

***Pseudomonas* izolátumok és *Aspergillus flavus* közötti
antagonista kölcsönhatások vizsgálata**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

PAPP DÓRA ANNA

TÉMAVEZETŐK

DR. VARGA MÓNICA

DR. HAMARI ZSUZSANNA

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
BIOTECHNOLÓGIAI ÉS MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2025

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2.	BEVEZETÉS	6
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1.	Az <i>Aspergillus flavus</i> jellemzése.....	8
3.2.	Az <i>A. flavus</i> elleni védekezés lehetőségei	9
3.3.	Biokontroll mikroorganizmusok a növényvédelemben	11
3.4.	A biokontroll mikroorganizmusok hatásmechanizmusai	12
3.4.1.	A közvetlen kölcsönhatások jellemzése	13
3.4.1.1.	Antagonizmus	13
3.4.1.2.	Parazitizmus.....	16
3.4.1.3.	Kompetíció.....	16
3.4.2.	Közvetett kölcsönhatások	16
3.5.	A <i>Pseudomonas</i> nemzetség jellemzése	17
3.6.	A <i>Pseudomonas</i> fajok által termelt bioaktív vegyületek	18
3.6.1.	<i>Pseudomonas</i> fajok által termelt bioszurfaktánsok.....	21
3.6.1.1.	A ciklikus lipopeptidek.....	21
3.6.1.2.	A ramnolipidek.....	22
3.6.2.	A homoszerin-laktonok	22
3.6.3.	Illékony szerves vegyületek	23
3.6.4.	A baktériumok által termelt zsírsavak.....	25
3.7.	Metabolomikai vizsgálatok	25
4.	CÉLKITŰZÉSEK	28
5.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
5.1.	Anyagok	29
5.1.1.	Felhasznált anyagok.....	29
5.1.2.	Felhasznált törzsek.....	29
5.1.3.	Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	29
5.2.	Módszerek.....	30
5.2.1.	<i>Pseudomonas</i> törzsek izolálása és azonosítása	30
5.2.2.	A baktériumok előtenyésztése	33
5.2.3.	<i>Pseudomonas</i> másodlagos metabolitok vizsgálata különböző tápoldatokban	33
5.2.4.	A baktériumok zsírsavprofil analízise	33

5.2.5. A baktériumok AFB1-bontó képességének vizsgálata	34
5.2.6. A baktériumok hidrogén-cianid termelésének vizsgálata.....	34
5.2.7. Növekedési és biokémiai tesztek	34
5.2.8. A poláris lipidek és izoprenoid kinonok extrakciója.....	35
5.2.8.1. Az ektoin és az <i>N</i> -acetyl-glutaminil-glutamin amid extrakciója.....	36
5.2.8.2. Az aril-poliének extrakciója	36
5.2.9. Mintaelőkészítés a pásztázó elektronmikroszkóphoz	37
5.2.10. Az antagonista tesztekhez szolgáló <i>A. flavus</i> tárolása.....	37
5.2.10.1. Szilárd fázisú konfrontációs tesztek.....	37
5.2.10.2. Az illékony komponensek vizsgálata szilárd fázisú konfrontációs tesztek során ...	38
5.2.10.3. Folyadékfázisú konfrontációs tesztek	38
5.2.10.4. A folyadékfázisú konfrontációs teszt fermentlevek AFB1 tartalmának meghatározása	38
5.2.10.5. A Ps_4 izolátum (<i>P. paracarnis</i>) és az <i>A. flavus</i> közötti folyadékfázisú konfrontációs kísérlet és mintaelőkészítése	39
5.2.10.6. A lipidomikai mérések mintaelőkészítése	40
5.2.11. Analitikai mérések.....	41
5.2.11.1. Zsírösszetétel meghatározása.....	41
5.2.11.2. HPLC-HRMS mérések.....	41
5.2.11.2.1. Másodlagos metabolitok vizsgálata.....	41
5.2.11.2.2. Az AFB1 mennyiségének meghatározása.....	42
5.2.11.2.3. Az ektoin és az NAGGN meghatározása.....	42
5.2.11.2.4. Az aril-poliének meghatározása	43
5.2.11.2.5. A poláris lipidek és izoprenoid kinonok meghatározása.....	43
5.2.11.2.6. Lipidomikai mérések	44
5.2.11.3. Alkalmazott programok.....	44
5.2.12. Adat és törzs deponálás elérhető adatbázisokban és törzsgyűjteményekben	46
5.2.13. Statisztikai analízis.....	46
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	47
6.1. <i>Pseudomonas</i> törzsek izolálása és azonosítása	47
6.2. A Ps_91 törzs genomszekvenálása és genomelemzése	52
6.2.1. Másodlagos metabolit klaszterek <i>in silico</i> azonosítása a Ps_91 törzs genomjában	55
6.2.2. A klaszterek alapján feltételezett másodlagos metabolitok termelésének <i>in vivo</i> vizsgálata	56
6.2.3.1. Az ektoin és az NAGGN azonosítása	56
6.2.3.2. Az aril-polién azonosítása	57
6.2.4. A <i>Pseudomonas</i> sp. nov. Ps_91 törzs fenotípus vizsgálata	58
6.2.5. A poláris lipidek és izoprenoid kinonok vizsgálata a Ps_91 törzsben.....	60
6.3. Másodlagos metabolitok vizsgálata a rizoszféra <i>Pseudomonas</i> izolátumok különböző tápközegben történt tenyésztését követően	60

6.4. A <i>Pseudomonas</i> törzsek hidrogén-cianid termelő képessége.....	63
6.5. A <i>Pseudomonas</i> izolátumok és az <i>A. flavus</i> közötti kölcsönhatások vizsgálata.....	64
6.5.1. Volatilis vegyületek antagonista hatásának vizsgálata szilárd fázisú <i>A. flavus</i> - <i>Pseudomonas</i> rendszerben	64
6.5.2. A <i>Pseudomonas</i> izolátumok hatása az <i>A. flavus</i> növekedésére és AFB1 termelésére szilárd tápközegben	66
6.5.3. Az izolátumok hatása az <i>A. flavus</i> növekedésére és AFB1 termelésére folyadékfázisban	68
6.5.4. A <i>Pseudomonas</i> izolátumok AFB1 bontó képességének tesztelése	71
6.5.5. Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek képződésének azonosítása és értelmezése	71
6.5.5.1. A citokróm P-450 oxidoreduktáz és más oxidoreduktázok potenciális szerepe az AFB1 szintézisében és átalakításában	73
6.5.5.2. A nem-enzimatis reakciókban termelődő vegyületek.....	75
6.5.5.3. Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek előfordulása a kölcsönhatások során	75
6.6. A Ps_4 izolátum és az <i>A. flavus</i> folyadékfázisú konfrontációjának komplex metabolomikai jellemzése.....	77
6.6.1. A metabolitok szelektálása	78
6.6.2. Az <i>A. flavus</i> metabolitkészlete	81
6.6.3. A <i>P. paracarnis</i> metabolitkészlete.....	82
6.6.4. A konfrontáció metabolitkészlete	82
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	88
8. SUMMARY	92
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	98
11. MELLÉKLETEK	112

