alaninra, L-ornitinre, L-prolinra való cserét követően tapasztaltunk fokozottabb gátlást a kontrollhoz képest, a tisztított minták esetében több esetben tapasztaltunk gátlást, míg csupán az enzim inaktiválása számos esetben nem vezetett gátláshoz (**15. táblázat, 39. ábra**).

A bacilizintermelés vizsgálata során a szén- illetve a nitrogénforrások cseréje csak 5 esetben (szacharóz, szorbit, trehalóz, L-treonin, nátrium-nitrát) okozott csekély emelkedést a gátlásban.

15. táblázat. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs fengicin-termelésének vizsgálata *Bip. bicolor* SZMC 13055 törzssel, bacilizin-termelésének vizsgálata *Can. albicans* SZMC 1463 törzssel szemben különböző szén- és nitrogénforrások függvényében (gátlási zónák sugarának átlaga mm-ben).

mintaazonosító	<i>Bipolaris bicolor</i> SZMC 13055		<i>Candida albicans</i> SZMC 1463	
	hőkezelt fermentlé	tisztított antibiotikum- preparátumok	hőkezelt fermentlé	tisztított antibiotikum- preparátumok
glükóz	5,00±0,00	5,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
cellobióz	6,00±0,00	5,00±1,73	0,00±0,00	0,00±0,00
D-alanin	0,00±0,00	5,00±1,73	0,00±0,00	0,00±0,00
D-ribóz	0,00±0,00	5,00±1,00	0,00±0,00	5,33±4,62
D-xilóz	3,00±0,00	5,00±1,00	0,00±0,00	0,00±0,00
eritrit	0,00±0,00	4,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
etanol	0,00±0,00	4,33±1,15	0,00±0,00	0,00±0,00
fruktóz	5,00±0,00	5,00±0,00	0,00±0,00	7,00±0,00
galaktóz	4,00±0,00	7,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
glicerin	6,00±0,00	9,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
keményítő	7,00±0,00	6,33±3,06	1,33±2,31	7,00±0,00
L-arabinóz	4,00±0,00	4,67±2,08	0,00±0,00	3,33±2,89
L-ramnóz	2,00±0,00	8,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
L-triptofán	0,00±0,00	4,00±2,00	0,00±0,00	0,00±0,00
mannit	6,00±1,00	6,67±1,15	0,00±0,00	0,00±0,00
m-inozit	4,00±0,00	5,00±0,00	1,67±2,89	5,67±2,08
nátrium-acetát	0,00±0,00	5,33±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00
szacharóz	5,00±0,00	5,00±0,00	6,00±0,00	9,00±0,00
szorbit	4,00±0,00	4,00±0,00	0,00±0,00	9,00±0,00
trehalóz	3,00±0,00	4,00±0,00	0,00±0,00	9,00±0,00
nátrium-glutamát	5,00±0,00	5,00±0,00	7,00±0,00	6,67±0,58
ammónium- szulfát	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
L-alanin	6,00±0,00	8,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
L-aszparaginsav	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

L-ornitin	0,00±0,00	7,00±0,00	2,67±2,31	2,67±2,31
L-prolin	0,00±0,00	6,00±0,00	3,67±3,21	3,33±2,89
L-szerin	0,00±0,00	5,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
L-tirozin	0,00±0,00	3,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
L-treonin	0,00±0,00	4,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00
nátrium-nitrát	0,00±0,00	4,00±0,00	0,00±0,00	8,00±0,00



39. ábra. L-arabinóz és L-ramnóz hatásának vizsgálata a fengicintermelésre a *Bipolaris bicolor* SZMC 13055 törzssel szemben T1-es táptalajon, 1 hetes inkubációt követően. Tisztított antibiotikum-preparátumok.

6.14 *Bac. subtilis* SZMC 6179J hemolitikus tulajdonságainak és szurfaktintermelésének kiértékelése

Egy hét elteltével a metanosz extraktumot tartalmazó lyukak körül áttetsző zónákat tapasztaltunk, melyek sugarának átlaga $18,33 \pm 2,52$ mm volt (**40. ábra**). A baktériumok jelentős része vérsejtoldó (hemolízist kiváltó) anyagokat termel. A törzsre β -hemolízis jellemző, tehát a hemoglobin teljesen elbomlik.



40. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs hatása a vér alakos elemeire T7-es táptalajon 7 nap inkubációt követően.

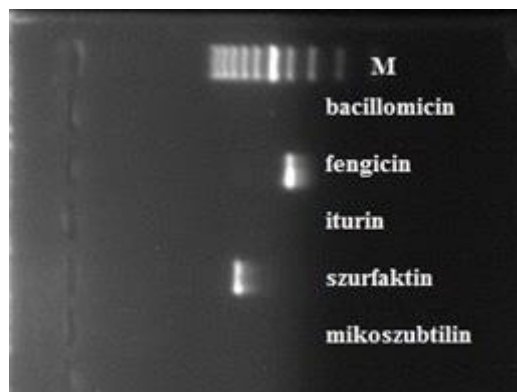
A direkt bioautográfias vizsgálat során a vizes előhívást követően 2 komponens látszódott, melyek Rf értékei 0,72 illetve 0,8 (**41. ábra**). Ezen szakaszok körül a defibrinált birkavért tartalmazó táptalajon feltisztulási zóna jelent meg, ami szurfaktinnak köszönhető. A szurfaktin jól ismert hemolízist kiváltó tulajdonságáról (Luo és mtsai. 2015).



41. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs szurfaktintermelésének bizonyítása direkt bioautográfias módszerrel.

6.15 Antibiotikumok (bacillomicin, fengicin, iturin, mikoszubtilin, szurfaktin) termelődéséért felelős gének azonosítása

A 42. ábrán látható gélképen a vizsgált antibiotikumok közül a fengicinre és a szurfaktinra jellemző méretű PCR-termékeket láthatjuk.



42. ábra. Antibiotikumok szintézisében résztvevő gének detektálása PCR-rel M: Marker 100 bp Ladder Plus

Az internetes *in silico* PCR szerver (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) segítségével felmértük, mennyire jellemző bacillomicin, fengicin, iturin, mikoszubtilin, szurfaktin antibiotikumok termelése különféle *Bacillus* törzsekre. A bacillomicin termelése esetében egy 864 bp-nyi hosszú szakasz megjelenését vártuk a PCR-t követően. Az általunk vizsgált adatbázis *Bacillus* törzsei közül csak néhány *Bac. amyloliquefaciens* törzsben találtuk meg ezt a szakaszt. Fengicin esetében egy 351, 352 vagy 375 bp méretű szakasz amplifikálódik, az SZMC 6179J törzs esetében 375 bp-os szakasz jelent meg. Az adatbázisban szereplő törzsek közül elmondhatjuk, hogy minden *Bac. amyloliquefaciens* törzsre jellemző a fengicintermelés képessége, míg a *Bac. anthracis*, *Bac. thuringiensis*, *Bac. toyonensis* és *Bac. weihenstephanensis* törzsekben nem található meg ez a szakasz. A *Bac. subtilis* törzsek közül csak négy, az adatbázisban szereplő törzsre jellemző a fengicintermelés (*Bac. subtilis*, *Bac. subtilis* BEST7613 DNA, *Bac. subtilis* QB928, *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 6051-HGW).

Iturin esetében a gélen 1200 vagy 1203 bp méretű szakasz megjelenését vártuk. Az SZMC 6179J törzsben ez a gén nem volt detektálható. A *Bacillus* törzsek közül néhány *Bac. amyloliquefaciens* törzsre jellemző a gén jelenléte, illetve 2 *Bac. subtilis* törzs (*Bac. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10, *Bac. subtilis* subsp. *spizizenii* str. W23) is képes iturintermelésre. A mikoszubtilin termeléséért felelős gént a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzsben nem azonosítottuk. Az adatbázisban egyedül a *Bac. subtilis* subsp. *spizizenii* str. W23 törzsre jellemző a 849 bp méretű szakasz amplifikálódása.

Az SZMC 6179J törzs szurfaktintermelése már bizonyított (Szekeres és mtsai. 2013, Bóka és mtsai. 2016). Az adatbázisban szereplő törzseknél egy 675 és egy 676 bp méretű szakasz jelezte a szurfaktinszintézisért felelős gén meglétét, mely az adatbázisban szereplő *Bacillus* fajok közül egyedül a *Bac. subtilis* törzsekre (*Bac. subtilis* BEST7613 DNA, *Bac. subtilis* BSn5, *Bac. subtilis* PY79, *Bac. subtilis* QB928, *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 6051-HGW, *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* RO-NN-1, *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. BSP1) jellemző.

6.16 A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs szurfaktin izoformái

6.16.1 Szurfaktin izoformák MS-vizsgálata

Az analitikai munka első lépéseként az alkalmazott Varian 500-MS ESI-IT-MS rendszer optimalizálása érdekében mind pozitív, mind negatív módban elvégeztük a tömegspektrometriás paraméterek hangolását, ideértve az RF loading-ot, a kapilláris- és tűfeszültségeket. A hangolási folyamat állófázis használata nélkül, 100 ng/μl koncentrációjú szurfaktin referenciavegyület folyamatos injektálása mellett (5 μl/perc) zajlott, melyet a rendszer beépített fecskendőpumpája valósított meg. A kapott m/z jelek a nátriummal addicionált molekuláknak ($[M+Na]^+$) feleltek meg, melyek a szakirodalom alapján alkalmasabbak a szurfaktinok aminosav-szekvenciájának megállapítására, mint a protonált formák (Pecci és mtsai. 2010, Yang és mtsai. 2006, Yang és mtsai. 2008). A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs tisztított extraktumának HPLC-s elválasztását követő full scan MS-vizsgálat eredményei alapján viszonylag nagy mennyiségben találtunk szurfaktin-vegyületeket a vizsgált extraktumban (**16. táblázat**). A full scan ESI-MS kromatogramon a különböző szurfaktinmolekulák nátrium-adduktjai nagy jelintenzitással voltak megfigyelhetők m/z 1016, 1030, 1044 és 1058 értékeknél, ami ciklikus lipopeptid vázra és a hozzá kapcsolódó zsírsavláncre enged következtetni (Pecci és mtsai. 2010). A spektrumok értékelését és a tömegspektrometriás kalkulációkat Kecskeméti Anita végezte, az elemzések az általa írt doktori disszertáció részét képezik.

6.16.2 A keletkezett szurfaktin izoformák jellemzése

Összegezve a nátriummal addicionált molekulák MS²-vizsgálatainak eredményeit, a vizsgált *Bac. subtilis* törzs különböző szurfaktin-vegyületeket termelt viszonylag nagy mennyiségben. A vizsgált fermentlében 26 szurfaktinvegyület került azonosításra, melyek a fent részletezett karakterisztikus MS² produkciók alapján három már ismert, és egy új csoportba [Val2] sorolhatók. Ezen számítások alapján a zsírsavak lánchossza a [Sur] és [Val2]

esetében 13-15 között, a [Val2,7] esetében 14-15 között, míg a [Val7] esetében 13-16 között változik. A vizsgált törzs legnagyobb számban (12) a [Sur]-izoformákat termelte, míg [Val7]-izoformákból nyolcat, a [Val2]- és [Val2,7]-izoformákból hármat-hármat termelt (**16. táblázat**). Érdekes, hogy az extrahált ion-kromatogramokon megfigyelt nátrium-addukt csúcsainak területértékei alapján a C15-[Val7] volt a legnagyobb mennyiségben jelen a termelt szurfaktinok között, míg az elsőként leírt [Sur]-izoforma C15 zsírsavlánccal csak a második legnagyobb mennyiségben volt jelen. Továbbá ezen két izoforma C14 és C15 zsírsavlánccal az összes termelt szurfaktin 80%-át adta. (**16. táblázat**).

Eredményeink megerősítik az Akpa és munkatársai (2001) által tapasztaltakat, miszerint legnagyobb mennyiségben a C15 zsírsavlánccal rendelkező szurfaktin-homológok vannak jelen. Mennyiségük mindkét esetben meghaladja az 50%-ot. Ezt követi a C14-es homológok, melyek a fent említett cikkben 35% körüli értéket mutatnak szemben az általunk tapasztalt 29,6%-os aránnyal. Akpa és mtsai. (2001) a C13-s homológokat valamivel több, mint 10%-os arányban detektálták, míg esetünkben ez az arány 8,6% volt. Érdekes módon Akpa és mtsai (2001) C16 zsírsavlancú homológ termelését az általuk optimalizált táppoldatban nem tudták kimutatni, szemben a Val, Leu, Ile, Thr hozzáadásával módosított tápközegekkel.

16. táblázat. A *Bac. subtilis* SZMC6179J fermentlevéből full scan méréssel azonosított szurfaktin-vegyületek relatív mennyisége.

Szurfaktinok	Relatív mennyiség (%) ^a	Szurfaktinok	Relatív mennyiség (%) ^a
C13-[Val2]	0,1	C14-[Sur]	10,3
C13-[Val7]	3,5	C14-[Sur]	0,8
C13-[Val7]	0,3	C14-[Sur]	1,1
C14-[Val2,7]	2,1	C15-[Val2]	0,9
C14-[Val2,7]	0,3	C14-[Sur]	2,7
C13-[Sur]	3,8	C15-[Val7]	23,2
C13-[Sur]	0,3	C15-[Val7]	1,3
C14-[Val2]	0,5	C15-[Sur]	21,9
C13-[Sur]	0,6	C15-[Sur]	3,2
C14-[Val7]	10,3	C15-[Sur]	0,1
C14-[Val7]	1,0	C15-[Sur]	2,3

C14-[Val7]	0,5	C15-[Sur]	1,3
C15-[Val2,7]	5,0	C16-[Val7]	2,6

^aA relatív mennyiségek az extrahált molekulaionok ([M+Na]⁺) terület százalékos értékei alapján kerültek megállapításra.

6.17 A törzs teljes genom szekvenciájának elemzése

6.17.1 A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs teljes genomjának fő tulajdonságai

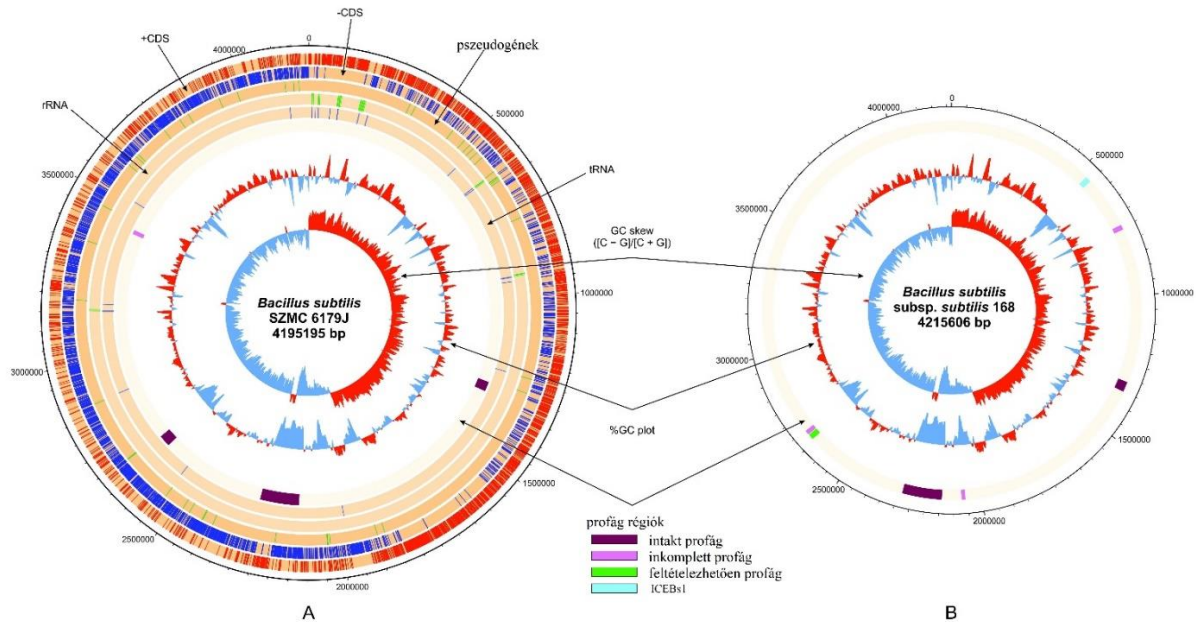
A törzs annotált teljes genomjának NCBI GenBank azonosítója NZ_CP015004.1. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzset egyetlen cirkuláris kromoszóma jellemzi, mely 4.195.195 bp: 43,6% GC- tartalommal, 4276 kódoló génnel, 46 tRNS-el, 10 rRNS-lókusszal és 13 pszeudogénnel. A genom fő tulajdonságait a **17. táblázat** foglalja össze.

17. táblázat. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs teljes genomjának fő tulajdonságai.

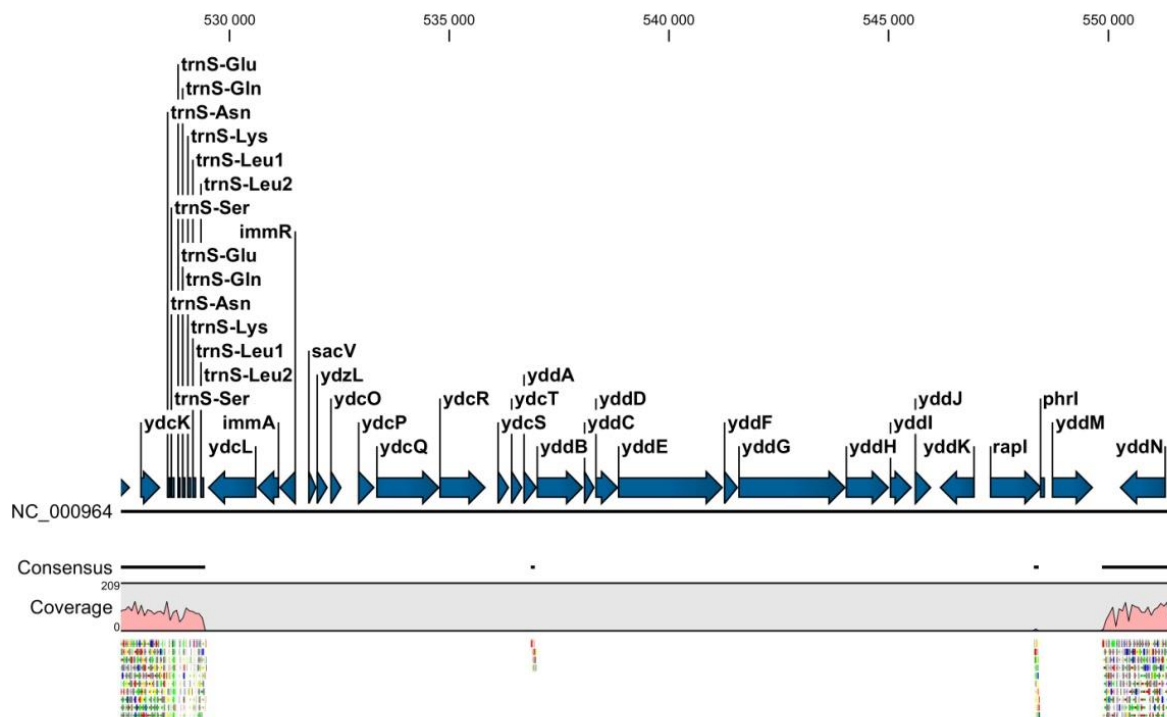
Szekvencia-információk		
A szekvencia típusa	DNS	
Méret	4.195.195 bp	
Organizmus	<i>Bacillus subtilis</i>	
SZMC szám	SZMC 6179J	
Mólsúly (egyszálú forma)	1.295.829	
Mólsúly (duplaszálú forma)	2.591.919	
Variációk (SNP+DIP)	135 (35%-os érzékenységnél)	
Nukleotideloszlás		
Nukleotid	Db	Gyakoriság
Adenin(A)	1.181.193	0,282
Citozin (C)	916.151	0,218
Guanin (G)	910.913	0,217
Timin (T)	1.186.938	0,283
C + G	1.827.064	0,436
A + T	2.368.131	0,564

A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs és a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 referenciatörzs (NC_000964) genomjának összehasonlítása során az SZMC 6179J törzsben nagy deléciókat találtunk az alábbi nukleotid-régiókban: 529444-536858, 536946-548309 és 548412-549854. Ezek a deléciók a referenciagenom egy bizonyos olyan régiójában találhatóak, melyek fágeredetű géneket tartalmaznak, ami elsőre arra utalt, hogy az egész régió profág vagy egy módosított profág-klaszter. A referenciagenom profágszekvencia-eloszlásának PHAST

szerverrel történt vizsgálata viszont nem mutatott ezen régióban profágot vagy profág-elemet. Auchtung és mtsai. (2005) írták le és jellemezték a *Bac. subtilis* típusörzsbén a 2000-es évek eleje óta ismert, 20 kb méretű integratív és konjugatív elemet (ICE), az ICEBs1-et, mely a referenciagenom ezen régiójában található (Reuss és mtsai. 2016). (43. ábra).



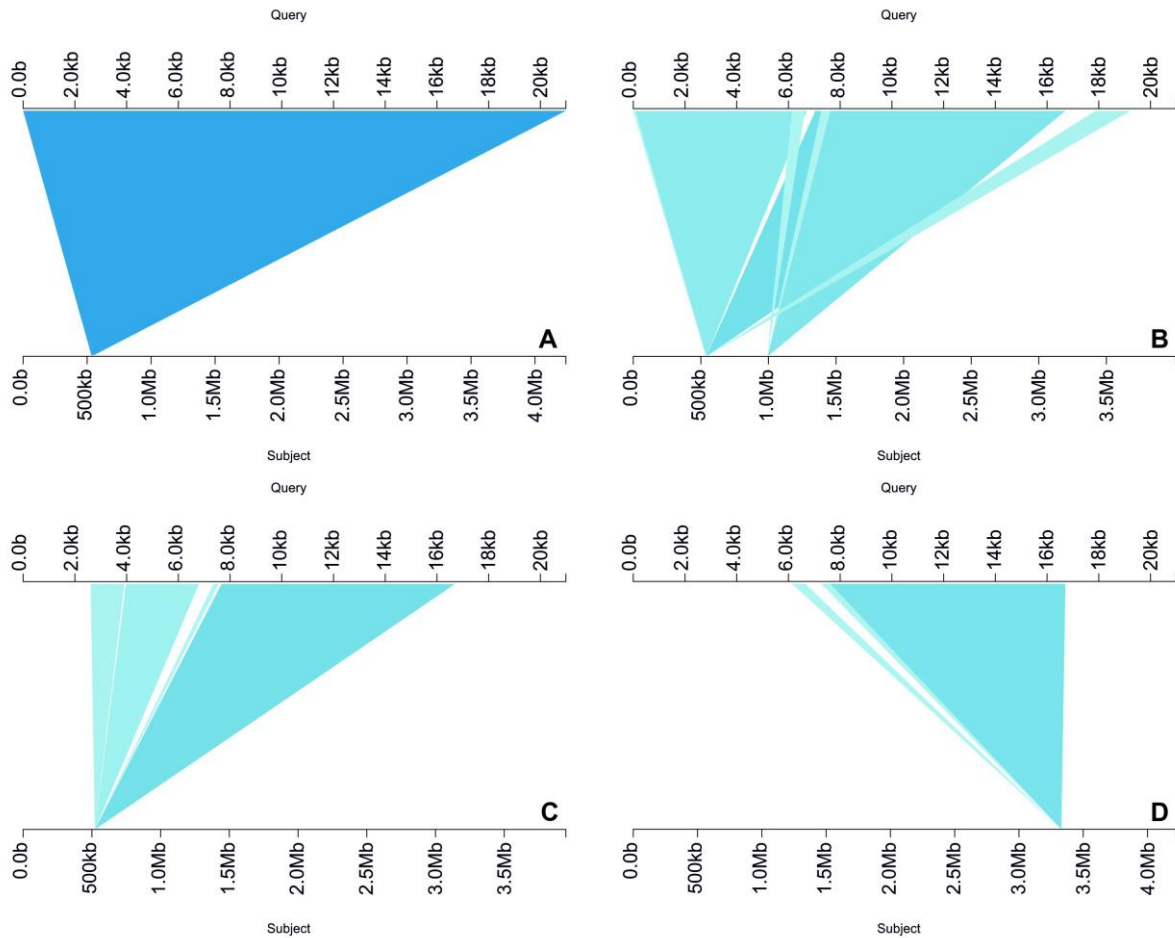
43. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J (A) és a *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 referenciatörzs (B) genomjának összehasonlítása. Az intakt, inkomplett és feltételezett profág-régiók a PHAST szerverrel végrehajtott keresés eredményei. A PHAST keresés során detektált ICEBs1 elemet (529444-549854) világoskék szín jelöli.



44. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs nagy deléciókat tartalmazó genomszakaszának összehasonlítása a referenciatörzs azonos szakaszával. A képet a CLC Genomics Workbench 5.1 szoftverrel készítettük. Deletált gének: *ydcL*: fág integráz, *immA*: immunitás antirepresszor profágokban, *immR*: fágalkotó transzkripciós regulátor, *sacV*: transzkripciós regulátor extrakromozómális elemekkel, *yzdL*: hipotetikus fehérje, *ydcO*: hipotetikus fehérje, *ydcP*: hipotetikus fehérje, *ydcQ*: DNS wieldingfehérje, *ydcR*: replikációs fehérje, mobilis elem, *ydcS*: hipotetikus fehérje, *ydcT*: hipotetikus fehérje, *yddA*-*yddG*: hipotetikus fehérjék, *yddH*: sejtfal-hidroláz, mobilis elem, *yddJ*-*yddL*: hipotetikus fehérjék, *yddM*: helikáz mobilis elem, *rapL*: aszpartát foszfátáz regulátor, *phrL*: foszfátáz szekretált regulátora.

Korábbi adatok alapján ezen régió sok ismeretlen funkciójú nyitott leolvasási keret tartalmaz, Auchtung és mtsai. (2016) publikációjából tudjuk, hogy a 25 nyitott leolvasási keret több mint a fele már azonosított.

Ezen elem jelenlétét BLAST segítségével vizsgáltuk más *Bacillus* törzsekben is. A *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 mellett 11 további törzsben találtuk meg az ICEB₁ elemet, míg az SZMC 6179J törzs mellett ezen gének számos további *Bac. subtilis* törzsből is teljesen hiányoznak (**4. melléklet**). A szemléltetést a Kablammo szerverrel végeztük, melyről néhány példát mutatunk be a **45. ábra** segítségével.



45. ábra. A *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 törzs ICEBsI régiójának (529444-549854) vizualizálása Kablammo szerverrel néhány példán keresztül szemléltetve. A: *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 6051-HGW; B: *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* SRCM100757; C: *Bac. subtilis* TLO3; D: *Bac. subtilis* DKU NT 02.

6.17.2 A törzs pontos taxonómiai pozíciója

A törzset korábbi munkánk során (Vágvölgyi és mtsai. 2013) a *gyrA* gén szekvenálásával *Bac. subtilis*-ként azonosítottuk. A filogenetikai analízist MLST-megközelítéssel végeztük, ahol 9 gén (*gyrA*, *gyrB*, *purH*, *glpF*, *pycA*, *ilvD*, *rpoD*, *tpiA* and *pta*) vizsgálatát követően bizonyossá vált a törzs pontos taxonómiai pozíciója. Az SZMC 6179J törzs a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* csoport tagja, és filogenetikailag közel áll a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 típus-törzshöz (**4. melléklet**).

6.17.3 Egy nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNP-k) és deléció/inszerció polimorfizmusok (DIP)

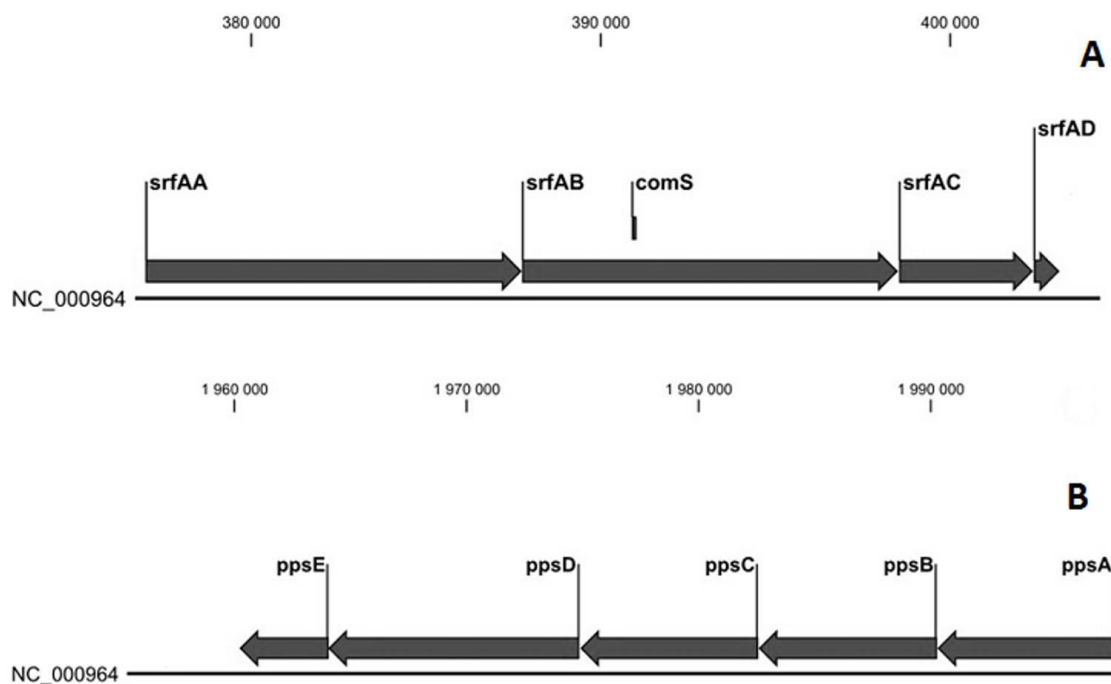
A CLC Sequence Viewer v.6.5.3 szoftver segítségével az SZMC 6179J törzsben a referenciagenommal összehasonlítva 106 SNP-t azonosítottunk, melyből 18 intergénikus régióban található. Számos SNP-nek lehet jelentős hatása a baktérium regulációs hálózataira, ezáltal befolyásolva a kompetíciós képességeit, vagy az antibiotikumok termelésének intenzitását. 46 SNP esetében aminosavcsere nélküli bázisszubsztitúcióról van szó kódoló génrégiókban. 42 SNP okoz aminosavcsere különböző géntermékekben, ebből 16 okozhat zavart az adott gén működésében. A genom struktúrgénjeiben található SNP-eket az **5. melléklet** foglalja össze. A kódoló régiókban detektált SNP-k hatására a biokontrollban szerepet játszó fontos funkciók (antibiotikum-szintézisért, extracelluláris enzimek termeléséért felelős gének) nem vesztek el. A törzs genomjában 23 deléció/inszerció polimorfizmust (DIP) is találtunk, melyek közül 9 strukturális génekben lokalizálódik (**6. melléklet**).

6.17.4 A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs genomjában található antibiotikum-klaszterek

Számos biokontroll ágens termel antibakteriális és antifungális komponenseket. A **7. melléklet** összegzi az SZMC 6179J törzs genomjának antiSMASH program segítségével kivitelezett elemzését, melyet feltételezett antimikrobiális génklaszterek azonosítása céljából végeztünk. Bár az adott génklaszterek jelenléte a genomban nem feltétlenül jelenti a megfelelő antibiotikumok szintézisért, korábbi munkánk során már bizonyítottuk az SZMC 6179J törzs esetében a patogének elnyomásában jelentős szerepet játszó antibakteriális szurfaktin és antifungális fengicin termelését (Bóka és mtsai. 2016, Manczinger és mtsai. 2011, Vágvölgyi és mtsai 2013). NCBI BLAST segítségével további *Bacillus* törzsek genomjában is megvizsgáltuk a szurfaktin és a fengicin génklaszterek megoszlását. A **46. ábra** szemlélteti a Kablammo segítségével vizualizált operonbeli különbségeket. A nemzetségben a teljes méretű szurfaktin operon megléte sokkal kevésbé jellemző, mint a fengicin operon jelenléte. Az SZMC 6179J törzs mindkét operont potenciálisan funkcionális állapotban tartalmazza. Egyéb *Bacillus* törzsekben gyakori a fengicin operon nagy méretű, vagy teljes deléciója.

6.17.5 Az *sfp* génben található DIP jelentősége

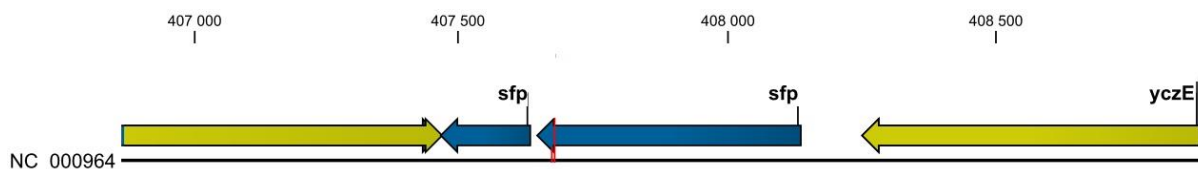
Bac. subtilis-ben a szurfaktinok termelését az *srfA* operon mediálja, mely 4 génből (*srfA-A*, *srfA-B*, *srfA-C* és *srfA-D*) áll. A plipasztatint (=fengicin) operont (*pps*) 5 gén (*ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD* és *ppsE*) alkotja (**46. ábra**).



46. ábra. A szurfaktin (*srfA*) (A) és fengicin (=plipasztatin) (B) operonok felépítése a *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 típus törzsben. A *comS* gén az *srfAB* génen belül egy fontos regulátorgén, mely a genetikai kompetenciáért felelős.

Ez a két operon azokat az NRPS-alegységeket kódolja, melyek az aminosavak szurfaktinba, illetve plipasztatinba történő beépülését katalizálják (Marahiel és mtsai. 1997; Peypoux és mtsai. 1999). Az *sfp* lókuszt egy foszforantetein-transzferázt kódol, amely a lipopeptidek termelődéséhez szükséges, mivel az NRPS-t az inaktív apo formából aktív holo formává alakítja át (Nakano és mtsai. 1988; Quadri és mtsai. 1998).

A *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 törzs genomja tartalmazza a szurfaktin- és plipasztatin-operonokat, de a funkcionális *sfp* gén hiánya miatt nem képes ezen lipopeptidek termelésére (Nakano és mtsai. 1988). A gén szekvenciája ugyan teljes a típus törzsben, de egy internális stop kodon következtében inaktív foszforantetein-transzferáz keletkezik (**47. ábra**).



47. ábra. A *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 törzsben a foszforantetein-transzferázt kódoló *sfp* gén internális stop kodont tartalmaz. A stop kodont a piros vonal jelzi. Az ábrát a CLC Sequence Viewer v.6.5.3. szoftver segítségével készítettük.