1. Rövidítések jegyzéke

4	<i>P. paracarnis</i> önálló tenyészetének kódolása a <i>P. paracarnis</i> - <i>A. flavus</i> folyadékfázisú konfrontációs kísérletben
4CF	<i>P. paracarnis</i> - <i>A. flavus</i> folyadékfázisú konfrontációs kísérletben az <i>A. flavus</i> tenyésze a baktérium sejtmentes fermentlevével inkubálva
4D	<i>P. paracarnis</i> - <i>A. flavus</i> folyadékfázisú konfrontációs kísérletben az <i>A. flavus</i> tenyésze az inaktivált baktérium sejtek jelenlétében inkubálva
AF	Aflatoxin
AFB1	Aflatoxin B1
AFD1	Aflatoxin D1
AFM1	Aflatoxin M1
AFP1	Aflatoxin P1
ACN	Acetonitril
AHL	N-acilezett-homoszerin-lakton (Acyl-homoserine-lactone)
AG1	Aflatoxin G1
AG2	Aflatoxin G2
AGC	Automatikus Erősítésszabályozás (Automatic Gain Control)
ANI	Nukleotid azonossági érték (Average Nucleotide Identity)
ASP	Aspertoxin
BCA	Biokontroll ágens (Biocontrol agent)
CD	Compound Discoverer program
CLP	Gyűrűs lipopeptidek (Cyclic Lipopeptide)
DDH	DNS-DNS hibridizáció (DNA-DNA hybridization)
DH-OH-ASP	Dihidroxiaspertoxin
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
ESI	Elektroporlasztásos ionizáció (Electrospray Ionization)
F	<i>A. flavus</i> önálló tenyészetének kódolása a <i>P. paracarnis</i> - <i>A. flavus</i> folyadékfázisú konfrontációs kísérletben
FA	Hangyasav (Formic acid)
FCF	A <i>P. paracarnis</i> - <i>A. flavus</i> folyadékfázisú konfrontációs kísérletben a <i>P. paracarnis</i> tenyésze a gomba sejtmentes fermentlevével inkubálva
FD	A <i>P. paracarnis</i> - <i>A. flavus</i> folyadékfázisú konfrontációs kísérletben a <i>P. paracarnis</i> tenyésze az inaktivált gomba micélium jelenlétében inkubálva
GC	Gázkromatográfia (Gas Chromatography)
GC-MS	Gázkromatográffal csatolt tömegspektrometria (Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry)
HCN	Hidrogén-cianid
HESI	Fűtött elektroporlasztásos ionizáció (Heated Electrospray Ionization)
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-HRMS	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia nagyfelbontású tömegspektrométerrel (High Performance Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry)
HSL	Homoszerin-lakton (Homoserine lactone)
ISR	Indukált Szisztémás Rezisztencia (Induced Systemic Resistance)

IT	Izolációs idő (Isolation Time)
LB	Luria-Bertani tápközeg
Me-AFB2a	Metoxi-aflatoxin B2a
MEOH	Metanol
MS/MS	Tandem tömegspektrometria (Tandem Mass Spectrometry)
MS2	MS-MS spektrum, fragmensek detektálása
NAGGN	<i>N</i> -acetyl-glutaminil-glutamin amid
NCAIM	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms)
NCCB	Hollandiai Baktérium Törzsgyűjtemény (Netherlands Culture Collection of Bacteria)
NMR	Mágneses Magrezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)
NRPS	Nem-riboszómális peptid-szintáz (Nonribosomal peptide synthetase)
OD	Optikai denzitás
OH-ASP	11- hidroxiaspertoxin
OH-OMeSTC	11-hidroxi-O- metilsterigmatocisztin
PCA	Fenazin-1-karbonsav (Phenazine-1-carboxylic acid)
PCH	Piocelin (Piocelin)
PCR	Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PDA	Burgonya-dextróz táptalaj (Potato Dextrose Agar)
PDB	Burgonya-dextróz tápoldat (Potato Dextrose Broth)
PE	Foszfatidil-etanolamin (Phosphatidyl ethanolamine)
PKS	Poliketid-szintáz (Polyketide synthase)
PRM	Párhuzamos reakció monitorozás (Parallel reaction monitoring)
Ps-CLP	<i>Pseudomonas</i> ciklikus lipopeptid (<i>Pseudomonas</i> Cyclic Lipopeptide)
PVDF	Polivinilidén-fluorid
QS	Quorum Sensing
RiPP	Riboszómálisan szintetizált és poszttranszlációsán módosított peptidek (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides)
SEM	Pásztázó elektronmikroszkóp (Scanning Electron Microscope)
SZMC	Szegedi Mikrobiológiai Gyűjtemény (Szeged Microbiological Collection)
UHPLC	Ultrahatékony folyadékkromatográfia (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
VOC	Illékony komponensek (Volatile Compounds)
YPD	Élesztőkivonat-pepton-dextróz tápközeg (Yeast-Peptone-Dextrose Broth)

2. Bevezetés

A mikroorganizmusok a bioszféra alapvető részei, melyek a talajban, vízben, levegőben, valamint az eukarióták szervezetében egyaránt megtalálhatók. A természetben a mikroorganizmusok összetett közösségeket alkotnak, és komplex hálózataik révén nem csak az egy fajba tartozó egyedek között válik lehetővé a kölcsönhatások létrejötte. Ezek a kölcsönhatások különböző mértékben befolyásolják a résztvevő partnerek növekedését, szaporodását, táplálkozását, mozgását, stresszel szembeni ellenálló képességét, patogenitását, ezért a kölcsönhatás jellege a mutualizmustól az parazitizmusig terjedhet (Deveau és mtsai., 2018). A növények számára a környezeti mikrobák parazita, kommenzalista és mutualista szimbionta szerepet vehetnek fel. Mutualistának tekinthetjük azokat a mikrobákat, melyek pozitív hatással vannak a növények tápanyagellátottságára, ásványi anyag- és vitaminpótlására, valamint védelmi mechanizmusaira, különösen a biotikus és abiotikus stressz ellen (Vandenkoornhuyse és mtsai., 2015). A parazita mikrobák a növényekben kórfolyamatot váltanak ki és termés kieséshez vezethetnek. A fitopatogén gombák különösen sok gondot okoznak. Egyrészt az ellenük alkalmazott növényvédőszer hatóanyagok az emberi gyógyászatban is használatosak, ezért herbicidként való használatuk során a környezetbe kijutva a humánpatogén fajok körében is rezisztens törzsek kialakulásához vezet. Másrészt számos fitopatogén gomba nem csak a szántóföldön okoz kártételt, hanem a termés raktározásakor mikotoxinokkal szennyezheti azt, komoly egészségügyi kockázatot jelentve emberre és állatra egyaránt (Bennett és mtsai., 2003). A fitopatogén gombák elleni védekezés során a fungicidek használatán kívül különböző módszereket alkalmazhatnak, mint például a vetésforgó, a rezisztens fajok nemesítése és termesztése, valamint környezetbarát megoldásként a biokontroll baktérium, illetve gomba törzsek használata. Jelenleg kiterjedten kutatott terület a gomba-baktérium kölcsönhatások vizsgálata, ideális biokontroll törzsek azonosítása, a kölcsönhatások mechanizmusainak vizsgálata és új bioaktív hatóanyagok keresése. Mivel a rizoszféra-talajban intenzív mikrobiális interakciók zajlanak, ezért a rizoszférából izolált mikrobák tanulmányozásával nyílik a legjobb lehetőségünk kiemelkedő biokontroll potenciállal rendelkező mikrobák izolálására.

Az értekezésben bemutatott PhD kutatás a fitopatogén és raktári kártevő *Aspergillus flavus* gomba elleni hatékony biológiai védekezés lehetőségét keresve a metabolikusan sokoldalú *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó fajok (Haas és mtsai., 2005) izolálását, és a gomba-baktérium kölcsönhatások vizsgálatát célozza.

A szakirodalomból ismeretes, hogy a fluoreszcens *Pseudomonas* fajok a fitopatogén gombákkal szemben gombaellenes hatással bírnak változatos szerkezetű diffúzibilis vegyülettermelésük révén (pl. fenazinok, floroglucinolok, pirrolnitrin, pioluteorin, ciklikus lipopeptid és hidrogén-cianid) (Haas és mtsai., 2005).

Az *A. flavus* főleg a meleg és párás éghajlatú területeken fordul elő, leginkább a magas olajtartalmú magvakon- kukorica és földimogyoró- okoz károkat, elsősorban azokon a területeken, ahol a hőstressznek, szárazságnak és rovarkártételnek kitett növények még fogékonyabbak a fertőzésre. A szélsőséges környezeti változásoknak köszönhetően a világ eddig érintetlen területein is kimutatható a gomba kártétele. Az *A. flavus* elleni védekezés azért is kiemelt fontosságú, mivel az általa termelt aflatoxinokat, különös tekintettel az aflatoxin B1-re, a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség a humán rákkeltő anyagok I. osztályába sorolta (IARC, 2002) rákkeltő, mutagén és immunszuppresszív hatásuk miatt. Mivel az AFB1 komoly egészségügyi kockázatot jelent az emberekre és állatokra nézve egyaránt, ezért bioszintézis útvonalainak-, valamint mikrobiális degradációs származékainak felderítésére komoly hangsúlyt fektettek.