Amikor a stopkodont tartalmazó *sfp* gént egy szurfaktintermelő *Bac. subtilis* törzsből származó kópiára cserélték, mind a szurfaktin- mind a fengicinintermelés intenzíven megemelkedett a 168-as törzs transzgenikus származékában (Coutte és mtsai. 2010). Az SZMC 6179J törzsben egy nukleotiddeléció kereteltolódásos (*frameshift*) mutációt okoz, ezáltal normális szerkezetű *sfp* gént hoz létre. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J-ben az *sfp* génszekvencia 675 bp méretű. Az NCBI BlastP (Altschul és mtsai. 1997) programjával analizálva a szakaszt, az eredmény a deléció következtében egyértelműen egy teljes, aktív enzim szekvenciáját mutatja. Ez az aminosav-szekvencia teljesen azonos az alábbi 10 *Bacillus Sfp* fehérjéjével: *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. NCIB 3610 (ABV89947.1), *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. NCIB 3610 (ABV89950.1), *Bac. subtilis* MB73/2 (EME05049.1), *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 6051-HGW, (AGG59700.1), *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* (KFH30033.1), *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* (KFH34853.1), *Bac. subtilis* KCTC 1028 (AKC45888.1), *Bacillus* sp. LM 4-2 (AKE22172.1), *Bac. subtilis* (KNB76119.1), *Bac. murimartini* (KON99158.1). Feltehetően ez az egy bázisos deléció a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzset a 168-as törzsnél jobb biokontroll ágenssé teszi, mivel az SZMC 6179J törzs teljes foszforantetein-transzferázzal rendelkezik, ami képessé teszi szurfaktin és fengicin lipopeptidek termelésére. A korábbiakban TLC- illetve HPLC módszerekkel már bizonyítottuk az SZMC 6179J törzs fengicin- illetve szurfaktintermelését. (Manczinger és mtsai. 2011, Vágvölgyi és mtsai. 2013, Bóka és mtsai. 2016).

6.17.6 A *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs genomjának összehasonlítása más *Bac. subtilis* csoportok genomjával

Az NCBI genomszekvenáló projektek adatbázisainak honlapján számos, jó biokontroll képességekkel rendelkező *Bacillus* törzs teljes, annotált genomja elérhető. Earl és munkatársai (2012) publikálták négy *Bac. subtilis* (*Bac. subtilis* subsp. *subtilis* RO-NN-164 és AUSI98, *Bac. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10 és DV1-B-1) törzs és 2 közeli rokon fajba (*Bac. vallismortis* DV1-F-3(T) és *Bac. mojavensis* RO-H-1(T)) tartozó törzsek teljes genomját. Zeigler (2011) a *Bac. subtilis* subsp. *spizizenii* W23 genomszekvenciáját tette közzé. Ezen 3.6 Mb nagyságú „core” genomszekvenciát a sokat tanulmányozott modellorganizmus, a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 genomjával összehasonlítva erős konzerváltságot tapasztaltak a gének sorrendjében. A W23 genomja tartalmaz 157 olyan „non-core” genomszegmenst is, melyek a 168-as törzsben nem találhatóak meg, a 168-as törzs genomjában pedig 141 olyan szegmens található, melyek a W23 törzs genomjából hiányoznak. Deng és munkatársai (2011) az *Amorphophallus konjac* kalluszsövetéből izolált, gyökérlágyulást okozó *Pectobacterium*

carotovorum subsp. *carotovorum*-mal szemben erős gátlást mutató *Bac. subtilis* BSn5 törzs teljes genomszekvenciáját közölték, melyben a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 törzssel összehasonlítva 9 inszertálódott DNS-fragmentumot (>5 kb) találtak, 8 DNS-fragmentum (>5 kb) pedig hiányzott a BSn5 törzsből. A változások profág-szekvenciákat, a sejtfalszintézist, az antibiotikum-szintézist, a sporuláció szabályozását, mobilis elemeket, egy restriktív-modifikációs rendszert és a fő facilitátor szupercsaládot (MFS) érintik, és feltehetőleg hozzájárulnak a BSn5 endofita természetéhez. Guo és munkatársai (2013) szerint a *Bac. subtilis* XF-1 rhizobaktérium teljes genomszekvenciájában nagy génklaszterek hozhatók összefüggésbe az antimikrobiális lipopeptidek és a poliketidek nem riboszómális szintézisével, emellett a törzs rendelkezik egy olyan nagy génklaszterrel, mely a *Pla. brassicae* patogén szupresszióját okozó kitozanáz szintéziséért felelős. Guo és munkatársai (2014) a *Bac. subtilis* BAB-1 törzs teljes genomját is annotálták, és antifungális komponenseket kódoló géneket azonosítottak ebben a biokontroll *Bacillus* törzsben, mely képes elnyomni a paradicsom szürkepenészes megbetegedését. A BAB-1 törzs genomjának közel 5,2%-a felelős antimikrobiális termékek (antibiotikumok, lantibiotikumok, bacillibaktin) NRPS és poliketid szintetázok (PKS) általi szintéziséért. A törzsben sikerült lipopeptideket (szurfaktint és fengicint) is azonosítani.

Luo és munkatársai (2015) a fonalagombákkal szemben kimagaslóan hatékony *Bac. subtilis* 916 törzs teljes genomját analizálták. Ez a törzs nem csak a jól ismert három lipopeptid család tagjait (szurfaktinokat, bacillomicint és fengicint) termeli, hanem a locillomicineknek nevezett, új lipopeptid-családba tartozó vegyületeket is. A törzs genomja négy nem-riboszómális peptid szintetáz génklasztert (*srf*, *bmy*, *fen* és *loc*) tartalmaz, amelyek a szurfaktinok, bacillomicin L-ek, fengicinek és locillomicinek szintéziséért felelősek.

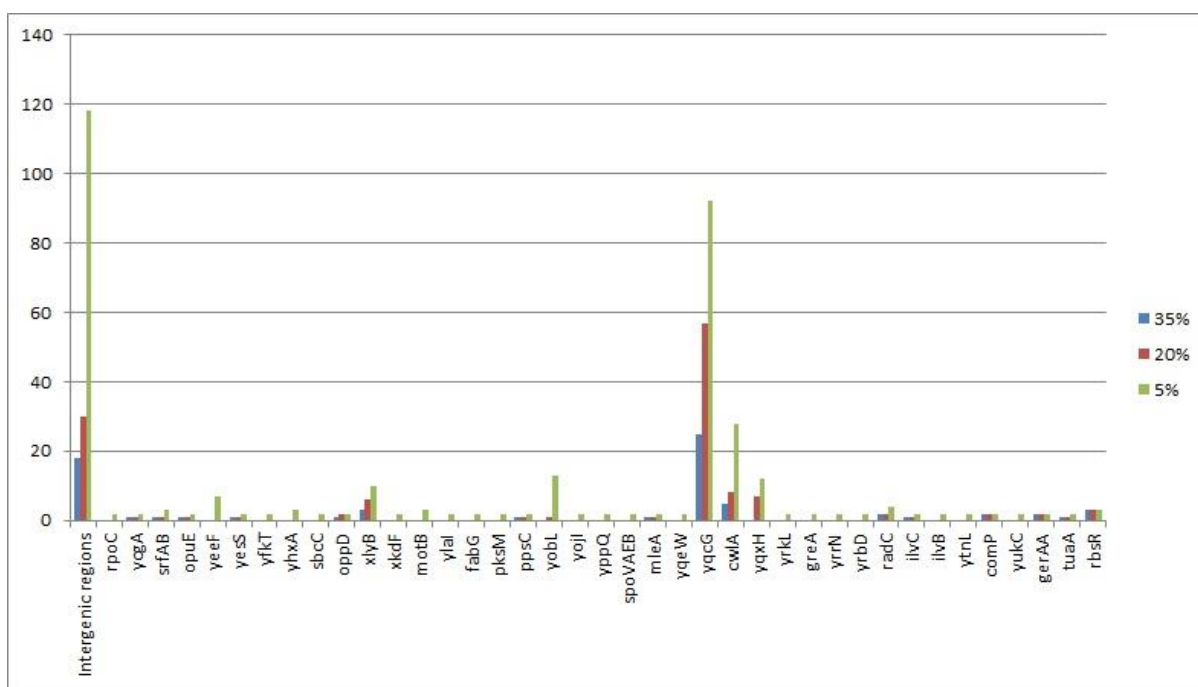
A *Fus. graminearum* ellen kiváló antagonista képességekkel rendelkező *Bac. subtilis* SG6 törzs teljes genomja 2015 óta ismert (Zhao és mtsai. 2014). A különböző *Bac. subtilis* törzsek több, mint két tucat strukturálisan különböző antimikrobiális komponens termelnek, genomjuknak pedig 4-5%-a antibiotikum-termelésért felelős géneket kódol (Stein 2005).

6.17.7 Mutációs források a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs genomjában

A törzs izolálása teljes genomjának szekvenálása előtt 2 évvel történt. Ezen idő alatt T1-es táptalajon tartottuk fenn, és körülbelül 50-szer oltottuk át. Az SNP-k keresését a hipermutációs régiók felkutatásának céljából a CLC Genomics Workbench 5.1 szoftverrel végeztük három különböző érzékenységi szint (5%, 10% és 35%) beállításával. Az új generációs szekvenálás (SOLiD) során 6531607 db 50 nukleotid hosszúságú szakaszt kaptunk.

Az összerendezés és az illesztés a referenciagenom alapján történt. A törzs genomméretét figyelembe véve az átlagos lefedési szint 77,84 volt. Az 5%-os érzékenységi szintű SNP-scan az átfedő szekvenciákban legalább 5% gyakorisággal előforduló nukleotidpozíció-variációkat mutatja.

Az SNP-k keresése az átfedő „read”-ekben megmutatja, hogy a törzs sejtpopulációjának genomszekvenciáiban mekkora variancia van, segítségével megtalálhatjuk a genom hipermutációs régióit, amelyekben nagyobb gyakorisággal jelennek meg mutációk, és alkalmas a rövid idejű evolúció kutatására is (Brown és mtsai. 2011; Watersa és mtsai. 2015). Az eredmények alapján az SNP-k nem egyenletesen oszlanak el az SZMC 6179J törzs genomjában (48. ábra).

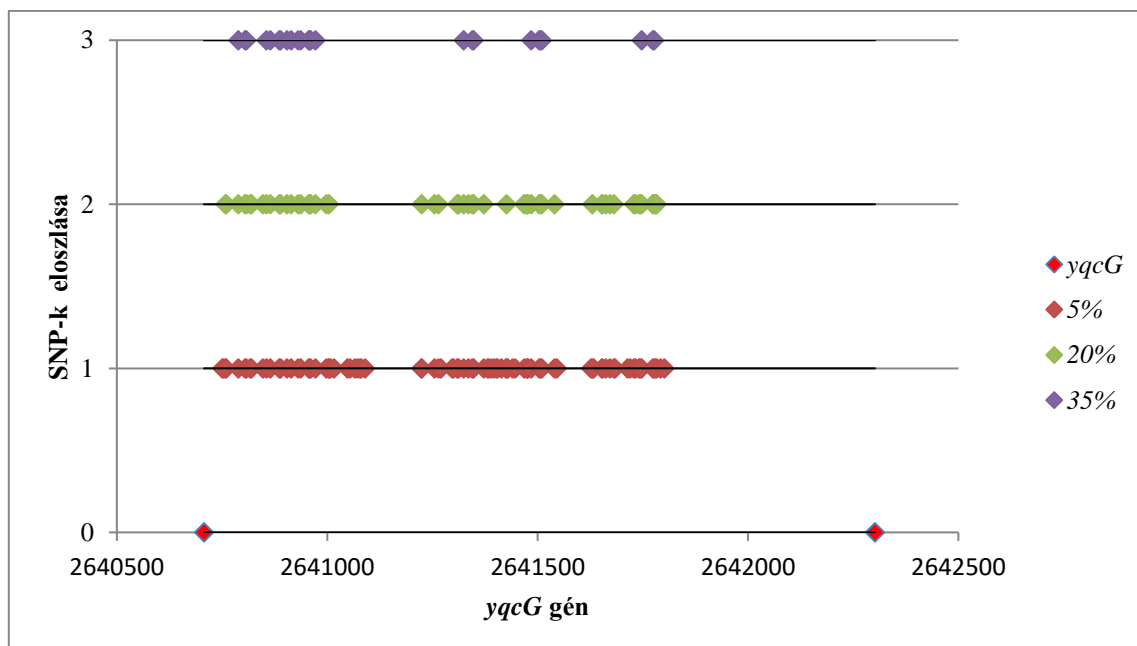


48. ábra. A *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzsben található SNP-k gyakorisága az intergénikus régiókban és különböző génekben. Csak azokat a géneket tüntettük fel, melyekben 5%-os érzékenységi szinten legalább 2 SNP található.

A legtöbb allélvariációt az *yqcG* génben találtuk, amely egy toxikus ribonukleáz kódol. Ez a gén szerepet játszik a sikeres kompetícióban: képes a *Bacillus* nemzetség egyéb képviselőinek növekedését kontaktfüggő gátlás révén elnyomni. Ezen gén terméke egy toxin-antitoxin modul toxikus komponense. A géntermék C-terminális része RNáz aktivitással rendelkezik, *Esc. coli*-ban történő expressziója során gátolja a növekedést. Az *in vitro* RNáz

aktivitását és *in vivo* növekedésgátló hatását a YqcF antitoxin neutralizálja (Holberger és mtsai. 2012).

A génben detektálható 25 SNP (35%-os érzékenységi szintnél) közül csak 5 okoz aminosavcserét, érdekes kérdés, hogy a további 20 SNP mért olyan gyakori, jelenlétük milyen szelekciós előnyt jelenthet. Az *yqcG* génen belül az SNP-k eloszlása nem véletlenszerű, a gén N-terminális régiójában 3 forrópontban (**49. ábra**) található, melyek gyakori aminosavcserét eredményeznek a toxin szekvenciájában (**7. melléklet**). A toxin N-terminális régiója felelős a szekréciónak és a toxin kompetitor bakteriális célsejtekhez történő juttatásáért. Azt feltételezik, hogy az N-terminális szekvencia felelős a toxinnak a célsejt bizonyos membránproteinjeihez történő specifikus kötődéséért, melyek a toxin citoplazmába történő bejutásában játszanak szerepet (Willett és mtsai. 2015). Tehát ha a baktériumpopuláció által termelt YqcG toxin magas N-terminális szekvencia-variációkat mutat, akkor a baktérium képes lesz többféle különböző felszíni membránfehérjével rendelkező kompetitor baktériumot elnyomni. Feltehetőleg ez az oka annak, hogy a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs *yqcG* génjében ilyen nagy a szekvencia variabilitása. Másfelől viszont egyetlen SNP-variáció sem található a C terminális régióban, ahol az RNáz-domén található. A teljes, funkcionális *yqcG* gén csak néhány törzsben található meg a nemzetségen belül, főleg a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 törzshöz közeli törzsekben (**49. ábra**). Érdekes viszont, hogy a gén néhány, távolabbi rokon törzsben (ge28, HJ0-6 vagy BSn5) is megtalálható, ami a *yqcG* gén *Bacillus* nemzetségen belüli, horizontális géntranszferrel történt átadására utalhat.



49. ábra. Az SNP-k eloszlása a *yqcG* génben három különböző érzékenységi szinten. Az x tengelyen látható piros jelek a start- és a stopkodonokat jelzik a génben.

Az *yqcG* gén mellett a *cwIA* gén tartalmazza a legtöbb SNP-t. A *cwIA* gén egy N-acetilmuramil-L-alanin amidázt kódol (Kuroda és mtsai. 1991), melynek a sporuláció során fontos szerepe van a sejtfa autolízisében. A többi génnel összehasonlítva a *yobL*, *yqxH* és a *xlyB* génekben is számos SNP található.

A feltételezések szerint a *Bac. subtilis* lokális hipermutációs jelensége kapcsolatban lehet a transzkripció-asszociált stacioner fázisú mutagenézissel, ami kapcsolatban van a target gén és az Mfd transzkripció repair kapcsoló faktor magas expressziós szintjével (Pybus és mtsai. 2010, Robleto és mtsai. 2012). Valószínűleg ez a mechanizmus működik az SZMC 6179J törzs géneiben is, és ez okozza a nagy frekvenciájú lokális hipermutációt.

A *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168-ban található YobL-CT, YxiD-CT és YqcG-CT domének citotoxikus RNáz aktivitással rendelkeznek, melyet rendre a kötődő YobK, YxxD és YqcF antitoxin-fehérjék semlegesítenek. A *yobL* gén termékének is fontos szerepe van a baktérium kontaktfüggő növekedésgátlási rendszerében, és hozzájárul a törzs sikeres kompetíciós képességeiben (Holberger és mtsai. 2012). Az *yqxH* gén terméke egy toxikus protein (holin), amely bakteriofág-eredetű. A holin-homológ YqxH-t egy profágszerű szekvencia kódolja. A holin a bakteriofágok lítikus enzimeihez hasonlóan pórusokat képez a membránban (Young és Bläsi 1995). A *cwIA*-hoz hasonlóan az *xlyB* is egy profág-eredetű autolizin-gén, amely szintén egy N-acetilmuramil-L-alanin-amidázt kódol (Krogh és mtsai.

1998). Eredményeink alapján tehát a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs sejtpopulációjában a kompetícióban, illetve a sejtfallízisben szerepet játszó génekben a leggyorsabb az evolúció.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Az egész világon fontos a termelők számára a gomba- illetve növénypatogének elleni védekezés. A kémiai peszticidek használata napjainkban világszerte elterjedt. Ezen védekezés hatékonysága vitathatatlan, azonban a kezeléssel járó környezeti terhelés jelentős. A mai környezettudatos világban egyre nagyobb az igény a kevésbé környezetromboló alternatív megoldások iránt. Ilyen útvonal lehet a biokontroll ágensek alkalmazása. A szakirodalom számos kiváló biokontroll ágensről tudósít. Az egyik ilyen faj a *Bacillus* nemzetségbe tartozó *Bac. subtilis*.

Munkánk során célul tűztük ki az általunk izolált *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs biológiai védekezésben betöltött kiemelkedő szerepének alátámasztását, a törzs ökofiziológia jellemzését, *in vitro* antagonista képességeinek felmérését. A kompetíció hátterének vizsgálata során célul tűztük ki a biokontroll ágens által termelt extracelluláris enzimek, illetve antibiotikumok termelésének elemzését, a törzsből spontán sztreptomycin-rezisztens mutánsok izolálását követően a mutánsok kimotripszin-típusú proteáz-termelésének vizsgálatát és a sztreptomycin-rezisztens törzsek *rpsL* génjének szekvenciájában bekövetkezett változások feltárását. Célul tűztük ki az izolátum enzimtermelésének vizsgálatát különböző környezeti tényezők függvényében, a törzs által termelt ciklikus lipopeptidek, különösen a szurfaktin-típusú vegyületek jellemzését, továbbá az általunk izolált *Bac. subtilis* SZMC 6179J és a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 típus törzs teljes genomjának összehasonlító elemzését.

A törzs ökofiziológiai vizsgálata során optimális növekedéséhez az alábbi körülményeket találtuk a legjobbnak: 40 °C, pH 7 és 7,6 közötti érték és $a_w=0,995$.

A vizsgált növénypatogének közül a törzs a botritiszes rothadást okozó *Bot. cinerea* SZMC 14526, a *Bip. bicolor* SZMC 13055, *Cur. spicifera* SZMC 13060, *Phy. infestans* SZMC 6246J törzsekkel; továbbá 3 *Armillaria* törzs, az *Arm. mellea* SZMC 24132, *Arm. gallica* SZMC 24095 és az *Arm. ostoyae* SZMC 24129 ellen tapasztaltunk 50%-nál nagyobb biokontroll index-értékeket.

A hazai gombatermesztésben a zöldpenész kiemelkedő problémát okoz. A *Trichoderma*-val fertőzött komposzt jelentősen csökkenti a terméshozamot, ezzel jelentős károkat okozva a gombatermesztésben. A vizsgált *Trichoderma* törzsek közül 4 *Tri. pleuroti* törzs esetében 50% feletti BCI-értékeket mértünk a 0,2% glükózt és 0,2% élesztőkivonatot és 2% agar tartalmazó táptalajon.

Az *Aspergillus* törzsek közül 3 *Asp. awamori* (SZMC 2985, SZMC 3213, SZMC 3218), 1 *Asp. flavus* SZMC 3233 és 2 *Asp. niger* (SZMC 2761, SZMC 2764) törzs esetében tapasztaltunk 30%-nál nagyobb BCI-értéket, 50%-nál nagyobb biokontroll értékeket egyik törzssel szemben sem tapasztaltunk. Ezek a fonalagombák másodlagos toxikus anyagcsereterméket termelnek, és jelentős károkat képesek okozni a mezőgazdaságban, mivel az aflatoxinokat és az ochratoxinokat termelő *Aspergillus* fajok széles körben elterjedtek.

Növénypatogén baktériumokkal szembeni *in vitro* antagonizmus tesztejünk során a vizsgált *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16160 törzssel szemben kiemelkedő gátlást tapasztaltunk. A *Cla. michiganensis* SZMC 0016 az általunk vizsgált három pH-értéken már a 2. napon nem volt kimutatható a tenyészetből. A *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6085 törzssel szemben e kísérleti közegben 6-os és 8-as pH-n nem sikerült a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzsnek elnyomni ezt a patogént, de a 7-es pH-n képes volt gátolni azt. A vizsgált növény- és gombapatogén *Pseudomonas* törzsekkel (*Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16160, illetve *Pse. tolaasii* SZMC 16149) szemben nem tapasztaltunk gátló hatást. A növénypatogén *Rhizobium* és *Allorhizobium* törzsek közül egyedül az *All. vitis* SZMC 21396 törzs esetében tapasztaltunk gátló hatást.

A törzs további jellemzése során megállapítottuk, hogy a biológiai védekezés szempontjából fontos kompetícióban előnyt jelentő sziderofórtermelő tulajdonsággal rendelkezik, lipáz-, kazeináz-, kitináz- és zselatináz aktivitása nincs, a keményítő bontására viszont képes.

A törzs extracelluláris enzimek termelésére való képességének vizsgálatát előzetes eredmények alapján ötféle tápoldatban vizsgáltuk. A legeredményesebbnek a Besson-féle tápoldatot találtuk. Az extracelluláris enzimek vizsgálata során a kimotripszin-típusú és a tripszin-típusú proteáz termelését találtuk kiemelkedőnek a vizsgált proteáz, β -glükozidáz, N-acetil-glükózaminidáz, kitobiozidáz, palmitoil-észteráz, cellobiohidroláz és lipáz aktivitások közül.

A vad törzsből izolált 169 spontán sztreptomycin-rezisztens mutáns közül 12 mutatott fokozott enzimtermelést. A spontán sztreptomycin-rezisztens mutánsok *rpsL* génjének szekvenciaanalízise során néhány esetben nukleotid-tranzíciót (timin helyett adenin, illetve adenin helyett guanin) mutattunk ki.

Vizsgáltuk a törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelését az idő függvényében, az enzimtermelésben a 3. naptól követően nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést.

Vizsgáltunk a törzs növekedését és kimotripszin-típusú proteáz termelését különböző szén-illetve nitrogénforrások jelenlétében. A szén források cseréjét követően az adonit, D-xilóz, eritrit, galaktóz, L-arabinóz, L-ramnóz és szacharóz esetében tapasztaltunk nagyobb növekedést a törzs biomasszájában, az enzim vizsgálat során pedig a cellobióz, D-xilóz, fruktóz, glicerín, keményítő, szacharóz jelenlétében tapasztaltunk szignifikáns kimotripszin-típusú proteáz termelést.

A nitrogén források cseréje során egyedül az L-alanin esetében tapasztaltunk biomassza növekedést, míg az L-aszparaginsav és az L-tirozin jelentős sejtszám-csökkenés következett be. A nitrogén források cseréje során minden esetben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kimotripszin-típusú proteáz termelésben.

A glükóz, élesztőkivonat és a tenyésztési idő növekedésre, illetve proteáztermelésre kifejtett hatásának vizsgálata során prediktáltuk az optimális biomasszának megfelelő időt, (5,5 nap) és az optimális glükóz- (11 g/l) és élesztőkivonat-koncentrációt (5,5 g/l). A legmagasabb relatív enzimaktivitást az első napon mértük 2 g/l glükóz és 5,5 g/l élesztőkivonat esetében.

Glükóz, nátrium-glutamát, valamint réz-szulfát a törzs növekedésére és kimotripszin-típusú proteáz-termelésére gyakorolt hatásának vizsgálata során a 30 g/l glükóz, 10 g/l nátrium-glutamát és 1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ koncentráció mellett értük el a legnagyobb biomasszát. A kimotripszin-típusú proteáz termelődésének a 30 g/l glükóz és 10 g/l nátrium-glutamát kedvezett leginkább, 1 mg/l koncentrációjú $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ jelenlétében.

Glükóz, nátrium-glutamát, valamint vas-szulfát hatását tanulmányozva a legnagyobb biomasszát 15,5 g/l glükóz, 10 g/l nátrium-glutamát és 40 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ mellett tapasztaltuk. A legnagyobb proteáz aktivitást 30 g/l glükózt, 1 g/l nátrium-glutamátot és 40 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazó fermentlében tapasztaltuk.

A továbbiakban a törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelésének vizsgálatát végeztük különböző fémionok hatására, illetve különböző herbicidek és fungicidek jelenlétében.

A fémionok hatásának vizsgálata során a mangán-szulfát jelentősen növelte a törzs növekedését, 0,1 mM mangán jelenlétében megháromszorozódott a vizsgált fermentlé optikai denzitása. A réz-, vas-, nikkell- és kadmium-szulfát jelenlétében a törzs növekedése jelentősen gátolt volt, kizárólag a 0,1 mM-os koncentráció jelenlétében mutatott toleranciát, a magasabb koncentrációk erősen gátolták a növekedést.

A kimotripszin-típusú proteáz termelésének vizsgálata során a mangán-szulfát jelenlétében történő fokozott enzimtermelésről számoltunk be. Az 1, 0,5 és 0,1 mM réz-szulfát szignifikánsan csökkentette az enzim termelődését. Az 1 mM vas-szulfát szignifikánsan

csökkentette, a 0,5 mM vas-szulfát nem befolyásolta szignifikánsan, a 0,1 mM vas-szulfát pedig növelte az enzimtermelődést. A nikkell- és kadmium-szulfát esetében mindhárom alkalmazott koncentráció jelentősen gátolta a kimotripszin-típusú proteáz termelését. A törzs növekedését tekintve jelentős réz- és a kadmium-szulfát toleranciával rendelkezik, ezzel szemben a proteáz szekréciónak ezek a fémek már alacsonyabb koncentrációk mellett is teljesen blokkolják.

A fémionok enzimaktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy 1 és 0,5 mM mangán-, réz-, vas- és kadmium-szulfát jelenlétében csökkent az enzimaktivitás. A 0,1 mM mangán-, réz-, vas- és kadmium-szulfát nem okozott szignifikáns változást az enzimaktivitásban, míg a nikkell-szulfát mindhárom vizsgált koncentrációban gátolta a törzs kimotripszin-típusú proteáz aktivitását.

A herbicidek és fungicidek növekedésre gyakorolt hatásának vizsgálata során a kísérlet 9. napján a sejtszámban szignifikáns csökkenéseket 25 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, és klórtoluron; 25, 12,5 és 6,25 μM linuron, 3,125 μM , valamint 25 és 12,5 μM mankozeb esetében tapasztaltunk. A 6. napon a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, a klórtoluron, a linuron, a karbendazim és a mankozeb 25 és 12,5 μM -os koncentrációi jelentősen gátolták a törzs kimotripszin-típusú proteáz-termelő képességeit. A klórtoluron és a linuron alacsonyabb koncentrációi (6,25 és 3,125 μM) is gátolták az enzimtermelést. A 6,25 és 3,125 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav és mankozeb, valamint a 3,125 μM karbendazim esetében tapasztaltunk nem szignifikáns különbséget a kimotripszin-típusú enzim termelésében. A vizsgálat 9. napján a peszticidek a törzs enzimtermelésére negatív hatással voltak.

A 25 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav és klórtoluron, továbbá a 25, 12,5 és 6,25 μM linuron és mankozeb, valamint a karbendazim mind a négy alkalmazott koncentrációja szignifikáns csökkenést eredményezett a törzs által termelt kimotripszin-típusú proteáz aktivitásában.

A törzs fonalgombák ellen hatékony fengicin- és bacilizintermelését bioteszttel vizsgáltuk hőkezelt fermentlé, illetve tisztított antibiotikum-preparátum segítségével az idő függvényében, különböző szén- illetve nitrogénforrások jelenlétében. Mindkét antibiotikum termelését már a második napon detektáltuk. A szén- illetve nitrogénforrások fengicinintermelésre gyakorolt hatásának vizsgálata során a cellobióz, galaktóz, glicerin, keményítő, mannit, L-alanin, L-ornitin, L-prolin csere okozott emelkedett gátlást, a tisztított antibiotikum-preparátum több esetben vezetett gátláshoz, mint az enzim-inaktivált fermentlé. A bacilizintermelés vizsgálata során a szén- és nitrogénforrások cseréje során szacharóz,

szorbit, trehalóz, L-treonin, nátrium-nitrát eredményezett kiemelkedőbb gátlást a tesztorganizmussal szemben.

A törzs hemolitikus tulajdonságának bizonyítását követően a szurfaktin termelését bioautográfiás módszerrel is igazoltuk, majd specifikus primerek segítségével azonosítottuk a törzsben jelenlévő, fengicin és szurfaktin bioszintézisért felelős géneket.

A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokat követően a törzs szurfaktintermelését tömegspektrometriás módszerrel is bizonyítottuk. A szurfaktintermelés elemzését követően elmondhatjuk, hogy a *Bac. subtilis* SZMC 6179J törzs fermentlevéből származó extraktumok vizsgálata során 26 szurfaktinvegyület került azonosításra, melyek három már ismert és egy új csoportba [Val2] sorolhatók. A C14-C15 [Sur] és [Val7] adták a vizsgált törzs által termelt 4 fő szurfaktint, míg az újonnan leírt izoforma mennyisége a teljes termelt szurfaktin mennyiségének kevesebb, mint 1%-a volt.

Elvégeztük a *Bac. subtilis* SZMC 6179J és a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 168 típus törzs teljes genomjának összehasonlító elemzését. A genomban található SNP-k száma 106 (35%-os érzékenységnél) ebből 18 intergénikus régióban található. Számos SNP-nek lehet jelentős hatása a baktérium regulációs hálózataira, ezáltal befolyásolva a kompetíciós képességeit vagy az antibiotikumok termelésének intenzitását. A kódoló régiókban detektált SNP-k valószínűleg nem felelősek a törzs típus törzshöz képest tapasztalható kiemelkedőbb antagonista tulajdonságaiért. A legtöbb allélvariációt az *yqcG* génben találtuk, amely egy toxikus ribonukleázt kódol. Ez a gén szerepet játszik a sikeres kompetícióban, a *Bacillus* nemzetség egyéb tagjainak növekedését képes kontaktfüggő gátlás révén elnyomni. Ezen gén terméke egy toxin-antitoxin modul toxikus komponense. Ha a baktériumpopuláció YqcG toxinja magas N-terminális szekvenciavariációt mutat, akkor a baktérium képes lesz több, különböző membránprotein-felzínekkel rendelkező kompetitor baktériumot elnyomni. Feltehetőleg ez az oka annak, hogy az SZMC 6179J törzs *yqcG* génjében ilyen nagy a szekvencia variabilitása.

A törzs genomja nagymértékben eltér a *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* 168 típus törzs genomjától. A fő különbségek az SZMC 6179J törzs génklaszterében lévő nagy deléciók, a 106 SNP és a 23 kis méretű DIP (35%-os érzékenységi szinten). Minden más gén megtalálható és azonos sorrendben található meg az SZMC 6179J törzsben és a referenciatörzsben. Egy egynukleotidos deléció az *sfp* génben feltehetően helyreállította a gén funkcióját az SZMC 6179J törzsben, ezáltal lehetővé vált a fengicinek és szurfaktinok szintézise, ami jobb biokontroll képességgé tette a törzset a típus törzshöz képest. A *Bac. subtilis* SZMC 6179J genom hipermutációs régióinak analízise alapján feltételezhető, hogy a leggyorsabb evolúciós

események a kompetíciós folyamatokban és a sejtfal-lízisben szerepet játszó génekben történnek.

8 SUMMARY

The control of mushroom and plant pathogens is important for the farmers world-wide. The use of chemical pesticides nowadays is very widespread. The efficiency of this protection is indisputable, however, the environmental burden due to the application of chemicals is significant. Therefore there is an emerging need for less destructive, environment-friendly means of control. The application of biocontrol agents may represent a possible alternative. The literature mentions numerous outstanding biological agents, such as *Bacillus subtilis* belonging to the genus *Bacillus*.

The aims of our work were to demonstrate the possible role of strain *Bac. subtilis* SZMC 6179J isolated by our research group in biological control, to reveal the ecophysiological characteristics of this strain and to assess its *in vitro* antagonistic abilities. During the examination of the background of competition we proposed the investigation of extracellular enzymes and antibiotics produced by this biocontrol agent. After the isolation of spontaneous streptomycin-resistant mutants we aimed the investigation of the production of chymotrypsin-like proteases, as well as the determination of changes in the sequences of the *rpsL* genes of the streptomycin-resistant mutants. We aimed to investigate the enzyme and antibiotic production of the isolate depending on various environmental factors, the characterization of the cyclic lipopeptides, in particular the surfactin-type compounds produced by the strain, as well as the comparative genome sequence analysis of *Bac. subtilis* SZMC 6179J and the type strain *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168.

The ecophysiological characterization of the isolated *Bac. subtilis* SZMC 6179J strain revealed that the following parameters proved to be optimal for the cultivation: 40 °C, pH 7 – 7.6 and $a_w = 0.995$. The isolated strain showed the strongest inhibition effect against *Bot. cinerea* SZMC 14526 causing bunch rot and *Bip. bicolor* SZMC 13055, *Cur. spicifera* SZMC 13060, *Phy. infestans* SZMC 6246J as well as 3 *Armillaria* strains (*Arm. gallica* SZMC 24095, *Arm. ostoyae* SZMC 24129, *Arm. mellea* SZMC 24132).

Green mold represents a major concern in the domestic mushroom cultivation. The compost infected with *Trichoderma* significantly reduces the yield causing major crop losses. In the case of 4 *Tri. pleuroti* strains the observed BCI values were above 50% on media containing 0.2% glucose, 0.2% yeast extract and 2% agar. Against investigated *Aspergillus* strains we did not detect above 50% BCI. Similarly, BCI values higher than 30% were found

against the 3 examined *Asp. awamori* (SZMC 2985, SZMC 3213, SZMC 3218), 1 *Asp. flavus* (SZMC 3233) and 2 *Asp. niger* (SZMC 2761, SZMC 2764).

These filamentous fungi producing numerous toxic secondary metabolites are able to cause major agricultural losses, as *Aspergillus* species producing aflatoxins and ochratoxins are widely prevalent.

During the *in vitro* antagonism assays against plant pathogenic bacteria, outstanding inhibition was observed against the *Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16160 strain. Summarizing the results of the *in vitro* antagonism assays against plant pathogenic bacteria, *Cl. michiganensis* SZMC 0016 completely disappeared at the 3 investigated pH-values on the second day. The *Bac. subtilis* SZMC 6179J isolate was not able to suppress *Xan. campestris* pv. *vesicatoria* SZMC 6085 at pH 6 and 8, however, it inhibited this plant pathogen at pH 7. No inhibition was observed against the examined plant- and mushroom pathogenic *Pseudomonas* strains (*Pse. syringae* pv. *panici* SZMC 16149 and *Pse. tolaasii* SZMC 16149). Among the *Rhizobium* and *Allorhizobium* strains involved in this study, only *All. vitis* SZMC 21396 showed sensitivity to *Bac. subtilis* SZMC 6179J.

Strain SZMC 6179J was found to be able to produce siderophores in biological assays, which may provide advantages in competition. The strain has no lipase, caseinase, chitinase or gelatinase activity, however, it is able to degrade starch.