A PhD értekezés 50 *Pseudomonas* izolátum és az *A. flavus* közötti interakciót vizsgálja metabolom szinten mindkét konfrontálódó partner szempontjából, azzal a céllal, hogy kiválasztva egy antagonista kölcsönhatást, annak részletes metabolomikai jellemzésével betekintést nyerjünk a kölcsönhatás mechanizmusába.

3. Irodalmi áttekintés

A mikroorganizmusok a bioszféra alapvető részét képezik, és összetett közösségeik révén kölcsönhatásba lépnek egymással, befolyásolva növekedésüket, szaporodásukat és stressztűrő képességüket. A növények számára a mikrobák lehetnek paraziták, kommenzalisták vagy mutualista szimbionták, amelyek elősegíthetik a tápanyagfelvételt és védelmet nyújthatnak különböző stresszhatások ellen (Vandenkoornhuyse és mtsai., 2015).

A fitopatogén gombák jelentős mezőgazdasági problémát okoznak, nemcsak a növények károsítása, hanem a betakarított termény mikotoxin-szennyezése révén is (Bennett és mtsai., 2003). A védekezésben a fungicidek mellett vetésforgó, rezisztens növényfajták és biokontroll mikroorganizmusok alkalmazása is szerepet kap. Korunkban a környezetünk vegyszerekkel történő terheltsége olyan nagymértékű, mely jelentősen hozzájárul számos betegség kialakulásához és gyengíti természetes védekezőképességünket. Ezért egyre fontosabbak azok a kutatások, melyek hozzásegítik a környezetre- és az emberi egészségre ártalmas vegyszerek felváltására szolgáló bioaktív anyagok felfedezését, illetve a biokontroll mikrobák alkalmazását.

A rizoszférában zajló mikrobiális interakciók vizsgálata kiemelten fontos a hatékony biokontroll törzsek azonosítása szempontjából. Mivel a disszertáció célja a *Pseudomonas* fajok izolálása és antagonista szerepük feltárása az *A. flavus* ellen, az értekezés irodalmi áttekintésében az *A. flavus* és a *Pseudomonas* fajok bemutatására, valamint a mikrobiális kölcsönhatások áttekintésére fókuszálunk.

3.1. Az *Aspergillus flavus* jellemzése

Az *A. flavus* szaprofita fonalas gomba jelentős gazdasági károkat okoz, mivel nemcsak a termény minőségét rontja, hanem aflatoxinnal (AF) is elszennyezi (különös tekintettel az olajos magvakra). Az aflatoxinok közül az aflatoxin B1-et (AFB1) a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC, 2002) az I. osztályú humán rákkeltő anyagok közé sorolta rákkeltő, mutagén és immunszuppresszív hatása miatt. Az aflatoxinnal szennyezett élelmiszerek fogyasztása emberben akut aflatoxikózis kialakulásához vezet. Az AFB1 toxinnal szennyezett takarmány negatív hatással van az állatállomány növekedési és szaporodási képességére, károsodásokat okoz fő szerveikben, valamint gyengíti a betegségekkel szembeni ellenállóképességüket (Robens és mtsai., 1992). A brit pulykavész néven ismert 1960-as években történt esemény vezetett a toxin felfedezéséhez, amikor

aflatoxinnal szennyezett importált földimogyoró takarmány nagy számú pulyka elpusztulását okozta (Blount és mtsai., 1960). A toxin az emlősök izomszövetében és belső szerveiben halmozódik fel, vagy olyan szintén toxikus metabolittá alakul, amely tejkiválasztás útján távozik szervezetükből (Zentai és mtsai., 2023). A baromfik közül a pulykák különösen érzékenyek a toxinnal szemben, amely főleg a májfunkciók kóros elváltozásaiban nyilvánul meg (Rawal és mtsai., 2010; Wang és mtsai., 2023). A közegészségügyi kockázat minimalizálása érdekében, számos ország szigorú szabályozásokat vezetett be az élelmiszerek (0-15 ppb) és takarmányok (0,5-300 ppb) aflatoxinnal való szennyezettségének ellenőrzésére. A fejlett országok a toxin rákkeltő hatása miatt a lehető legkisebb megengedett aflatoxinszintet szabják meg. Az iparosodott államok szigorúbb szabályozásokat alkalmaznak, és rendszeresen felülvizsgálják és frissítik az aflatoxinnal kapcsolatban megengedett határértékeiket, különös tekintettel az aflatoxinnal esetlegesen szennyezett árucikkek importjára és exportjára, ellentétben a fejlődő és kevésbé fejlett országokkal (Yakubu és Vyas, 2020). Az *A. flavus* elsősorban a környezeti stresszhatásoknak, például a szárazságnak, hőstressznek és rovarkártevőknek kitett növényeket fertőzi meg, leginkább a meleg és nedves éghajlatú régiókban, például Afrikában, Ázsiában és Dél-Amerikában, de Észak-Amerika és Európa egyes részein is előfordul. Az éghajlatváltozás hatásai (beleértve a fokozott szárazság okozta stresszt, a magfenológia változásait és a kártevők szaporodásának növekedését) elősegíthetik, hogy az *A. flavus* más penészgomba fajokkal együtt a világ eddig *A. flavus* által érintetlen területein is elterjedjen.

3.2. Az *A. flavus* elleni védekezés lehetőségei

Az *A. flavus* fertőzés megelőzése érdekében különböző betakarítás előtti stratégiákat alkalmaznak, beleértve a megfelelő szántóföldi gazdálkodási gyakorlatokat, rezisztens magfajták termesztését, szintetikus vegyszerek használatát, valamint a kompetitív atoxigenikus *A. flavus* törzsek alkalmazását. Az első kereskedelmi forgalomban kapható atoxigenikus *A. flavus* az afla-Guard volt, ami szakirodalmi adatok alapján képes csökkenteni a földimogyoró, a kukorica és a gyapot aflatoxinnal való fertőzöttségét (Dorner és Lamb, 2006). Problémát jelentett azonban, hogy a biokontroll nem-önfenntartónak bizonyult. Az afla-Guard-dal kezelt területeken az atoxigenikus törzset rövid idő alatt leváltotta a vad típusú, toxintermelő törzs. Lehetséges védekezni a betakarítás után is. A betakarítás utáni kezelések során a megfelelő tárolási körülmények (optimális hőmérséklet

és páratartalom) fenntartása mellett széles körben alkalmaznak különböző fizikai eljárásokat, mint például adszorpció, válogatás, hántolás, hőkezelés, UV- és gamma-sugárzás. Továbbá kémiai módszereket is alkalmaznak, amelyek a szerves és szervetlen savak vagy gázok felhasználását foglalják magukba. A fizikai eljárások alkalmazása számos előnnyel jár, például csökkenti a mikrobiológiai szennyezettséget, a toxintartalmat és a vegyszerek maradványait, azonban az élelmiszer mindeközben jelentős tápanyagtartalmat veszít (Sipos és mtsai., 2021, Marshall és mtsai., 2020). Számos kutatás az *A. flavus* fertőzés megelőzésére és az aflatoxin termelés szabályozására alkalmas biokontroll törzsek (gomba, élesztő és baktérium) azonosítására fekteti a hangsúlyt (Ren és mtsai., 2020).

A biokontroll ágensek különböző mechanizmusokon keresztül akadályozhatják az aflatoxintermelést, ezek közé tartozik a tápanyagokért és helyért folytatott versengés, valamint a bioszintetikus útvonalak gátlása enzimek, diffúzibilis vagy illékony metabolitok felszabadítása (Hruska és mtsai., 2014; Jermnak és mtsai., 2013; Kong és mtsai., 2014; Madbouly és mtsai., 2023). A betakarítás utáni biokontroll stratégiák közé tartozik a toxin mikrobiális megkötéssel (El-Nezami és mtsai., 1998) vagy biológiai lebontással (Verheeecke és mtsai., 2016) történő eltávolítása. Fontos megjegyezni, hogy a kialakult mikrobiális kötődés reverzibilis, ami a törzstől, a kezeléstől és a környezeti körülményektől függ (Haskard és mtsai., 2001). A biológiai lebontás oldaláról nézve, a folyamat nem minden esetben eredményez kevésbé toxikus vegyületeket, ezért kulcsfontosságú a bomlási végtermékek szerkezetének, mennyiségének és toxicitásának vizsgálata. A furofurán- vagy laktongyűrűk szerkezeti módosítása hozzájárulhat a mutagén aktivitás elvesztéséhez vagy a toxicitás csökkenéséhez (Kumar és mtsai., 2022). A lebontási folyamatban az extracelluláris enzimek közül elsősorban a lakkázok, peroxidázok, laktonázok és oxidoreduktázok vesznek részt (Kumar és mtsai., 2022). A mai napig azonban csak néhány enzimet azonosítottak és jellemeztek, melyek az aflatoxin-detoxifikáz (Liu és mtsai., 2001), F420 H₂-függő reduktáz (Taylor és mtsai., 2010) és Mn-peroxidáz (Wang és mtsai., 2011).