The investigation of the extracellular enzyme production of strain SZMC 6179J was carried out in five different media based on our preliminary experiments, and the Besson-medium proved to be the most suitable. During the investigation of extracellular enzyme production, the secretion of chymotrypsin-like and trypsin-like proteases were found to be remarkable among the protease, β -glucosidase, N-acetyl-glucosaminidase, chitobiosidase, palmitoyl esterase, cellobiohydrolase and lipase enzymes.

Twelve out of 169 spontaneous streptomycin-resistant mutants showed enhanced enzyme production. During the sequence analysis of the *rpsL* gene of spontaneous streptomycin-resistant strains, nucleotide transitions (thymine to adenine, adenine to guanine) were detected in the case of some mutants.

The time-dependence of chymotrypsin-like protease production was also investigated, and no significant increase in the enzyme production could be found after the third day of the cultivation.

The growth and chymotrypsin-like protease production of the isolated *Bac. subtilis* SZMC 6179J strain were investigated in the presence of various carbon and nitrogen sources.

Adonitol, D-xylose, erythritol, galactose, L-arabinose, L-rhamnose and sucrose induced enhanced biomass growth. Significant increase of chymotrypsin-like protease production was observed in the presence of cellobiose, D-xylose, fructose, glycerol, starch, sucrose.

During the investigation of the effects of various nitrogen sources only L-alanine caused increase in the biomass, while in case of L-aspartic acid and L-tyrosine remarkable cell number decrease was observed. Exchange of the original nitrogen source caused significant decrease in the chymotrypsin-like protease production in each case.

The effects of the concentration of glucose and yeast extract and the cultivation time on the growth and protease production were also determined. The optimum cultivation time proved to be 5 days, while the optimal glucose and yeast extract concentrations were 11 and 5.5 g/l, respectively. The highest enzyme activity was observed on the first day on 2 g/l glucose and 5.5 g/l yeast extract.

During the investigation of the effect of glucose, sodium-glutamate and copper-sulfate on the growth and chymotrypsin-like protease production of strain SZMC 6179J, 30 g/l glucose and 10 g/l sodium-glutamate resulted in the highest cell density in the presence of 1 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. This medium composition also favored the chymotrypsin-like protease production.

During the investigation of the effect of glucose, sodium-glutamate and $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, the highest cell density was observed in the case of 15.5 g/l glucose, 10 g/l sodium-glutamate and 40 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Interestingly, the highest protease activity was observed on 30 g/l glucose, 1 g/l sodium-glutamate and 40 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ in the cultivation media.

Subsequently the investigation of the chymotrypsin-like protease production was carried out in the presence of various carbon and nitrogen sources, different metal ions, herbicides and fungicides. During the investigation of the effect of metal ions, manganese sulfate enhanced the growth of *Bac. subtilis* SZMC 6179J significantly, the optical density was tripled in the presence of 0.1 mM manganese. CuSO_4 , FeSO_4 , NiSO_4 and CdSO_4 inhibited the growth of the strain, it showed tolerance only to 0.1 mM concentration values, while the higher concentrations notably inhibited growth.

Increased chymotrypsin-like protease enzyme production was observed in the presence of MnSO_4 , while the enzyme production was significantly decreased in the presence of 1, 0.5 and 0.1 mM CuSO_4 . 1 mM FeSO_4 decreased the enzyme production significantly, 0.5 mM FeSO_4 caused no significant changes, while in the presence of 0.1 mM FeSO_4 the enzyme production increased. NiSO_4 inhibited the chymotrypsin-like protease production at all three

examined concentrations. CdSO₄ showed strong inhibitory effect in the entire concentration range. The growth of the isolate has remarkable tolerance to CuSO₄ and CdSO₄, however, the protease secretion was completely inhibited by these metal salts even at low concentrations.

During the investigation of the effect of metal ions on enzyme activity, 1 and 0.5 mM MnSO₄, FeSO₄, CuSO₄ and CdSO₄ were found to be inhibitory, while at a 0.1 mM concentration these salts showed no significant changes in the enzyme activity. NiSO₄ inhibited the enzyme activity at all three examined concentrations.

During the study of the effect of herbicides and fungicides on growth of strain SZMC 6179J, significant decrease was observed in the cell number in presence of 25 µM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, chlortoluron; 6.25 µM linuron, 3.125 µM carbendazim and 12.5 µM mancozeb at the 9. day of the experiment.

The 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, carbendazim and mancozeb proved to be inhibitory at 12.5 µM on the chymotrypsin-like protease production on the 6. day of the investigation. Chlortoluron and linuron inhibited the enzyme production at 6.25 and 3.125 µM concentrations. In the case of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, carbendazim and mancozeb, the 3.125 µM concentration resulted in no significant changes of the enzyme production. After the 9. day of the experiment the pesticides had a negative effect on the enzyme production of strain SZMC 6179J.

25 µM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and chlortoluron, as well as 25, 12.5 and 6.25 µM linuron and mancozeb and all four concentrations of carbendazim resulted in significant decrease of the enzyme activity.

The production of fengycin and bacilizin effective against filamentous fungi was investigated using a bioassay with heat-treated ferment broth and purified antibiotics in the presence of different carbon and nitrogen sources. Both antibiotics were detected at the second day of cultivation. During the investigation of the effect of carbon and nitrogen sources on fengycin production cellobiose, galactose, glycerol, starch, mannitol, L-alanine, L-ornithine and L-proline induced higher inhibition and the purified antibiotic was more effective than the inactivated ferment broth. In case of bacilizin production the change in carbon and nitrogen sources sucrose, sorbitol, trehalose, L-threonine and sodium nitrate resulted in remarkable inhibition of the test organism.

After confirmation of the haemolytic activity of strain SZMC 6179J we demonstrated the surfactin production using bioautographic assay. In PCR experiments using specific primers we identified the genes responsible for fengycin and surfactin biosynthesis.

During the mass spectrometric examination of the ferment broth extracts of *Bac. subtilis* SZMC 6179J 26 surfactin isoforms were identified and assigned into 3 known groups and a new one, namely [Val2]. The C14–C15 [Sur] and [Val7] were the four major surfactins produced by the examined strain, while the relative amount of each newly described isoform was below 1% of the total surfactin amount.

The comparative genome sequence analysis of *Bac. subtilis* SZMC 6179J and the type strain *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 was also carried out. 106 SNP were found in the genome of strain SZMC 6179J, 18 out of them in intergenic regions. Numerous SNPs might have major effects on the regulation networks of the bacteria affecting the competition abilities or the intensity of the antibiotic production. The SNPs found in the coding regions of genes may have no connection with the remarkable antagonistic properties of our strain. The most allelic variations were found in the *yqcG* gene encoding a toxic ribonuclease. This gene plays a role in the successful competition, it can suppress the growth of other members of the genus *Bacillus* via contact-dependent inhibition. The product of this gene is a toxic member of a toxin-antitoxin module. If the YqcG toxin of the bacterial cell population shows high N-terminal sequence variations, the bacteria will be able to suppress multiple competitor bacteria with different membrane protein surfaces. This might be the reason of the high sequence variability in the *yqcG* gene of strain SZMC 6179J.

The genome of strain SZMC 6179J highly differs from the genome of *Bac. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168. Major differences are the large deletions in gene cluster of strain SZMC 6179J, 106 SNPs and 23 small DIPs. The other genes are present in the same order in our strain as in the reference strain. A single nucleotide deletion in the *sfp* gene might have reverted its function in *Bac. subtilis* SZMC 6179J enabling the synthesis of fengycins and surfactins, which resulted in better biocontrol properties than those of the reference strain. Regions of hypermutation detected in the genome of *Bac. subtilis* strain SZMC 6179J suggest that the fastest evolutionary events happen in genes important for competition processes and cell wall lysis.

9 IRODALOMJEGYZÉK

- Abbo AS, Idris MO, Hammad AM (2014) The Antifungal effects of four tomato rhizosphere *Bacillus* spp. against *Alternaria alternata*. Int J Sci Res 3:1324-1328.
- Agrios GN (1988) Plant Pathology. 3rd Edn., Academic Press, USA., pp:220-222.
- Agrios GN (2005) Plant Pathology. St. Louis, MO: Academic Press.
- Akpa E, Jacques P, Wathelet B et al. (2001) Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. Appl Biochem Biotechnol 91-93:551-561.
- Alexander NJ, McCormick SP, Waalwijk C et al. (2011) The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. Fungal Genet Biol 48:485-495.
- Altschul SF, Gish W, Miller W et al. (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaeffer AA et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402.
- Annis SL, Goodwin PH (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes in plant pathogenic fungi. Eur J Plant Pathol 103:1-14.
- Arima K, Kakinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem Biophys Res Commun 31:488.
- Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl Environ Microbiol 62:4081-4085.
- Ashwini N, Srividya S (2013) Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1.3. Biotechnology 4:127-136.
- Auchtung JM, Aleksanyan N, Bulku A et al. (2016) Biology of ICEBs1, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. Plasmid 86: 14–25.
- Auchtung, JM, Lee CA, Monson RE et al. (2005) Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc Natl Acad Sci USA 102:12554–12559.
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ et al. (2000) Gene Genealogies and AFLP Analyses in the *Fusarium oxysporum* Complex Identify Monophyletic and Nonmonophyletic *Formae Speciales* Causing Wilt and Rot Disease. Phytopathology 90:891-900.
- Babasaki K, Takao T, Shimonishi Y, Kurahashi K (1985) Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: Isolation, structural analysis, and biogenesis. J Biochem 98:585-603.
- Bacon CW, Bennett RM, Hinton DM et al. (1992) Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. Plant Dis 76:144-148.
- Bacon CW, Yates IE, Hinton DM et al. (2001) Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. Environ Health Perspect 109:325-332.
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134:307-319.

- Barrett MS, Wenzel RP, Jones RN (1992) *In vitro* activity of mersacidin (M87-1551), an investigational peptide antibiotic tested against gram-positive bloodstream isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 15:641-644.
- Bauer R, Dicks LM (2005) Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int J Food Microbiol* 101:201-216.
- Baumgartner K, Coetzee MPA, Hoffmeister D (2011) Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology* 12:515-534.
- Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S (1999). *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91:964-977.
- Bessette AE, Kerrigan RW, Jordan DC (1985) Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 50:1535-1537.
- Besson F, Chevanet C, Michel G (1987) Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 133:767-772.
- Besson F, Michel G (1986) Isolation and characterization of new iturin D and iturin E. *J Antibiot* 40:437-442.
- Besson F, Peypoux F, Michel G, Delcambre L (1976) Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *J Antibiot* 29:1043-1049.
- Biemann K (1990) Sequencing of peptides by tandem massspectrometry and high-energy collision-induced dissociation. *Methods Enzymol* 193:455-479.
- Blin K, Medema MH, Kazempour D et al. (2013) antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res* 41:204-12.
- Bóka B, Manczinger L, Kecskeméti A et al. (2016) Ion trap mass spectrometry of surfactins produced by *Bacillus subtilis* SZMC 6179J reveals novel fragmentation features of cyclic lipopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 30:1581-1590.
- Boland GJ, Hall R (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can J Plant Pathol* 16:93-108.
- Bolton MD, Thomma BP, Nelson BD (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol* 7:1-16.
- Bonmatin JM, Labbé H, Grangemard I et al. (1995) Production, isolation and characterization of [Leu4]- and [Ile4] surfactins from *Bacillus subtilis*. *Lett Pept Sci* 2:41-47.
- Bonmatin JM, Laprevote O, Peypoux F (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactiveagents. *Comb Chem High Throughput Screen* .6:541-556
- Borisova SA, Circello BT, Zhang JK et al. (2010) Biosynthesis of rhizotocins, antifungal phosphonate oligopeptides produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Chem Biol* 17:28-37.
- Brito N, Espino JJ, Gonzalez C (2006) The endo- β -1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:25-32.
- Brown CT, Fishwick LK, Chokshi BM et al. (2011) Whole-genome sequencing and phenotypic analysis of *Bacillus subtilis* mutants following evolution under conditions of relaxed selection for sporulation. *Appl Environ Microbiol* 77:6867-6877.
- Budzikiewicz H, Bössenkamp A, Taraz K et al. (1997) Corynebactin, a cyclic catecholate siderophore from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 (*Brevibacterium* sp. DSM 20411). *Z Naturforsch [c]*52:551-554.

- Butcher RA, Schroeder FC, Fischbach MA et al. (2007) The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci 104:1506-1509.
- Cao XH, Liao ZY, Wang CL et al. (2009) Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* Tk-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. Braz J Microbiol 40:373-379.
- Cao XH, Wang AH, Wang CL et al. (2010) Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. Chem Biol Interact 183:357-362.
- Carrillo C, Teruel JA, Aranda FJ et al. (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. Biochim Biophys Acta 1611:91-97.
- Carver T, Thomson N, Bleasby A et al. (2009) DNA Plotter: circular and linear interactive genome visualization. Bioinformatics 25:119-120.
- Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena M (2011) *Bacillus* based biological control of plant diseases. In: Stoytcheva M eds. Pesticides in the modern world—pesticides use and management. InTech, Rijeka, pp 273-302.
- Chen XH, Scholz R, Borriss M et al. (2009) Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. J Biotechnol 140:38-44.
- Chester FD (1891) Notes on three new or noteworthy diseases of plants. Bull Torrey Bot Club 18:371-374.
- Cho SJ, Lee SK, Cha BJ et al. (2003) Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiol Lett 223:47-51.
- Coates L, Johnson G (1997) Postharvest diseases of fruit and vegetables. Brown JF, Ogle HJ eds. Plant pathogens and plant diseases, Rockvale Publications Armidale, Australia pp. 533-548.
- Colmenares AJ, Aleu J, Durán-Patrón R et al. (2002) The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. J Chem Ecol 28:997-1005.
- Cook RJ (1993) Making greater use of microbial inoculants in agriculture. Annu Rev Phytopathol 31:53-80.
- Cooper DG, MacDonald CR, Duff JB et al. (1981) Enhanced production of surfactant from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. Appl Environ Microbiol 42:408-412.
- Coutte F, Leclère V, Béchet M et al. (2010) Effect of pps disruption and constitutive expression of *urfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. J Appl Microbiol 109:480-491.
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA et al. (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol 13:414-430.
- Deleu M, Paquot M, Nylander T (2005) Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface - implications for the effect of fengycin on biological membranes. J Colloid Interface Sci 283:358-365.
- Deng Y, Zhu Y, Wang P, Zhu L et al. (2011) Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J Bacteriol 193:2070-2071.
- Dubois JY, Kouwen TR, Schurich AK et al. (2009) Immunity to the bacteriocin sublancin 168 is determined by the SunI(YolF) protein of *Bacillus subtilis*. Antimicrob Agents Chemother 53:651-661.
- Dufour S, Deleu M, Nott K et al. (2005) Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. Biochim Biophys Acta 1726:87-95.

- Earl AM, Eppinger M, Fricke WF et al. (2012) Whole-genome sequences of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol* 194:2378-2379.
- Ellis MB (1971) Dematiaceous *Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute Kew UK.
- Etchegaray A, Bueno CD, de Melo IS et al. (2008) Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Arch Microbiol* 190:611-622.
- EU-OSHA-European Agency for Safety and Health at Work, Exploratory Survey of Occupational Exposure Limits for Carcinogens, Mutagens and Reprotoxic substances at EU Member States level, Sept. 2009.
- Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W et al. (1999) Effects of phenylurea herbicides on soil microflora communities estimated by analysis of the 16S rRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. *Appl Environ Microbiol* 65:982-988.
- Farr DF, Rossman AZ (2013) Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory. ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Fassi Fehri L, Wroblewski H, Blanchard A (2007) Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:468-474.
- Fdhila F, Vázquez V, Sánchez JL et al. (2003) DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J Nat Prod* 66:1299-1301.
- Fernandes PAV, de Arruda IR, dos Santos AFAB et al. (2007) Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 38:704-709.
- Ferreira CMH, Vilas-Boas Â, Sousa CA et al. (2019) Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express* 9:78.
- Floch C, Chevremont AC, Joanico K et al. (2011) Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® ecoplates. *Eur J Soil Biol* 47:256-263.
- Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 43:337-359.
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J et al. (2003) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J Biotechnol* 106:179-191.
- Georgy M, Lesot P, Campagne JM (2007) Synthetic studies on macrolactin A construction of C4-C24 fragment. *J Org Chem* 72:3543-3549.
- Germeier C, Hedke K, Von Tiedemann A (1994) The use of pH-indicators in diagnostic media for acid-producing plant pathogens. *J Plant Dis Prot* 101:498-507.
- Gond SK, Bergen MS, Torres MS et al. (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiol Res* 172:79-87.
- González García V, Portal Onco MA, Rubio Susan V (2006) Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Span J Agric Res* 4:55-79.
- González-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301:510-513.
- Grangemard I, Peypoux F, Labbe H et al. (1997) Lipopeptides with improved properties: Structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins. *J Pept Sci* 3:145-154.

- Grossman TH, Tuckman M, Ellestad S et al. (1993) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* genes involved in siderophore biosynthesis: relationship between *B. subtilis* *sfpo* and *Escherichia coli* *entD* genes J Bacteriol 175:6203-6211.
- Guo Q, Li S, Lu X, Zhang X, Wang P, Ma P (2014) Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BAB-1, a biocontrol agent for suppression of tomato gray mold. Genome Announc 2(4):e00744-14. 10.1128/genomeA.00744-14
- Guo S, Mao Z, Wu Y et al. (2013) Genome sequencing of *Bacillus subtilis* strain XF-1 with high efficiency in the suppression of *Plasmodiophora brassicae*. Genome Announc 1:e0006613.
- Gupta UC, Kening WU, Liang S (2008) Micronutrients in soils, crops, and livestock. Earth Sci Front 15:110-125
- Gustafson K, Roman M, Fenical W (1989) Themacrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. J Am Chem Soc 111:7519-7524.
- Hagelin G, Indrevoll B, Thomas HJ (2007) Use of synthetic analogues in confirmation of structure of the peptide antibiotics maltacines. Int J Mass Spectrom 268:254-264.
- Hagelin G, Oulie I, Raknes A et al. (2004) Preparative high performance liquid chromatographic separation and analysis of the maltacine complex — a family of cyclic peptide antibiotics from *Bacillus subtilis*. J Chromatogr B 811:243-251.
- Hang NTT, Oh SO, Kim GH et al. (2005) *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. Plant Pathol J 21:59-63.
- Harwood CR (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: Molecular biological and industrial workhorses. Trends Biotechnol 10:247-256.
- Hashimoto M, Taguchi T, Nishida S et al. (2007) Isolation of 8-phosphate ester derivatives of amicoumacins: Structure-activity relationship of hydroxy amino acid moiety. J Antibiot 60:752-756.
- Hatvani L, Sabolić P, Kosćubé S et al. (2012) The first report on mushroom green mould in Croatia. Arh Hig Rada Toksikol 63:481-487.
- Have T, Mulder A, Visser W et al. (1998) The endopolygalacturonase gene *BcpgI* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. Mol Plant-Microbe Interact 11:1009-1016.
- Hawthorne BT, Rees-George J, Boradhurst PG (1992). Mating behavior and pathogenicity of New Zealand isolates of *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*). N Z J Crop Hortic Sci 20:51-57.
- Heydari A (2007) Biological control of turfgrass fungal diseases. In: Turfgrass Management and Physiology, Pessaraki M. (Ed.). CRC Press, Florida, USA.
- Heydari A, Misagji IJ, Balestra GM (2007) Pre-emergence herbicides influence the efficacy of fungicides in controlling cotton seedling damping-off in the field. Int J Agric Res 2:1049-1053.
- Holberger LE, Garza-Sánchez F, Lamoureux J et al. (2012) A novel family of toxin/antitoxin proteins in *Bacillus* species. FEBS Lett 586:132-136.
- Horsfield A, Wicks T, Davies K et al. (2010) Effect of fungicides use strategies on the control of early blight (*Alternaria solani*) and potato yield. Australas Plant Pathol 39:368-375.
- Hosoya Y, Okamoto S, Muramatsu H et al. (1998) Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. Antimicrob Agents Chemother 42:2041-2047.
- Hourdou ML, Besson F, Tenoux I et al. (1989) Fatty acid and β -amino acid synthesis in strains of *Bacillus subtilis* producing iturinic antibiotics. Lipides 24:940-944.

- Hu QP, Xu JG (2011) A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *Afr J Microbiol Res* 5:4321-4327
- Hue N, Serani L, Lapr evote O (2001) Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15:203-209.
- Hwang EE, Wang MB, Bravo JE et al. (2015) Unmasking host and microbial strategies in the *Agrobacterium*-plant defense tango. *Front Plant Sci* 6:200.
- Hwang MH, Lim JH, Yun HI et al. (2005) Surfactin C inhibits the lipopolysaccharide-induced transcription of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in murine RAW 264.7 cells. *Biotechnol Lett* 27:1605-1608.
- Hwang YH, Park BK, Lim JH et al. (2007) Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock. *Eur J Pharmacol* 556:166-171.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Arsenic, metals, fibres, and dusts. Volume 100C. WHO, Lyon, France 2012.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: IARC Monographs evaluate pentachlorophenol and some related compounds. Volume 117. WHO, Lyon, France 2016.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: DDT, Lindane, and 2,4-D. Volume 113. WHO Lyon, France 2017.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some Carbamates, Thiocarbamates and Carbazides. Volume 12. WHO, Lyon, France 1976.
- Inaoka T, Ochi K (2007) Glucose uptake pathway-specific regulation of synthesis of neotrehalosadiamine, a novel autoinducer produced in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 189:65-75.
- Inaoka T, Takahashi K, Yada H et al. (2004) RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosadiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 279:3885-3892.
- Itoh J, Omoto S, Shomura T (1980) Amicoumacin: A new antibiotic with strong antiinflammatory and antiulcer activity. *J Antibiot* 34:611-613.
- Jaruchoktaweetchai C, Suwanborirux K, Tanasupawatt S et al. (2000) New macrolactin from a marine *Bacillus* sp. Sc026. *J Nat Prod* 63:964-966.
- Johnvesly B, Naik GR (2001) Studies on production of novel thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB99 in a chemically defined medium. *Process Biochem* 37:139-144.
- Julkowska D, Obuchowski M, Holland IB et al. (2005) Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J Bacteriol* 187:398-412.
- Jung WJ, Mabood F, Souleimanov A et al. (2014) Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 *in vitro*. *Microb Pathog* 77:13-16.
- Kamada M, Hase S, Fujii K, Miyake M et al. (2015) Whole-genome sequencing and comparative genome analysis of *Bacillus subtilis* strains isolated from non-salted fermented soybean foods. *PLoS One* 10:e0141369.
- Kameda Y, Ouhira S, Matsui K et al. (1974) Antitumor activity of *Bacillus natto*. 5. Isolation and characterization of surfactin in culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem Pharm Bull* 4:938-944.

- Kanzaki H, Imura H, Nitoda T et al. (2000) Enzymatic conversion of cyclic dipeptide to dehydro derivatives that inhibit cell division. *J Biosci Bioeng* 90:86-89.
- Kars I, Krooshof G, Wagemakers CAM et al. (2005) Necrotising activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J* 43:213-225.
- Keckskeméti A, Bartal A, Bóka B et al. (2018) High-frequency occurrence of surfactin monomethyl isoforms in the ferment broth of a *Bacillus subtilis* strain revealed by ion trap mass spectrometry. *Molecules* 23:2224.
- Keinath AP (2011) From native plants in Central Europe to cultivated crops worldwide: The emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. *Hort Science* 46:532-535.
- Keinath AP (2013) Diagnostic guide for gummy stem blight and black rot on cucurbits. *Online Plant Health Progr* 101:1895-1902.
- Kenig M, Abraham E (1976) Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin. *J Gen Microbiol* 94:37-45.
- Kenig M, Vandamme E, Abraham EP (1976) The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants. *J Gen Microbiol* 94:46-54.
- Kennelly MM, Cazorla FM, de Vicente A et al. (2007) *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees. Progress towards understanding and control. *Plant Dis* 91:4-16.
- Kevei F és Kucsera J (1998) *Mikrobiológia I*. Szeged: Jate Press 150-154.
- Kim PI, Ryu J, Kim YH, Chi Y et al. (2010) Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotech* 20:138-145.
- Kim SY, Kim JY, Kim SH et al. (2007) Surfactin from *Bacillus subtilis* displays antiproliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Letters* 581:865-871.
- Kimura N, Hirano S (1988) Inhibitory strain of *Bacillus subtilis* for growth and aflatoxin-production of aflatoxicogenic fungi. *Agric Biol Chem* 52:1173-1179.
- Kino K, Kotanaka Y, Arai T et al. (2009) A novel L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis* NBRC3134, a microorganism producing peptide-antibiotic rhizocticin. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:901-907.
- Kinsinger RF, Shirk MC, Fall R (2003) Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J Bacteriol* 185:5627-5631.
- Klich MA, Arthur KS, Lax AR et al. (1994) Iturin A: A potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia* 127:123-127.
- Koehler B (1942) Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. *J Agric Res* 64:421-442.
- Kommedahl T, Windels CE (1981) Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. in: *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ eds. The Pennsylvania State University Press, University Park. pp 94-103.
- Kommedahl T, Windels C E, Stucker RE (1979) Occurrence of *Fusarium* species in roots and stalks of symptomless corn plants during the growing season. *Phytopathology* 69:961-966.
- Korsten L, Cook N (1996) "Optimizing Culturing Conditions for *Bacillus subtilis*." *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 1996 (n.d.): 54-58.

- Kredics L, Körmöczy P, Cseh T et al. (2009) Green mould disease of oyster mushroom in Hungary and Romania: ecophysiology of the causative agents. In: Kiss I. (eds.), Proceedings of the 10th International Symposium "Interdisciplinary regional research", Hunedoara, Romania, CD-ROM, paper 2009; S3-10, 1-6.
- Krogh S, Jørgensen ST, Devine KM (1998) Lysis genes of the *Bacillus subtilis* defective prophage PBSX. *J Bacteriol* 180:2110-2117.
- Krohn K, Bahramsari R, Flörke U et al. (1997) Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry* 45:313-320.
- Kugler M, Loeffler W, Rapp C et al. (1990) Rhizoctin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Arch Microbiol* 153:276-281.
- Kumar AS, Saini S, Wray V et al. (2012) Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A(5) F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Basic Microbiol* 52:670-678.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390,249-256.
- Kuroda A, Imazeki M, Sekiguchi J (1991) Purification and characterization of a cell wall hydrolase encoded by the *cwlA* gene of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 65:9-13.
- Kurosawa K, Hosaka T, Tamehiro N et al. (2006) Improvement of α amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 168:71-77.
- Kurup VP, Shen HD, Banerjee B (2000) Respiratory fungal allergy. *Microbes Infect* 2:1101-1110.
- Lau K, Sheridan JE (1975) Mycoflora of rice (*Oryza sativa* L.) seed in New Zealand. *New Zeal J Agr Res* 18:237-250.
- Lee HI, Jeong KS, Cha JS (2002) PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Lett Appl Microbiol* 35:276-280.
- Leslie JF, Pearson CAS, Nelson PE et al. (1990) *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80:343-350.
- Li D, Chung KR, Smith DA et al. (1995) The *Fusarium solani* gene encoding kievitone hydratase, a secreted enzyme that catalyzes detoxification of a bean phytoalexin. *Mol Plant Microbe Interact* 8:388-397.
- Li Y, Xu Y, Liu L et al. (2012) Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. *Mar Drugs* 10:319-328.
- Liang TW, Hsieh JL, Wang SL (2012) Production and purification of protease, a chitosanase, and chitin oligosaccharides by *Bacillus cereus* TKU022 fermentation. *Carbohydr Res* 362:38-46.
- Lin TP, Chen CH, Fu CH et al. (2005) Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochim Biophys Acta* 1730:159-164.
- Liu XY, Yang SZ, Mu BZ (2009) Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Proc Biochem* 44: 1144.
- Löytynoja A (2014) Phylogeny-aware alignment with PRANK. *Meth Mol Biol* 1079:155-170.
- Luo C, Liu X, Zhou H et al. (2015) Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Appl Environ Microbiol* 81:422-431.
- Ma W, Tang C, Lai L (2005) Specificity of trypsin and chymotrypsin: loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant *Biophysical Journal* 89:1183-1193.

- Magan N, Aldred D, Mylona K et al. (2010) Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Addit Contam A* 27:644-650.
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC et al. (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56:131-144.
- Manczinger L, Bóka B, Vörös M et al. (2011) Influence of culture conditions on the antibiotic production of antagonistic *Bacillus* strains isolated from tomato rhizosphere. *Agrár- és Vidékfejlesztési Szemle* 6:S408-S412.
- Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* 97:2651-2674.
- Martins MB, Carvalho L (2007) Diketopiperazines: Biological activity and synthesis. *Tetrahedron* 63:9923-9932.
- May JJ, Wendrich TM, Marahiel MA (2001) The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-treonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* 276:7209-7217.
- Medema MH, Blin K, Cimermanic P et al. (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39:339-46.
- Mena-Portales J, Heredia G, Mercado-Sierra A (1995) Especies de *Bipolaris* y *Curvularia* halladas sobre hojas de *Quercus* y Liquidambar en el estado de Veracruz. *Rev Mex Micol* 11:109-121.
- Miyagawa H, Nagai S, Tsurushima T et al. (1994) Phytotoxins produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris bicolor* El-1. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1143-1145.
- Mohiddin A, Khan MR (2013) Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. *Afr J Agric Res* 8:5331-5334.
- Mousavi SR, Shahsavari M, Rezaei M (2011) A general overview on manganese (Mn) importance for crops production. *Aust J Basic and Appl Sci* 5:1799-1803.
- Morais S, Dias E, Pereira ML (2012) Carbamates: human exposure and health effects. M. Jokanovic (ed.), *The Impact of Pesticides*, WY Academy Press, Cheyenne, pp. 21-38.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE et al. (2001) Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol* 90:622-629.
- Mukherj S, Das P, Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 24:509-515.
- Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* 133:183-198.
- Munch S, Lingner U, Floss DS et al. (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum*. *J Plant Physiol* 165:41-51.
- Nagy A, Manczinger L, Tombácz D et al. (2012) Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin Vol. 78:289-293*.
- Naidu KSB, Devi KL (2005) Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *Afr J Biotechnol* 4:724-726.
- Nakagawa Y, Nakazawa T, Shoji J (1975) On the structure of a new TL-119 antibiotic. *J Antibiot* 28:1004-1005.

- Nakajima H, Hamasaki T, Kimura Y (1989) Structure of spiciferone A, a novel γ -pyrone plant growth inhibitor produced by the fungus *Cochliobolus spicifer* Nelson. *Agric Biol Chem* 53:2297-2299.
- Nakajima H, Hamasaki T, Kohno MA et al. (1991) Spiciferones B and C, minor phytotoxins from the fungus *Cochliobolus spicifer*. *Phytochemistry* 30:2563-2565.
- Nakano M, Hulett M (1997). Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *Microbiol Lett* 157:1-7.
- Nakano MM, Marahiel MA, Zuber P (1988) Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 170:5662-5668.
- Nascimento WCA, Martins MLL (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 35:91-96.
- Nelson PE (1992) Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29-36.
- Nelson SC (2008). Late blight of tomato (*Phytophthora infestans*). *Plant Disease*, PD-45:1-10.
- Nene YL, Thapliyal PN (1982) *Fungicide in Plant Diseases Control*. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, 325.
- Nesci A, Bluma R, Etcheverry M (2005) *In vitro* selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. *Eur J Plant Pathol* 113:159-171.
- Nicholson B, Lloyd GK, Miller BR et al. (2006) NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: *in-vitro* evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. *Anticancer Drugs* 17:25-31.
- Nishanth KS, Mohandas C, Siji JV, Rajasekharan KN et al. (2012) Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi. *J Appl Microbiol* 113:914-924.
- Niu WW, Neu HC (1991) Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 35:998-1000.
- Nucci M, Anaissie E (2007) *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 20:695-704.
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK et al. (2000a) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7905-7910.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T et al. (2000b) A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG et al. (2004) Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J Clin Microbiol* 42:5109-5120.
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A et al. (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol* 46:2477-2490.
- Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16:115-125.

- Paik SH (1998) Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, Sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem* 273:23134-23142.
- Pal KK, McSpadden Gardener B (2006) Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instr* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pandin C, Védie R, Rousseau T et al. (2016) Bioprotection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by *Bacillus subtilis* biofilms. *Journée doctorale DIM ASTREA 2016, Paris, France.*
- Pant G, Prakash A, Pavani JVP et al. (2015) Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *J Taibah Univ Sci* 9:50-55.
- Parker JB, Walsh CT (2012) Stereochemical outcome at four stereogenic centers during conversion of prephenate to tetrahydrotyrosine by BacABGF in the bacilysin pathway. *Biochemistry* 51:5622-5632.
- Patil S, Bheemaraddi MC, Shivannavar CT et al. (2014) Biocontrol activity of siderophore producing *Bacillus subtilis* CTS-G24 against wilt and dry root rot causing fungi in chickpea. *Journal of Agriculture and Veterinary Science* 7:63-68.
- Patrick JE, Kearns DB (2009) Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *J Bacteriol* 191:7129-7133.
- Paul AR, Parbery DG (1966) The perfect state of *Helminthosporium bicolor*. *Transactions of the British Mycological Society*. 49:385-386.
- Pecci Y, Rivardo F, Martinotti MG et al. (2010) LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *J Mass Spectrom* 45:772-778.
- Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:553-563.
- Phae CG, Shoda M, Kubota H (1990) Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J Ferment Bioeng* 69:1-7.
- Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B et al. (2001) *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3156-3161.
- Porrini MP, Audisio MC, Sabaté DC et al. (2010) Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. *Parasitol Res* 107:381-388.
- Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev* 41:711-753.
- Pybus C, Pedraza-Reyes M, Ross CA et al. (2010) Transcription-associated mutation in *Bacillus subtilis* cells under stress. *J Bacteriol* 192:3321-3328.
- Quadri LE, Weinreb PH, Lei M et al. (1998) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* 37:1585-1595.
- Rainey PB, Brodey CL, Johnstone K (1992) Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. *Adv Plant Pathol* 8:95-117.
- Rapp C, Jung G, Kugler M et al. (1988) Rhizocitins-New phosphonooligopeptides with antifungal activity. *Eur J Org Chem* 7:655-661.
- Reddy KRN, Reddy CS, Muralidharan K (2009) Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Cont* 20:173-178.

- Reva ON, Dixelius C, Meijer J et al. (2004) Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Ecol 48:249-259.
- Reuss DR, Thürmer A, Daniel R et al. (2016) Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain Δ6 Genome Announc 4:e00759-e816.
- Rhee KH (2004) Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. Int J Antimicrob Agents 24:423-427.
- Richardson MJ (1990) An annotated list of seed-borne diseases (4th edn) International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.
- Rivardo F, Turner RJ, Allegrone G et al. (2009) Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. Appl Microbiol Biotechnol 83:541-553.
- Robledo EA, Martin HA, Pedraza-Reyes M (2012) Mfd and transcriptional derepression cause genetic diversity in *Bacillus subtilis*. Front Biosci (Elite Ed) 4:1246-1254.
- Roepstorff P, Fohlman J (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom 11:601-602.
- Rolke Y, Liu S, Quidde T et al. (2004) Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. Mol Plant Pathol 5:17-27.
- Romero-Tabarez MR, Jansen R, Sylla M et al. (2006) 7-O-malonylmacrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. Antimicrob Agents Chemother 50:1701-1709.
- Rusjan D (2012) Copper in horticulture. In: Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A. (Eds.), Fungicides for plant and animal diseases. InTech, pp: 257-278.
- Salunkhe VP, Sawant IS, Banerjee K et al. (2014) Kinetics of degradation of carbendazim by *B. subtilis* strains: possibility of *in situ* detoxification. Environ Monitor Assess 186:8599-8610.
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W et al. (2002) *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94:146-170.
- San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementería A et al. (2013) Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. BMC Research Notes 6:513.
- Scherm B, Balmas V, Spanu F et al. (2013) *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. Mol Plant Pathol 14:323-341.
- Schneider K, Chen XH, Vater J et al. (2007) Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. J Nat Prod 70:1417-1423.
- Selvam R, Maheswari P, Kavitha P et al. (2009) Effect of *Bacillus subtilis* PB6, a natural probiotic on colon mucosal inflammation and plasma cytokines levels in inflammatory bowel disease. Indian J Biochem Biophys 46:79-85.
- Sevinc N, Demirkan E (2011) Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. J Biol Environ Sci 5:95-103.
- Seydlová G, Čabala R, Svobodová J (2011) Surfactin - Novel Solutions for Global Issues. Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies, Dr. Sylwia Olszynska (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/13015.