A növényi mikrobiom egyik feltételezett szerepe a növénypatogén szervezetekkel szembeni antagonizmus, amely összhangban van azzal a ténnyel, hogy a különböző környezetből izolált *Pseudomonas* fajokról (mandula terméséből (Palumbo és mtsai., 2006), a kukorica rizoszférából (Palumbo és mtsai., 2007), a rizsszemekből (Mannaa és Kim, 2017) és a búza termőföldből (Yao és mtsai., 2021)) bebizonyosodott, hogy hatékony biokontroll ágensek az *A. flavus* ellen, mert redukálják a gomba növekedését és/vagy gátolják a toxin bioszintézisét. A *P. fluorescens*, *P. putida* és *P. chlororaphis* (Palumbo és mtsai., 2006; Palumbo és mtsai., 2007) fajok izolátumai bizonyítottan 80-96%-kal képesek csökkenteni

az *A. flavus* növekedését, míg a *P. syringae* (Palumbo és mtsai., 2006) és a *P. protegens* (Mannaa és Kim, 2017) 50-65%-kal képesek csökkenteni a micélium növekedését. Egyes *Pseudomonas* fajok, mint például a *P. aeruginosa* (Sangare és mtsai., 2014; Xu és mtsai., 2023), a *P. anguilliseptica* (Adebo és mtsai., 2016), a *P. fluorescens* (Adebo és mtsai., 2016; Yang és mtsai., 2017), a *P. protegens* (Mannaa és Kim, 2017) és a *P. putida* (Samuel és mtsai., 2014), a szakirodalom alapján teljesen vagy részben képesek az AFB1 lebontására. Singh és Mehta, 2022, kutatásai alapján a *P. putida* által termelt AFB1 lebontásáért felelős enzim különös módon egy lipáz. Yao és munkatársai az AFB1 nem-enzimátikus, *P. geniculata* általi átalakításáról számoltak be, valamint, hogy a növekedés során keletkező bakteriális dimetilhidrazin képes a toxin laktongyűrűjének felnyitására (Singh és mtsai., 2022; Yao és mtsai., 2021).

Kiterjedt erőfeszítéseket tettek a különböző *Pseudomonas* fajok és az *A. flavus* közötti antagonizmus tanulmányozására, ami számos potenciális biokontroll *Pseudomonas* törzs azonosítását és olyan különböző mechanizmusok felfedezését eredményezte, amelyek révén a *Pseudomonas* fajok képesek a gombák növekedését és/vagy toxintermelését szabályozni.

Az *A. flavus* elleni fenntartható biológiai védekezés kifejlesztése érdekében olyan biokontroll törzs(ek) alkalmazására lenne szükség, amely az éghajlati viszonyok széles skáláját, a talaj összetételének nagy változatosságát és az alkalmazás helyén lévő változatos mikrobiális ökoszisztémák mellett is fennmarad. Ezért jelenleg is szükség van újabb és újabb potenciális biokontroll izolátumok azonosítása, amelyekkel önmagukban, vagy más biokontroll törzsekkel együtt alkalmazva az önfenntartó biológiai védekezés megvalósítható. Amennyiben nem bizonyul önfenntartónak a kidolgozott biokontroll megközelítés, érdemes a biokontroll mechanizmusának feltárásával a bioaktív hatóanyag azonosítását és megtermeltetését követően a hatóanyag alkalmazását mérlegelni.

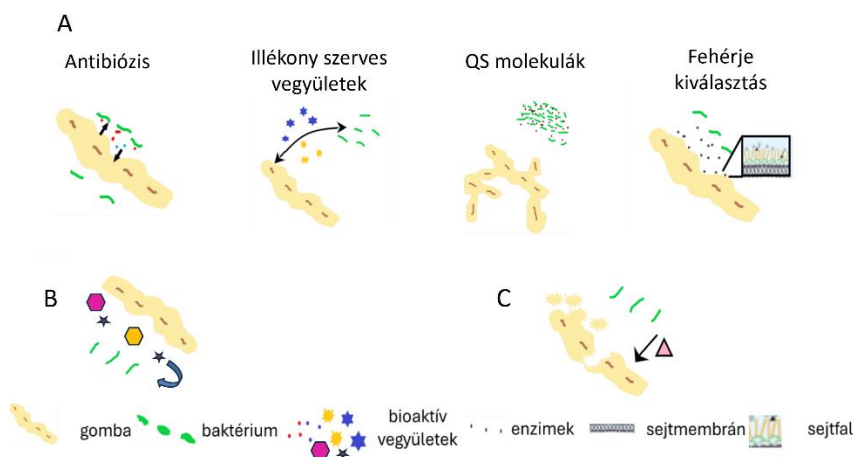
3.3. Biokontroll mikroorganizmusok a növényvédelemben

A növények, a talaj és a benne élő mikroorganizmusok egy egymással kölcsönható rendkívül összetett rendszert alkotnak. A növények kapcsolatot alakítanak ki különböző, számukra előnyös rizoszféra-mikroorganizmusokkal (például baktériumokkal, gombákkal, algákkal), amelyek hozzájárulnak a növény környezeti stresszorokkal és betegségekkel szembeni ellenállóképességéhez (Nunes és mtsai., 2001; Bonaterra és mtsai., 2022). A rizoszférában jelen lévő gombák (például a *Trichoderma* sp.) és baktériumok (*Pseudomonas*

sp., *Bacillus* sp. és *Streptomyces* sp.), kulcsszerepet játszanak a biológiai védekezésben azáltal, hogy más mikrobák növekedését antagonizálják (Calderón és mtsai., 2013; Bonaterra és mtsai., 2022). A fitopatogén organizmusokkal szemben különböző mechanizmusokat alkalmazhatnak a biokontroll mikroorganizmusok akár egyetlen, akár több mechanizmus kombinálásával (Rauscher és mtsai., 1997; Lahlali és mtsai., 2022).

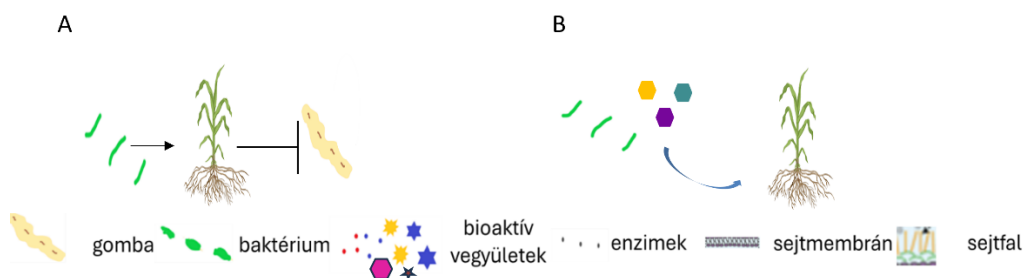
3.4. A biokontroll mikroorganizmusok hatásmechanizmusai

A biokontroll mechanizmusokat két fő csoportra oszthatjuk, melyek a közvetlen és közvetett kölcsönhatások. A közvetlen kölcsönhatások során (**1. ábra**) a biokontroll ágensek közvetlenül gátolják a kórokozó mikroorganizmusokat antibiotízis, parazitizmus, virulencia csökkenés és versengés révén.