- Shafee N, Aris SN, Rahman RNZA et al. (2005) Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. *J Sci Res* 1:1-8.
- Shao C, Liu L, Gang H et al. (2015) Structural diversity of the microbial surfactin derivatives from elective esterification approach. *Int J Mol Sci* 16:1855.
- Shelburne CE, An FY, Dholpe V et al. (2007) The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. *J Antimicrob Chemother* 59:297-300.
- Shoemaker RA (1959) Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from 'Helminosporium'. *Canad J Bot* 37(5):879-887.
- Sholi J, Hinoo H, Wakisaka Y et al. (1974) Isolation of a new peptide antibiotic TL-119. *J Antibiot* 28:126-128.
- Silvestro D, Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML.Org. *Divers Evol* 12, 335-337.
- Singla RK, Dubey HD, Dubey AK (2014) Therapeutic spectrum of bacterial metabolites. *Indo GlobalJP harm Sci* 2:52-64.
- Sitterly WR, Keinath AP (1996) Gummy stem blight. in: *Compendium of Cucurbit Diseases*. Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN pp. 27-28.
- Sivanesan A (1985) New species of *Bipolaris*. *Trans Br Mycol Soc* 84:403-421.
- Sivanesan A (1987) *Graminicolous* species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycol Pap* 158:1-261.
- Snel JHF, Vos JH, Gylstra R et al. (1998) Inhibition of photosystem II (PSII) electron transport as a convenient endpoint to assess stress of the herbicide linuron on freshwater plants. *Aquat Ecol* 32:113-123.
- Solanki MK, Robert AS, Singh RK et al. (2012) Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *R. solani* in tomato. *Curr Microbiol* 65:330-336.
- Soler-Rivas C, Arpin N, Olivier JM et al. (1999) The effects of tolaasin, the toxin produced by *Pseudomonas tolaasii* on tyrosinase activities and the induction of browning in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:21-28.
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.
- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56:845-857.
- Stein T, Borchert S, Conrad B et al. (2002) Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. *J. Bacteriol* 184:1703-1711.
- Steller S, Vollenbroich D, Leenders F et al. (1999) Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A173. *Chem Biol* 6:31-41.
- Sun X, Misty CN, John WM (2002) Bacterial spot of tomato and pepper. Plant pathology circular No. 129 (Revised) Fl. Dept. Agriculture & Cons. Svcs. Division Plant Industry pp. 1-4.
- Szekeres A, Bóka B, Bencsik O et al. (2013) Identification of surfactin homologues from a *Bacillus subtilis* strain using ion-trap mass spectrometry. *Acta Microbiol Immunol Hung* 60(S):88.
- Tajalipour S, Hassanzadeh N, Khabbaz Jolfaee H et al. (2014) Biological control of mushroom brown blotch disease using antagonistic bacteria. *Biocontrol Sci Tech* 24:473-484.
- Tatagiba JDS, Maffia LA, Barreto RW et al. (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26:8-19.

- Thakore Y (2006) The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol* 2:194-208.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F et al. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876-4882.
- Tojo S, Kim JY, Tanaka Y et al. (2014) The *mthA* mutation conferring low-level resistance to streptomycin enhances antibiotic production in *Bacillus subtilis* by increasing the S-adenosylmethionine pool size. *J Bacteriol* 196:1514-1524.
- Touré Y, Ongena M, Jacques P et al. (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol* 96:1151-1160.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. (2011) SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27:171-180.
- Vágvölgyi C, Sajben-Nagy E, Bóka B et al. (2013) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus* strains capable to degrade ethylenethiourea. *Curr Microbiol* 66:243-250.
- van der Merwe E, Huang D, Peterson D et al. (2008) The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines. *Peptides* 29:1305-1311.
- van Dijl JM, Hecker M. (2013) *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact* 12:3.
- van Etten HD (1978) Identification of additional habitats of *Nectria haematococca* mating population VI. *Phytopathology* 68:1552-1556.
- Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U et al. (1986) Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiot (Tokyo)* 39:888-901.
- Varga J, Kocsubé S, Szigeti G et al. (2012) Black Aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Aliment* 41(4):414-423.
- Varga J, Téren J, Tóth B et al. (2009) Gombák másodlagos anyagcseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek. JATEPress, 2009.
- Védie R, Rousseau T (2008) Serenade biofungicide: une innovation majeure dans les champignonnières françaises pour lutter contre *Trichoderma aggressivum*, agent de la moisissure verte du compost. *La Lettre du CTC*, 21:1-2.
- Verhoeff K, Leeman M, Van Peer R et al. (1988) Changes in pH and the production of organic acids during colonization of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* 122:327-336.
- Vollenbroich D, Ozel M, Vater J et al. (1997a) Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* 25:289-297.
- Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M et al. (1997b) Antimycoplasma properties and application on cell cultures of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 63:44-49.
- Walker JE, Abaraham EP (1970a) Isolation of bacilysin and a new amino acid from culture filtrates of *Bacillus subtilis*. *Biochem J* 118:557-561.
- Walker JE, Abaraham EP (1970b) The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*. *Biochem J* 118:563-570.
- Walton RB, Woodruff HB (1996) A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. *J Antibiot* 39:636-641.

- Wang G, Hosaka T, Ochi K (2008) Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl Environ Microbiol* 74:2834-2840.
- Wang SL, Kaoc TY, Wang YH et al. (2006) Solvent stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in deproteinization of squid pen for β -chitin preparation. *Enzyme Microbial Technol* 39:724-731.
- Wang SL, Yeh PY (2006) Production of a surfactant- and solvent-stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell wastes fermented by *Bacillus subtilis* TKU07. *Process Biochem* 41:1545-1552.
- Wang T, Liang Y, Wu M et al. (2015) Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chin J Chem Eng* 23:744-754.
- Watersa SM, Zeiglerb DR, Nicholson WL (2015) Experimental evolution of enhanced growth by *Bacillus subtilis* at low atmospheric pressure: Genomic changes revealed by whole-genome sequencing. *Appl Environ Microbiol* 81:7525-7532.
- Weber T, Blin K, Duddela S et al. (2015) antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 43:237-43.
- Willett JLE, Gucinski GC, Fatherree JP et al. (2015) Contact-dependent growth inhibition toxins exploit multiple independent cell-entry pathways. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 112:11341-11346.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P et al. (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* 8:561-580.
- Wintersinger JA, Wasmuth JD (2015) Kablammo: an interactive, web-based BLAST results visualizer. *Bioinformatics* 31:1305–1306.
- Wu WS (1983) Sorghum disease in Taiwan and characterization and control of its seed borne pathogens. *Pl Prot Bull Taiwan* 25:1-13.
- Yang JK, Shih IL, Tzeng YM et al. (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinise crustacean wastes. *Enzyme Microb Technol* 26:406-413.
- Yang SZ, Liu XY, Mu BZ (2008) The McLafferty rearrangement in the Glu residue in a cyclic lipopeptide determined by QTOF MS/MS. *J Mass Spectrom* 43:1673-1678.
- Yang SZ, Wei DZ, Mu BZ (2006) Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. *J Biochem Biophys Meth* 68:69-7.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I et al. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134.
- Yoneda Y, Maruo B (1975) Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of α amylase and protease, and its synergistic effect. *J Bacteriol* 124:48-54.
- Young JM, Kuykendall LD, Martínez-Romero E et al. (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J System Evol Microbiol* 51:89-103.
- Young R, Bläsi U (1995) Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev* 17:191-205.
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL et al. (2002) Production of iturin by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solanii*. *Soil Biol Biochem* 34:955-963.

- Yu X, Ai C, Xin L et al. (2011) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol* 47:138-145.
- Zeigler DR (2011) The genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23: insights into speciation within the *B. subtilis* complex and into the history of *B. subtilis* genetics. *Microbiology* 157:2033-2041.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L et al. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203-214.
- Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F et al. (2014) Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 9(3):e92486.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch K et al. (2011) PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res* 39:W347-W352.
- Zhu Z, Zhang J, Wu Y et al. (2013) Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. *World J Microb Biot* 29:2105-2114.
- Zheng G, Hehn R, Zuber P (2000) Mutational analysis of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis*: Identification of genes required for subtilosin production and immunity. *J Bacteriol* 182:3266-3273.
- Zheng G, Yan LZ, Vederas JC et al. (1999) Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol* 181:7346-7355.
- Zitter TA (1996) Black rot. in: *Compendium of Cucurbit Diseases*. Zitter TA, Thomas CE Hopkins DL eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN pp 48.

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A disszertáció "Az erdészeti kártevő *Armillaria* nemzetség patológiája és a biológiai védekezés lehetőségei" (GINOP-2.3.2-15-2016-00052) című projekt támogatásával készült (Széchenyi 2020 Program).

Elsőként hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Manczinger Lászlónak, aki szakdolgozó korom óta irányítja és segíti munkámat. Köszönetemet fejezem ki Dr. Kredics Lászlónak hasznos szakmai tanácsaiért, támogatásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, hogy lehetővé tette dolgozatom elkészítését a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönöm a laborban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét Dr. Körmöcziné Dr. Sajben-Nagy Enikőnek, Dr. Körmöczy Péternek, Dr. Hatvani Lórántnak. A szurfaktin-mérések során végzett munkámhoz nyújtott segítségéért külön köszönettel tartozom Dr. Szekeres Andrásnak, Dr. Varga Mónikának, Kecskeméti Anitának, Bartal Attilának. Köszönet illeti Dr. Kocsubé Sándort, aki nagyban segítette a genomszekvenálás adatainak kiértékelését.

Szeretnék köszönetet mondani a Tanszék összes dolgozójának, hogy munkájukkal és szakértelmükkel segítették dolgozatom elkészítését.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék hálás köszönetet mondani kicsiny, de annál inkább összetartó családomnak, akik mindvégig mellettem álltak és mindenben segítettek.

11 MELLÉKLETEK

1. melléklet. A dolgozatban felhasznált törzsek listája.

Fajnév ^a	Törzsgyűjteményi szám ^b	Származás/ Megjegyzés
<i>Bacillus subtilis</i>	SZMC 6179J	paradicsom-rizoszféra / Magyarország
<i>Bacillus mojavenensis</i>	SZMC 6158J	paradicsom-rizoszféra / Magyarország
<i>Bacillus velezensis</i>	SZMC 6161J	paradicsom-rizoszféra / Magyarország
<i>Bacillus mojavenensis</i>	SZMC 6163J	paradicsom-rizoszféra / Magyarország
<i>Bacillus mojavenensis</i>	SZMC 6168J	paradicsom-rizoszféra / Magyarország
<i>Bacillus soronensis/licheniformis</i>	SZMC 6170J	paradicsom-rizoszféra / Magyarország
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SZMC 6225J	paradicsom-rizoszféra / Magyarország
<i>Allorhizobium vitis</i> (korábban <i>Agrobacterium vitis</i>)	SZMC 21396	saját izolálás / Szegedi és mtsai. 1988
<i>Clavibacter michiganensis</i>	SZMC 0016	MTA Növényvédelmi Kutató Intézet / -
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>panici</i>	SZMC 16160	Rothadó laskagomba-termőtest (laskagomba-termesztőhely) / Kecskemét, Magyarország
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	SZMC 16149	Rothadó laskagomba-termőtest (laskagomba-termesztőhely) / Kecskemét, Magyarország
<i>Rhizobium radiobacter</i> (korábban <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	SZMC 21395	- / -
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	SZMC 6185	- / -
<i>Candida albicans</i>	SZMC 1463	- / DOTE / Magyarország
<i>Alternaria alternata</i>	SZMC 16085	Orchideagyűjtemény / ELTE Füvészkert, Magyarország
<i>Alternaria solani</i>	SZMC 6241J	Zöldségekből / -
<i>Armillaria gallica</i>	SZMC 24095	rizomorfa / Keszthelyi-hegység
<i>Armillaria mellea</i>	SZMC 24132	rizomorfa / Keszthelyi-hegység
<i>Armillaria ostoyae</i>	SZMC 24129	rizomorfa / Rosalia
<i>Botrytis cinerea</i>	SZMC 14526	- /Gödöllő, Magyarország
<i>Bipolaris bicolor</i>	SZMC 13055	<i>Pennisetum clandestinum</i> / Ausztrália

<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SZMC 16086	Orchideagyűjtemény / ELTE Füvészkert, Magyarország
<i>Curvularia spicifera</i>	CBS 197.31, SZMC 13088	<i>Nicotiana tabacum</i> / -
<i>Fusarium culmorum</i>	NRRL 29365, SZMC 11039	- / USA
<i>Fusarium graminearum</i>	NRRL 28585, SZMC11030	lágyszárú szőlő / Venezuela
<i>Fusarium moniliforme</i>	SZMC 11046	- / -
<i>Fusarium oxysporum</i>	SZMC 6237J	Zöldségekből / -
<i>Fusarium solani</i>	CBS 115659, SZMC 11057F	- / -
<i>Phoma cucurbitacearum</i>	SZMC 16088	Orchideagyűjtemény / ELTE Füvészkert, Magyarország
<i>Phytophthora infestans</i>	SZMC 6246J	Zöldségekből / -
<i>Rhizoctonia solani</i>	SZMC 21048	Levegő/Szeged
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SZMC 6250J	Zöldségekből / -
<i>Trichoderma aggressivum f. europaeum</i>	SZMC 1746	Csiperkekomposzt / Magyarország
<i>Trichoderma aggressivum f. europeum</i>	CBS 433.95, SZMC 1811	Csiperkekomposzt / Egyesült Királyság
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 1844	Csiperkekomposzt / Horvátország
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 1845	Csiperkekomposzt / Horvátország
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 1847	Csiperkekomposzt / Horvátország
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 1849	Csiperkekomposzt / Horvátország
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 12430	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 12431	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 12432	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma harzianum</i>	SZMC 12433	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroticola</i>	SZMC 1729	Laskagomba-termesztési alapanyag / Kecskemét, Magyarország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12437	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12436	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12438	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12439	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12440	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12441	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország

<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12442	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12443	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12444	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12445	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12446	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12447	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12448	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12449	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12450	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12451	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12452	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12453	Laskagomba-zöldpenész /Spanyolország
<i>Trichoderma pleuroti</i>	SZMC 12454	Laskagomba-termesztési alapanyag / Kecskemét, Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 2979	Hagyma / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 2984	Hagyma / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 2985	Hagyma / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 2997	Hagyma / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 2999	Hagyma / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3006	Hagyma / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3212	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3213	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3214	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3218	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3220	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3221	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus awamori</i>	SZMC 3222	- / -
<i>Aspergillus flavus</i>	SZMC 3233	- / -
<i>Aspergillus flavus</i>	SZMC 3234	- / -
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2759	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2760	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2761	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2764	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2765	Mazsola / Magyarország

<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2766	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2769	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2770	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2772	Mazsola / Magyarország
<i>Aspergillus niger</i>	SZMC 2773	Mazsola / Magyarország

^aA táblázatban a fajok nevei a különböző törzsgyűjtemények azonosításainak felelnek meg.

^bRövidítések: ATCC: American Type Culture Collection, USA; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Hollandia; NRRL: Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection, USA; SZMC: Szeged Microbiology Collection, Magyarország.

2. melléklet. Pozitív/negatív MS-paraméterek.