1. ábra A biokontroll mikroorganizmusok közvetlen hatásmechanizmusai. Az antagonista kölcsönhatás (**A**) során a biokontroll-ágensek (BCA-k) közvetlen kapcsolatba lépnek a kórokozó mikroorganizmussal antibiotikumok, illékony szerves vegyületek, quorum sensing molekulák (QS) és fehérjekiválasztás révén. A BCA-k kompetitív kizárás (**B**) révén csökkentik a patogén növekedését. A BCA parazitaként (**C**) is viselkedhet a kórokozóval szemben (BioRender.com segítségével készült).

Ezzel szemben a közvetett kölcsönhatások során (**2. ábra**) a biokontroll-ágensek (BCA-k) a növények védekezési reakcióit serkentik, például indukálják a szisztémás rezisztenciát, valamint a növény növekedését segíthetik, továbbá javíthatják a tápanyagellátottságot. Mindkét védekezési mód célja a kórokozók elleni védelem és a növények egészségének fenntartása.



2. ábra A biokontroll mikroorganizmusok közvetett hatásmechanizmusai. A BCA a szisztémás rezisztencia kiváltásával **(A)** erősíti a gazdanövény védekezési mechanizmusait. A BCA a növény növekedését serkenti **(B)** ezzel növeli a növény ellenállóképességét és fitneszt (BioRender.com segítségével készült).

3.4.1. A közvetlen kölcsönhatások jellemzése

3.4.1.1. Antagonizmus

A BCA-k közvetlen kölcsönhatásba léphetnek a kórokozó mikroorganizmusokkal antimikrobiális vegyületek termelésén keresztül, amelyek csökkentik a patogének növekedését vagy metabolikus aktivitását. Az ilyen bioaktív metabolitok közé tartoznak az antibiotikumok, a mikrobiális illékony vegyületek, a lipopeptidek és a bioszurfaktánsok. Mindemellett bizonyos mikrobák sejtfalbontó enzimek, mint például kitinázok, β -1,3-glükánázok, proteázok és cellulázok előállítására is képesek, amelyek a másodlagos metabolitokkal együttműködve hatékony gombaellenes hatást fejtenek ki. A *Bacillus*, *Serratia* és *Trichoderma* fajok hatékony biokontroll törzsként való alkalmazása elsősorban kitinázokat termelő képességükre épít (Liu és mtsai., 2007).

Az antibiotikumok sokrétű hatásmechanizmussal rendelkező másodlagos metabolitok, melyek különböző módon fejtik ki hatásukat az érzékeny szervezetre. Hatásuk például a sejtfalszintézis gátlásában nyilvánulhat meg, ahogyan az az antibakteriális hatású penicillin esetében is történik (Ghooi és Thatte, 1995), vagy genetikai módosításokon keresztül, mint a fenazin-1-karboxamid esetén (Chen és mtsai., 2018). Sok antibiotikum kettős hatást mutathat. Például a *Pseudomonas* fajok által termelt fenazinok koncentrációtól függően gátolhatják vagy akár indukálhatják az *Aspergillus fumigatus* sporulációját (Zheng és mtsai., 2015). Az antibiotikumok által kialakított kölcsönhatások kétirányú reakciókat is előidézhetnek a mikroorganizmusok között. Például a növénypatogén *Ralstonia solanacearum* által termelt ralsolamicin stimulálja a növénypatogén gomba, a *Fusarium fujikuroi* bikaverin-termelését, amely antibakteriális hatást fejt ki az antibiotikumot termelő

baktérium ellen (Spraker és mtsai., 2018). A *Pantoea agglomerans* által termelt herbikolin A, egy CLP-típusú antibiotikum, mely a *Fusarium graminearum* sejtfalában található ergosterollal és szterollipidekben gazdag gombamembránokkal lép kapcsolatba, megbontva azok integritását (Xu és mtsai., 2022).

Nagy számú, kis molekulatömegű (<300 Da) illékony szerves vegyületek (VOC, Volatile Organic Compounds) termelésére a baktériumok, gombák, élesztők és növények egyaránt képesek, termelésük nem-esszenciális az őket termelő szervezet számára. Általában összetett keverékként fordulnak elő, amelyeket négy fő anyagcsereútvonal hoz létre, melyek a sikimát/fenilalanin, mevalonsav, metil-eritritol-foszfát és a lipoxigenáz útvonalak (Kaddes és mtsai., 2019; Dudareva és mtsai., 2013).

Az illékony vegyületek kis és nagy távolságokban is képesek hatásukat kifejteni, mivel könnyen diffundálnak a vízzel és gázzal teli pórusokon vagy szöveteken keresztül. A molekulák funkciós csoportjai gyakran hasonlóságokat mutatnak, mind a gombák, mind a baktériumok esetében. Továbbá mindkét organizmus képes alkéneket, alkoholokat, ketonokat és észtereket termelni, de a baktériumok képesek terpéneket, benzenoidokat, pirazinféléket és szerves savakat is előállítani (Piechulla és mtsai., 2014).

Az illékony komponensek kommunikációs mediátorként szolgálnak a mikroorganizmusok közötti pozitív kölcsönhatások vagy kompetíció során (Effmert és mtsai., 2012). Hatásuk nagyon sokrétű lehet, a baktériumok által termelt illékony szerves vegyületek például képesek gátolni a gombaspórák csírázását és a micélium növekedését (például metil-vinil-ke-ton) (Herrington és mtsai., 1987), továbbá módosíthatják enzimaktivitásukat, morfológiájukat (Chaurasia és mtsai., 2005), és csökkenthetik toxintermelésüket (például dimetil-diszulfid és metil-izovaleriánsav) (Gong és mtsai., 2019). Az élesztőgombák közül a *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* és *Hanseniaspora uvarum* által termelt VOC meggátolta a kávéban az *Aspergillus ochraceus* növekedését és ochratoxin termelését (Zhao és mtsai., 2022). A *Bacillus velezensis* alkalmazása nagymértékben csökkentette a *Verticillium dahliae* előfordulását paradicsom növényeken (Zhao és mtsai., 2022).

A gombák által előállított illékony szerves vegyületek képesek a baktériumok mozgását, valamint a biokontrollért felelős gének kifejeződését gátolni (Lutz és mtsai., 2004; Schmidt és mtsai., 2017). Az antibiotikumokhoz hasonlóan, egyes illékony szerves vegyületek kétirányú kölcsönhatásokhoz vezethetnek, például a növénypatogén *Ralstonia solanacearum* által termelt illékony szerves vegyületek hatására az *A. flavus* aflatoxin termelése növekedett, konídium képződése viszont visszaszorult. A gomba által termelt

illékony vegyületek viszont gátolták a *R. solanacearum* növekedését és melanin termelését, miközben elősegítette poliszacharid termelését (Spraker és mtsai., 2014).

A kereskedelmi forgalomban kapható, mezőgazdaságban használható VOC szerek száma alacsony, mivel használatuk során számos nehézség léphet fel. Az *in vitro* kísérletek során jónak vélt szereket a biotikus és abiotikus tényezők módosíthatják a nyílt terepen való alkalmazásuk során (Raio és mtsai., 2024). Az illékony vegyületek instabilak, ezért könnyen kölcsönhatásba léphetnek reaktív vegyületekkel (nitrogén-oxidok, OH-gyökök, ózon), továbbá kevésbé állnak ellen biodegradációnak, ezért hatásuk csökkenhet a célszervezettel szemben (Razo-Belman és mtsai., 2023). Fontos megjegyezni, hogy az emberekre nézve citotoxikus hatással bírhatnak, illetve csökkenthetik a növényi magok csírázását, valamint egyes patogén kiirtásával más patogének vagy kompetítoraik elterjedhetnek (Josselin és mtsai., 2022). A mezőgazdasági felhasználáson túl, a VOC-ok a klinikumban alkalmazhatók humánpatogén mikroorganizmusok azonosítására, azonban további kutatások szükségesek a megfelelő standardok előállítására (Raio és mtsai., 2024).

A quorum sensing (QS) során, az egy fajba tartozó sejtek között kémiai jelemolekuláik segítségével kommunikáció jön létre, és ahhoz, hogy a túlélés érdekében szabályozzák saját populációjukat, valamint hogy más szervezetekkel szemben összehangolt választ adjanak, ezért kollektív viselkedést alakítanak ki (Mukherjee és Bassler, 2019). Először a baktériumokkal hozták összefüggésbe azt a jelenséget, miszerint a QS molekulák felhalmozódásával saját populációjuk sűrűségét érzékelik a mikrobák, és ez a gombaközösségek esetében sincs másként. A QS vegyületek a biofilm képződésén túl, a gombák morfogenezisében, csírázásában, apoptózisában és patogenitásában játszanak szerepet (Wongsuk és mtsai., 2016). Továbbá, a gombák képesek a bakteriális QS jelemolekulák értelmezésére és lebontására egyaránt. A BCA-k képesek beavatkozni ebbe a rendszerbe úgy, hogy a fertőzés iniciálásához szükséges jelemolekulák szintézisét gátolják, vagy olyan enzimeket termelnek (laktonáz, pektináz, kitináz), amelyek lebontják a QS jelemolekulákat és ezzel csökkentik a kórokozók virulenciáját és a növényi kórfolyamatok kialakulását (Usta és mtsai., 2013; Lahlali és mtsai., 2022). Például a laktonázt termelő *Phialocephala fortinii*, a rizoszférában képes lebontani a körülötte élő baktériumok kommunikációját segítő N-acil-homoszerin lakton QS vegyületet (Uroz és Heinonsalo, 2008). A gomba által kibocsátott QS-molekulák a baktériumok viselkedésére is hatással lehetnek. Szakirodalmi adatok alapján, például a tirozol termelésre képes *Candida* fajok gátolják a *Pseudomonas aeruginosa* virulenciafaktor termelését (Abdel-Rhman és mtsai., 2015).

3.4.1.2. Parazitizmus

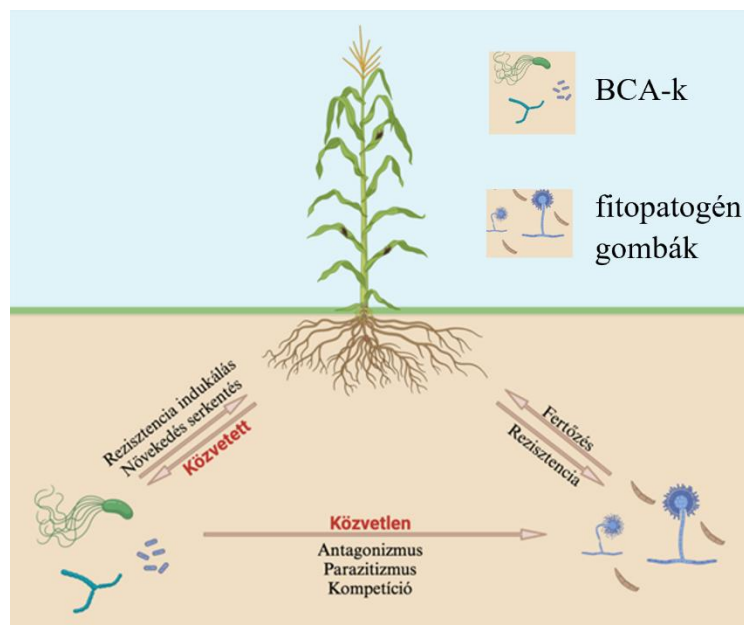
A BCA organizmusok parazita életmódot is folytathatnak, amely két fő stratégiában nyilvánulhat meg: nekrotróf parazitizmus esetén a kórokozó fertőzése előtt vagy közvetlenül utána elpusztítja a gazdasejteket, majd a felszabaduló tápanyagokat hasznosítja (Mendes és mtsai., 2011), míg biotróf parazitizmus során inkább az élő gazdaszervezetet részesíti előnyben fejlődéséhez, szemben a már elpusztult szervezetekkel (Berg és mtsai., 2014).

3.4.1.3. Kompetíció

A BCA organizmus versenghet a patogénekkal, így a kompetitív kizárás révén csökkentheti azok növekedését és infekciós nyomását (Lahlali és mtsai., 2022). A kompetitív folyamatok különösen a mikrotápanyagok, például a vas iránti versenyben figyelhetők meg (Bonaterra és mtsai., 2022).

3.4.2. Közvetett kölcsönhatások

Egy védekezési válasz kiváltásával vagy a növényi növekedés indukálásával a BCA organizmusok közvetett (**3. ábra**) módon is képesek védekezni a fitopatogénekkal szemben (Rauscher és mtsai., 1997; Lahlali és mtsai., 2022). A szisztémás rezisztencia kiváltásával a BCA organizmusok erősíthetik a gazdanövény védekezési mechanizmusait, elősegítve a strukturális akadályok felhalmozódását, valamint számos biokémiai és molekuláris védekezési válasz kialakulását. A gazdaszervezet számára mindezek számos kórokozóval szemben védelmet nyújtanak. A BCA organizmusok hozzájárulhatnak a növény növekedésének indukálásához, valamint ásványi anyag- és vízfelvételének hatékonyságához, illetve növekedésserkentő hormonok termelésével javíthatják a növény általános ellenálló képességét és fitneszt (Lahlali és mtsai., 2022).



3. ábra A biokontroll ágensek közvetlen és közvetett kölcsönhatásai (BioRender.com segítségével Tari Kitti készítette).

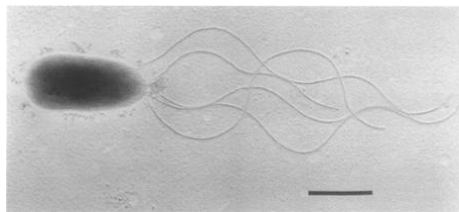
A rizoszférában előforduló baktériumok közül a *Bacillus*, a *Streptomyces* és a *Pseudomonas* nemzetségek tagjai hatékony BCA szervezeteknek bizonyultak a gombás betegségek elleni védekezésben. Ezen baktériumok közül számos fajt már kereskedelmi termékként is bejegyezték és forgalmaznak biokontroll tulajdonságuk miatt. Az Európai Unióban jelenleg 13 baktériumalapú antimikrobiális biológiai növényvédőszer található a nyilvántartásban, azonban ennek ellenére a biokontroll mikroorganizmusok mezőgazdasági alkalmazása még mindig korlátozott. Ennek fő oka, hogy változékonnyal hatékonyan rendelkeznek, továbbá piaci hozzáférhetőségük is korlátozott, ezért a termelők körében is bizonytalanság tapasztalható az ilyen típusú termékek használatával kapcsolatban.

3.5. A *Pseudomonas* nemzetség jellemzése

A *Pseudomonas* nemzetség a *Pseudomonadaceae* család része, amely a Genome Taxonomy Database (GTDB) szerint hét nemzetséget foglal magába: *Azomonas*, *Azotobacter*, *Entomomonas*, *Oblitimonas*, *Pseudomonas*, *Thiopseudomonas* és *Ventosimonas* (https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f__Pseudomonadaceae, accessed on 10 July 2021) (Girard és mtsai., 2021).

Az irántuk való nagymértékű érdeklődés oka, hogy kiváló alkalmazkodóképességüknek köszönhetően a környezetben széles körben elterjedtek, továbbá kiterjedt fenotípusos tulajdonságokkal (ideértve a másodlagos metabolit termelő képességet) rendelkeznek (Saati-Santamaría és mtsai., 2021; Tchagang és mtsai., 2018). A

Pseudomonas nemzetségre különös diverzitás jellemző, mivel jelenleg több mint 250 fajuk ismert (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, Girard és mtsai., 2021) (<https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>, accessed on 10 August 2021), és ez a szám folyamatosan növekszik. A nemzetségről általánosan elmondható, hogy fajai nem képeznek spórát, aerob Gram-negatív baktériumok, amelyek morfológiailag pálcá alakúak, és mozgásukat a polárisan elhelyezkedő flagellumok segítik (4. ábra). Jelentősebb fajcsoportjai a *P. fluorescens*, a *P. aeruginosa*, a *P. putida* és a *P. syringae* csoport. A legtöbb faj szaprofita, és főként vizekben és talajokban fordulnak elő. A *P. aeruginosa* fajcsoport például mindenhol jelen van, opportunista humán kórokozóként multirezisztens tulajdonságokkal rendelkezik, ezen felül növények és állatok kórokozójaként is számontartják (Höfte és Altier, 2010). Egyes szaprofita fajok különleges tulajdonságokkal rendelkeznek, ezért olyan biotechnológiai alkalmazásokban kapnak szerepet, mint például a növények növekedésének és egészségének fejlesztése, valamint a víz és talaj bioremediációja során is felhasználhatók (Höfte és Altier, 2010). A *P. aeruginosa* fajcsoport tagjai jelentős patogének, amelyek növények, állatok és emberek kórokozói.