Pozitív/negatív MS-paraméter neve	MS-paraméter értéke
Spray kamra hőmérséklet	50 °C
Szárító gáz (N ₂) nyomás	30 psi
Szárító gáz (N ₂) hőmérséklet	350 °C
Nebulizer gáz (N ₂) nyomás	50 psi
Tű feszültség	5000 V/-5000 V
Spray shield feszültség	600 V
Általános paraméter neve	Általános paraméter értéke
Maximális scan idő	2,78 sec/scan
µScans átlag	2 µScans
Adatrögzítési gyakoriság	0,36 Hz
Multiplier offset	0
Ionizáció ellenőrző paraméter neve	Ionizáció ellenőrző paraméter értéke
Target TIC	100%
Max ion idő	500000 µs
Full scan paraméterek neve	Full scan paraméterek értéke
Kapilláris feszültség	231,3 V
RF loading	68%
Tömegtartomány:	100 - 2000 <i>m/z</i>

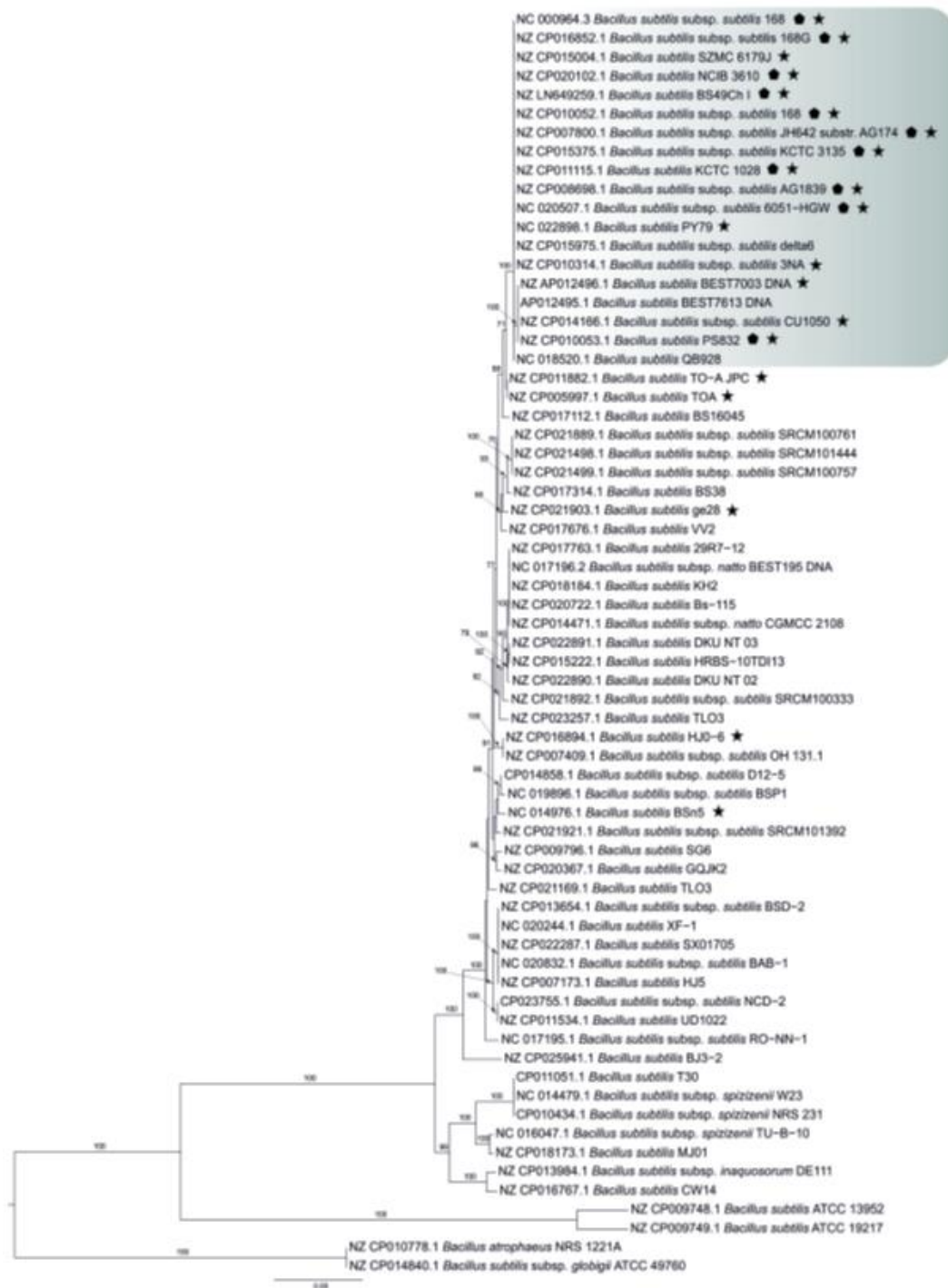
3. melléklet. Spontán sztreptomycin-rezisztens *Bacillus subtilis* törzsek kimotripszin-típusú proteáz termelésére való képessége a *Bac. subtilis* SZMC 6179 vad törzs termeléséhez viszonyítva, %-ban megadva (A vad törzs termelése: 100% ± 4,32).

STR 1	63,57±1,33	STR 45	14,91±1,15	STR 91	19,27±2,63	STR 136	21,52±3,60
STR 2	40,65±1,26	STR 46	14,35±0,57	STR 92	36,43±34,31	STR 137	14,21±1,81
STR 3	30,38±3,08	STR 47	14,35±0,21	STR 93	172,71±3,40	STR 140	30,66±5,26
STR 4	26,30±9,80	STR 48	14,06±0,21	STR 94	224,19±3,86	STR 151	19,69±4,95
STR 5	163,99±5,64	STR 49	14,35±0,43	STR 95	69,06±3,90	STR 152	19,97±2,91
STR 6	120,25±4,15	STR 50	16,17±0,28	STR 96	215,61±14,16	STR 154	23,07±3,24
STR 7	20,25±2,50	STR 51	25,88±2,44	STR 97	177,50±14,60	STR 157	26,02±3,95
STR 8	75,95±3,08	STR 52	42,48±19,98	STR 98	225,04±14,18	STR 158	16,17±19,45
STR 9	60,48±4,15	STR 53	33,47±12,24	STR 99	23,07±1,95	STR 159	28,83±12,23
STR 10	47,82±3,13	STR 54	15,33±0,78	STR 100	154,99±11,60	STR 160	18,99±2,52
STR 11	90,01±1,52	STR 55	34,18±4,79	STR 101	140,08±6,70	STR 161	29,96±1,00
STR 12	81,58±1,81	STR 56	24,89±2,18	STR 102	189,03±8,86	STR 162	21,94±4,87
STR 13	40,79±11,23	STR 57	45,99±23,97	STR 104	113,64±4,20	STR 163	38,26±9,07
STR 14	14,35±1,95	STR 58	13,78±2,00	STR 106	213,22±10,65	STR 164	22,78±2,34
STR 15	10,97±3,13	STR 59	16,32±1,18	STR 107	26,02±1,78	STR 165	19,27±12,33
STR 16	12,52±7,20	STR 60	42,62±1,98	STR 108	16,17±0,71	STR 166	21,66±4,08
STR 17	9,56±5,60	STR 61	34,04±11,23	STR 109	28,83±2,44	STR 167	21,66±6,63
STR 18	57,24±6,40	STR 62	17,30±3,13	STR 110	18,99±0,63	STR 168	32,91±2,21
STR 19	57,67±7,20	STR 63	30,38±5,60	STR 111	29,96±3,26	STR 169	19,27±7,18
STR 20	75,95±8,30	STR 64	19,69±4,13	STR 112	21,94±3,44	STR 170	18,57±3,96
STR 21	24,33±10,55	STR 65	32,35±5,64	STR 113	38,26±6,15	STR 171	21,52±1,00
STR 22	16,74±4,13	STR 66	20,39±7,94	STR 114	22,78±1,49	STR 172	14,21±25,34
STR 23	22,22±7,94	STR 67	25,04±1,52	STR 115	19,27±0,32	STR 173	30,66±7,27
STR 24	21,52±1,95	STR 68	28,13±4,79	STR 116	21,66±2,18	STR 174	19,69±2,27
STR 25	18,28±2,26	STR 69	22,50±1,33	STR 117	21,66±2,18	STR 175	19,97±3,24
STR 26	26,44±11,23	STR 70	28,13±0,21	STR 118	32,91±6,20	STR 177	23,07±4,41
STR 27	21,38±1,81	STR 71	26,72±6,70	STR 119	19,27±1,43	STR 178	26,02±8,62
STR 28	21,24±3,13	STR 72	33,61±5,07	STR 120	18,57±1,27	STR 179	16,17±8,06
STR 29	19,41±1,52	STR 73	14,35±0,21	STR 121	21,52±2,82	STR 180	28,83±8,19
STR 30	19,27±3,08	STR 74	59,77±0,45	STR 122	26,02±3,71	STR 181	18,99±1,49
STR 31	19,69±4,15	STR 76	258,09±5,07	STR 123	16,17±3,81	STR 184	29,96±13,72
STR 32	27,71±2,61	STR 77	92,97±10,70	STR 124	28,83±0,74	STR 185	21,94±1,06
STR 33	20,68±1,86	STR 78	12,94±1,28	STR 125	18,99±1,31	STR 186	38,26±3,25
STR 34	21,52±1,91	STR 79	19,97±9,59	STR 126	29,96±2,01	STR 187	22,78±3,30
STR 35	29,11±5,64	STR 80	35,86±5,65	STR 127	21,94±2,21	STR 188	19,27±0,45
STR 36	18,71±1,34	STR 81	13,78±1,14	STR 128	38,26±3,71	STR 189	21,66±0,23

STR 37	19,83±1,26	STR 82	20,53±3,71	STR 129	22,78±4,24	STR 190	21,66±11,46
STR 38	18,99±1,33	STR 85	38,40±22,18	STR 130	19,27±2,32	STR 191	32,91±14,93
STR 39	20,39±9,80	STR 86	16,74±5,14	STR 131	21,66±2,32	STR 192	19,27±0,89
STR 40	17,72±0,00	STR 87	38,26±1,79	STR 132	21,66±5,01	STR 193	18,57±12,27
STR 41	13,64±0,24	STR 88	14,21±0,64	STR 133	32,91±9,87		
STR 42	21,24±11,49	STR 89	37,41±34,31	STR 134	19,27±2,48		
STR 43	13,78±0,61	STR 90	46,13±3,30	STR 135	18,57±2,39		

A szülői törzshöz képest fokozott enzimaktivitást mutató törzsek vastagon kiemelve.

4. melléklet. *Bacillus subtilis* törzsek 9 gén (*gyrA*, *gyrB*, *purH*, *glpF*, *pycA*, *ilvD*, *rpoD*, *tpiA* és *pta*) szekvenciáján alapuló maximum likelihood filogenetikai fa. Az elágazódások GTR+ Γ modellben, gamma eloszlású heterogenitás és 1000 rapid bootstrap ismétlés mellett készültek. ICEBs1 régiót tartalmazó törzsek az I. számmal jelölt csoportban találhatóak az ilyen törzseket  jellel jelöltük.  jel pedig azon törzseket jelöli, melyek tartalmazzák a teljes *yqcG* gént.



5. melléklet. SNP-k, melyek aminosavcsereét okoznak különböző génekben, ezzel azok funkcióiban esetleges zavart okozva.

Gén	SNP pozíciója	Gén funkciója
<i>cypC</i>	229835 /Referencia Pozíció=229964 Aminosavcsere=Cys147Tyr	zsírsav-peroxigenáz Hidrogén-peroxidáz jelenlétében katalizálja a mirisztinsav alfa- és béta-hiroxilációját.
<i>phoD</i>	284058 /Referencia Pozíció=284187 Aminosavcsere=Asn59Lys	alkalikus foszfatáz D
<i>ycgA</i>	325419 /Referencia Pozíció=325548 Aminosavcsere=Arg70Ser	integrált belső membránprotein
<i>yclM</i>	431730 /Referencia Pozíció=431866 Aminosavcsere=His41Arg	aszpartokináz 3
<i>ycsA</i>	453244 /Referencia Pozíció=453384 Aminosavcsere=Ser185Arg	tartarát dehidrogenáz/dekarboxigenáz
<i>yesS</i>	746223 /Referencia Pozíció=766594 Aminosavcsere=Lys253Glu	AraC család transzkripciósz regulátor Valószínűleg a ramnogalakturon depolimerizációját reguláló transzkripciósz faktor.
<i>yfhP</i>	914199 /Referencia Pozíció=934570 Aminosavcsere=Pro291Thr	YfhP nem jellemzett protein Valószínűleg a <i>yfhQ</i> , <i>fabL</i> , <i>sspE</i> és a <i>yfhP</i> transzkripcióját felelős negatív regulátor.
<i>oppC</i>	1202445 /Referencia Pozíció=1222831 Aminosavcsere=Trp100	oligopeptid transzportrendszer permeáz protein OppC
<i>yjcM</i>	1243898 /Referencia Pozíció=1264284	YjcM nem jellemzett protein

	Aminosavcsere=Lys216Asn	
<i>trmD</i>	1655463 / Referencia Pozíció=1675849	tRNS (guanin-N(1)-)-metiltranszferáz
	Aminosavcsere=His227Tyr	Specifikusan metilálja a guanozin-37-et különböző tRNS-eken
<i>yorO</i>	2154053 / Referencia Pozíció=2174438	SPBc2 profág származék YorO nem jellemzett protein
	Aminosavcsere=Arg38Gly	
<i>yopA</i>	2195691 / Referencia Pozíció=2216076	SPBc2 profág származék YopA nem jellemzett protein
	Aminosav csere=Trp234	
<i>gudB</i>	2382673 / Referencia Pozíció=2403064	katabolikus NADP-specifikus glutamát-dehidrogenáz GudB
	Aminosavcsere=Ala96Glu	
<i>radC</i>	2841739 / Referencia Pozíció=2862132	hipotetikus DNS-javító protein
	Aminosavcsere=Leu135Ser	
<i>amyD</i>	3078981 / Referencia Pozíció=3099373	hipotetikus ABC-transzporter-permeáz protein
	Aminosavcsere=His84Leu	
<i>cydD</i>	3953514 / Referencia Pozíció=3973920	ATP-kötő/permeáz protein
	Aminosavcsere=Ser391Phe	

6. melléklet. Deléciós/inszerció polimorfizmusok a *Bacillus subtilis* SZMC 6179J törzs genomjában.

Gén	Pozíció és változás	Funkció
<i>srfAC</i>	399063^399064 /Referencia Pozíció=399196, Aminosavcsere= Gln222_Lys223del ins Gln	szurfaktin-szintáz alegység 3 Valószínűleg a leucint aktiválja.
<i>Sfp</i>	407532^407533 /Referencia Pozíció=407668	sfp 4'-foszfoantetein- transzferáz Aktiválja a szurfaktin- szintáz (SRF1/2/3) hét peptidvivő fehérje doménjét (PCP) a koenzim A 4'- foszfoantetein részének szállítása által a szerin részhez. Szükséges a <i>Bac.</i> <i>subtilis</i> lipopeptid antibiotikumainak (szurfaktin és fengicin) termeléséhez.
<i>yhgB</i>	1062764 /Referencia Pozíció=1083152 Aminosavcsere= Asp12fs	YhgB nem jellemzett protein
<i>appA</i>	1193611 /Referencia Pozíció=1213998	oligopeptid kötő protein Oligopeptid permeáz komponens.
<i>yfmK</i>	1740904..1740905 /Referencia Pozíció=1761291	YmfK nem jellemzett protein
<i>gudB</i>	2382674 /Referencia Pozíció=2403059 Aminosavcsere= Lys95_Lys98 del ins Lys	GudBNAD-specifikus glutamát dehidrogenáz
<i>yrkH</i>	2691802 /Referencia Pozíció=2712197, Aminosavcsere= Lys16fs	YrkH nem jellemzett protein

<i>swrAA</i>	3601538^3601539 /Referencia Pozíció=3621943	swarming motility protein SwrAA Szükséges a rajzó sejtek differenciációjához. Fontos szerepet játszik a sejtek flagelláltsági fokának regulációjában.
<i>ywbD</i>	3915418^3915419 /Referencia Pozíció=3935824 Aminosavcsere=397fs	feltételezett riboszómális RNS nagy alegység metiltranszferáz

7. melléklet. Az SZMC 6179J törzs genomjában található antimikrobiális génklaszterek.

Klaszter	Típus	Mettől	Meddig	A leginkább hasonló ismert klaszter
Klaszter 1	Mikrocin	430	20578	<i>Lac. casei</i> (a gének 12%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 2	Mikrocin	20898	41046	<i>Lac. sp.</i> (a gének 13%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 3	Mikrocin	81155	107159	<i>Pae. polymyxa</i> (a gének 27%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 4	Mikrocin	151511	182147	<i>Bac. licheniformis</i> (a gének 30%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 5	Szubtilozin-szerű klaszter	205275	226765	Sporuláció killing faktor kfA bioszintézis génklaszter (a gének 100%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 6	NRPS	356836	422224	Szurfaktin bioszintézis génklaszter (a gének 82%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 7	Mikrocin	605689	625837	<i>Bac. pumilus</i> (a gének 15%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 8	Mikrocin	916937	937085	<i>Bac. sp.</i> (a gének 16%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 9	Terpének	1129535	1150359	<i>Bac. subtilis</i> QB928 (a gének 58%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 10	egyéb ks-NRPS-Transat pks	1748310	1858136	Bacillaene bioszintézis génklaszter (a gének 92%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 11	NRPS	1914140	1997593	Fengicin bioszintézis génklaszter (a gének 100%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 12	Terpének	2071759	2093681	<i>Bac. subtilis</i> QB928 (a gének 47%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 13	Glikocin	2239136	2259333	Sublancin 168 bioszintézis génklaszter (a gének 100%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 14	III. típusú poliketid szintáz	2276571	2317719	9 <i>Bacillus</i> genom (a gének 100%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 15	Mikrocin	3147475	3167623	<i>Bac. lehensis</i> (a gének 6%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 16	NRPS	3240114	3290023	Bacillibactin bioszintézis génklaszter (a gének 92%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 17	egyéb	3563417	3604172	Pulcherriminic sav szintézis (a gének 100%-a mutat hasonlóságot)

Klaszter 18	Sactipeptid	3805918	3827264	Subtilosin A bioszintézis génklaszter (a gének 87%-a mutat hasonlóságot)
Klaszter 19	egyéb	3830263	3871681	Bacilizin bioszintézis génklaszter (a gének 100%-a mutat hasonlóságot)

8. melléklet. Aminosavcserek a YqcG toxin szekvenciájában a kódoló génszekvencia variabilitása miatt.

SNP scanning érzékenység	5%	20%	35%
Aminosavcserek az YqcG toxinfehérje szekvenciájában	Lys15Asn	Gln18Lys	Val28Ala
	Gln18Lys	Val28Ala	Phe84Ile
	Val28Ala	Phe84Ile	Asn89Ser
	Phe84Ile	Asn89Ser	Thr98Ser
	Asn89Ser	Thr98Ser	Ala260Val
	Thr98Ser	Ser257Thr	
	Ala101Glu	Ala260Val	
	Leu104Phe	Ala316Gly	
	Met122Ile	Gly319Val	
	Asp128Glu	Lys343Gln	
	Gly173Ala		
	Arg240Lys		
	Ser257Thr		
	Ala260Val		
	Ala316Gly		
	Gly319Val		
	Lys343Gln		