4. ábra Egy *Pseudomonas* faj elektronmikroszkópos képe. A méretskála 1 μm -t jelöl. (Harwood és mtsai., 1989).

Különösen figyelemre méltó, hogy ezek az opportunista humán kórokozók gyakran multirezisztens tulajdonságokkal rendelkeznek. A *P. fluorescens* fajcsoport egyes fajai fitopatogének. (Höfte és Altier, 2010).

3.6. A *Pseudomonas* fajok által termelt bioaktív vegyületek

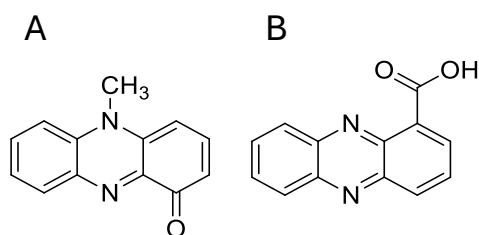
A *Pseudomonas* nemzetség fajai kiemelkedően fontos szerepet töltenek be a bioaktív tulajdonságokkal rendelkező másodlagos metabolitok termelésében. A *P. fluorescens* fajcsoport egyes tagjai által termelt bioaktív anyagok közé tartoznak a vas-kelátoló képességgel rendelkező vegyületek, a sziderofórok, továbbá az antibiotikumok (Tchagang és mtsai., 2018), a hidrogén-cianidok, lítikus exoenzimek (Thomashow és Weller, 1996), valamint a ciklikus lipopeptidek és a homoszerin laktonok (Raaijmakers és mtsai., 2006). Ezek a vegyületek nemcsak a változatos életmód fenntartásához járulnak hozzá, hanem

kulcsfontosságúak a rizoszférában lejátszódó kooperatív és kompetitív kölcsönhatások szempontjából is.

A sziderofórok termelődéséhez alacsony vastartalmú körülmények szükségesek, mivel ez serkenti ezeknek a molekuláknak a bioszintézisét (Höfte és Altier, 2010). Általánosságban elmondható, hogy a vas elsősorban háromértékű formában (Fe^{3+}) érhető el a mikroorganizmusok számára, néhány ritka kivételtől eltekintve (Schalk és mtsai., 2020). A probléma megoldására a talajbaktériumok olyan sziderofórokat termelnek, amelyek komplexképző tulajdonságukkal képesek a szervesetlen Fe^{3+} -t hozzáférhetővé tenni a sejtek számára (Schalk és mtsai., 2020). A fluoreszcens pioverdinek különösen jelentős sziderofórok, amelyek nemcsak a vas hozzáférhetőségét biztosítják, hanem szerepet játszanak a *Pseudomonas*-t antagonizáló mikrobákkal szembeni védekezőképességgel. A pioverdinek három alkotóelem építi fel, melyek a kromofór kinolin, egy peptidlánc és egy dikarbonsav (Schalk és mtsai., 2020). Ezek elsősorban a kromofór kinolinrészhez kapcsolódó dikarbonsav típusában különböznek egymástól (Kloepper és mtsai., 1980; Schalk és mtsai., 2020).

A *Pseudomonas* fajok egyéb másodlagos sziderofór termelésére is képesek, amelyek alacsonyabb affinitással kötődnek a Fe^{3+} -hoz. Ilyenek például a piocelin (PCH), a pszeudomonin, a korrugatinok, az ornikorugatinok, a yersiniabaktin és a tiokinolobaktin (Haas és mtsai., 2005; Schalk és mtsai., 2020). A PCH bár gyengén kötődik a vashoz, de Cu^{2+} , Zn^{2+} kelátor is, így feltételezhetően réz és cink hiányt is okozhat a kompetitív mikroorganizmusokban (Cuppels és mtsai., 1987; Haas és Défago, 2005). A *Pseudomonas* sp. NCIMB 10586 izolátum által termelt nem-riboszómális peptid-szintézissel (NRPS) keletkezett sziderofór, a mupirocelin (más néven mupicorin) képes gátolni a *Globisporangium ultimum* gyökérrothadást okozó növénypatogént (Grosse és mtsai., 2023). Továbbá a poliketid típusú mupicorint (pszeudomon savak A-D keveréke) (Khoshnood és mtsai., 2019), például bőrfertőzések kezelésére széles körben használják, valamint hatékonyan alkalmazzák *Staphylococcus*, *Streptococcus* és *Neisseria* fertőzésekkel szemben (Conly és mtsai., 2002; Cern és mtsai., 2018).

Annak érdekében, hogy megvédjék élőhelyüket a mikrobiális vetélytársaktól, a *Pseudomonas* fajok képesek különböző antibiotikumokat termelni.



5. **ábra** A piocianin (**A**) és a fenazin-1-karbonsav (**B**) szerkezeti képlete.

Annak ellenére, hogy *Pseudomonas* fajok több mint ötven különböző antibiotikum előállítására képesek, a mai napig csak kettőt használnak a kereskedelmi gyártásban, melyek a piocianin és a pirrolnitrin (Leisinger és mtsai., 1979). Antifungális hatással rendelkezik több *Pseudomonas* faj által termelt PRN (3-kloro-4-(2-nitro-3-klorofenil)-pirol), ami hatékony olyan gombapatogénekkal szemben, mint például a *Botrytis cinerea*, *R. solani* (Chernin és mtsai., 1996). A gombák által termelt komplex szerkezetű antibiotikumokkal összehasonlítva, a *Pseudomonas* baktériumok kevésbé változatos szerkezetű antibiotikumok előállítására képesek, melyek a hidroxifenazinok, a hidroxifenazin karbonsavak, az N-metil-fenazinok, a pirrolnitrin-típusú antibiotikumok, a piovegyületek, az alkil-kinolinok, valamint az N-hidroxi (di- és trihidroxi) kinolinok és különféle indolszármazékok (Leisinger és mtsai., 1979).

A *Pseudomonas* nemzetség tagjainak antimikrobiális hatásait elsősorban a fenazinok képződésének tulajdonítják. A fenazinok nitrogén-heterociklikus gyűrűkből álló élénk színű vegyületek. A növényi rizoszférában aktívan résztvevő fluoreszkáló *Pseudomonas* fajok bizonyos törzsei egyidejűleg több különböző fenazinszármazék termelésére képesek (Kumar és mtsai. 2005; Shahid és mtsai., 2021). A piocianin (5. **A ábra**), a fenazin-1-karbonsav (PCA) (5. **B ábra**), a fenazin-2-karboxamid (PCN), és a 2-hidroxi-fenazin a leggyakrabban megtalálható származékok (Shahid és mtsai., 2021). A fenazinok az elektron-transzportot gátolják és a ferripiocelin jelenlétében a hidroxigyökök képződését segítik elő, amelyek a lipideket és egyéb makromolekulákat károsítják (Haas és Défago, 2005). Figyelemre méltó módon a redukált fenazin-1-karboxiamid oldhatatlan $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -ból képes oldható Fe^{2+} -ionokat felszabadítani semleges pH-n, ami a vas mobilizációját és felvételét teszi lehetővé (Haas és Défago, 2005).

A *P. fluorescens* által termelt floroglucinolok a metabolitok egy fontos csoportja, melyek képesek szisztémás rezisztenciát (ISR) indukálni a növényekben, és a fitoalexinek és más

hasonló védelmi molekulák specifikus aktivátoraként szolgálnak (Dwivedi és Johri, 2003, Jayakumar és mtsai., 2011) A legismeretesebb a floroglucinolok közül a 2,4-diacetil-floroglucinol (DAPG), amely a gombák membránját képes károsítani. A pirrolnitrin egyes gombák légzési láncának inhibitoraként írták le (Tripathi és mtsai., 1969), míg a hidrogén-cianidot (HCN) a fémtartalmú enzimek, főként a réztartalmú citokróm C inhibitoraként.

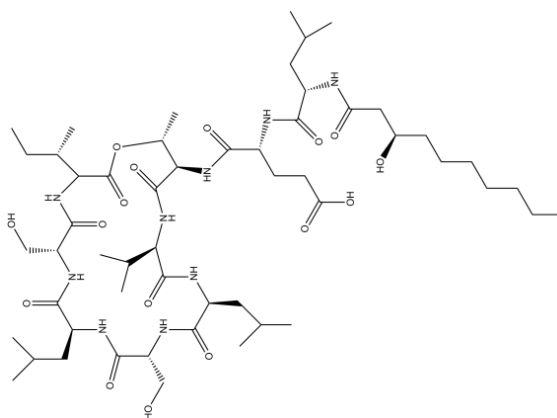
3.6.1. *Pseudomonas* fajok által termelt bioszurfaktánsok

A bioszurfaktánsok olyan felületaktív molekulák, amelyek minimálisra csökkenthetik a felületi és a felületek közötti feszültséget. A *Pseudomonas* fajok ciklikus lipopeptideket (Cyclic Lipopeptide, CLP) és ramnolipideket termelnek, mint bioszurfaktáns vegyületeket.

3.6.1.1. A ciklikus lipopeptidek

A *Pseudomonas* fajok által termelt ciklikus lipopeptidek (Ps-CLP) zsírsav-farokkal rendelkeznek, amely meghatározó szerepet tölt be a molekula biológiai aktivitásában (Geudens és mtsai., 2018; Raaijmakers és mtsai., 2010).

A Ps-CLP-ket kémiai hasonlóságuk alapján családokra vagy "csoportokra" osztották, amelyek általában az adott csoport prototípusáról kapták nevüket. Ilyen csoportok közé tartozik például a viszkozin (Groupé és mtsai., 1951) (**6. ábra**), az arfomid (Gross és mtsai., 2007; Ma és mtsai., 2016), az amfizin (Sorensen és mtsai., 2001), a sziringomicin (Segre és mtsai., 1989), a sziringopeptin (Ballio és mtsai., 1991), valamint a tolaasin csoport (Rainey és mtsai., 1991; Bassarello és mtsai., 2004). Az új ciklikus lipopeptidek felfedezése a mai napig tart, melyek vagy a már meglévő csoportokhoz kapcsolhatók (Geudens és mtsai., 2018; Raaijmakers és mtsai., 2010), vagy új csoportok alapjául szolgálnak.

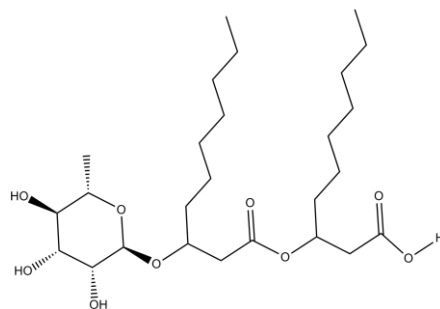


6. ábra A viszkozin szerkezeti képlete.

A CLP-k antimikrobiális és antiproliferatív (Girard és mtsai., 2021) tulajdonságokkal rendelkeznek, a sejtfal bioszintézis és sejtmembrán integritás gátlásán keresztül képes gátolni a baktériumok szaporodását, valamint beintegrálódva a plazmamembránokba képesek módosítani annak mikrodoméneken keresztüli fluiditását (Zhou és mtsai., 2021). A fluiditás módosulása a plazmamembrán szerkezetének átalakulásához vezet, ami depolarizációs változással járó ionszivargást vagy ionbeáramlást eredményez, ami főleg a Gram-pozitív baktériumok esetében sejthalált idéz elő (Raaijmakers és mtsai., 2006; Zhou és mtsai., 2021).

3.6.1.2. A ramnolipidek

A bioszurfaktáns tulajdonságú ramnolipideket (RL) egy ramnóz cukor és β -hidroxilezett zsírsavláncok alkotják. A **7. ábrán** a monoramnolipid szerkezeti képlete látható.

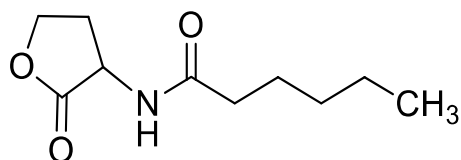


7. ábra A monoramnolipid szerkezeti képlete.

A *P. chlororaphis* és *P. putida* szintén képes ramnolipidek termelésére, ezek a törzsek lényegesen alacsonyabb termelési szinteket mutatnak, mint a *P. aeruginosa* (Soberón-Chávez és mtsai., 2021).

3.6.2. A homoszerin-laktonok

A sejtsűrűség érzékelésére a Gram-negatív baktériumok az N-acilezett homoszerin lakton (AHL) QS vegyületeket alkalmazzák (Haas és mtsai., 2005) (**8. ábra**), ami egy homoszerin laktongyűrűből (HSL) és egy változó hosszúságú (3-18 C-atom) alkil-láncból áll (Li és mtsai., 2012). A homoszerin laktonok nemcsak az oldalláncok hosszában különbözhetnek, hanem telítettségükben is, valamint a C3 pozícióban lévő oxo- és hidroxilcsoportok meglétében is eltérhetnek.



8. ábra N-hexanoil-homoszerin lakton szerkezeti képlete.

A 3.6. alfejezetben tárgyalt, a *Pseudomonas* fajok által termelt ismert bioaktív vegyületeket az **1. táblázat**-ban foglaltuk össze.

1. táblázat *Pseudomonas* eredetű ismert bioaktív vegyületek és hatásuk.

Termelő organizmus	Vegyület	Hatás	Célorganizmus	Hivatkozás
<i>P. chlororaphis</i> <i>P. aurantiaca</i>	fenazin-1-karbonsav	erős gátlás	<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	Hu és mtsai., 2014
<i>P. fluorescens</i> EPS894	fenazin-1-karboxiamid	erős gátlás	<i>Phytophthora</i> <i>cactorum</i>	Agustí és mtsai., 2011
<i>Pseudomonas</i> sp.	2,4-diacetil-floroglükínol	biológiai védekezés		Bonattera és mtsai., 2022
<i>P. chlororaphis</i> PCL 1606	2-hexil-5-propil- rezorcinol	gombaellenes és antibakteriális hatás	<i>Rosellinia necatrix</i>	Calderón és mtsai., 2013
<i>P. chlororaphis</i> G05	pirrolnitrin	fuzáriumos fűlvész ellen	<i>Fusarium</i>	Huang és mtsai., 2018
<i>P. protegens</i>	orfamidok	antimikrobiális hatás	<i>Pythium</i> <i>Phytophthora</i> <i>Rhizoctonia</i>	Ma és mtsai, 2016
<i>Pseudomonas</i> sp.	hidrolitikus enzimek	gombaellenes aktivitás	<i>Pythium</i> <i>aphanidermatum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Sindhu és mtsai., 2001
<i>P. fluorescens</i> PTA- CT2		ISR	<i>Plasmopara</i> <i>viticola</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Lakkis és mtsai., 2019
<i>P. fluorescens</i>	massetolid A	rezisztencia növelés	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	Tran és mtsai., 2007
<i>Pseudomonas</i> sp	fenazinok	ISR		Ma és mtsai., 2016
<i>P. protegens</i>	pioluteorin	antibiotikus	<i>Heterobasidion</i> sp.	Pellicciaro és mtsai., 2022
<i>P. fluorescens</i> JV 391_D17, JV 391_D10	OGI (<i>Orobanchae-</i> növekedésgátló)	bioherbicid	<i>Orobanchaceae</i>	Lurthy és mtsai., 2025

3.6.3. Illékony szerves vegyületek

A *P. fluorescens* ZX törzs által termelt illékony vegyületek (VOC) megakadályozták a citrusfélék romlását okozó *Penicillium italicum* micéliális növekedését, valamint a

konídiumokkal történő szaporodását citrusféléken (Wang és mtsai., 2021). Továbbá a szőlő romlását okozó *Botrytis cinerea* szürke penészgombával szemben csökkentették a micéliális növekedést, valamint a spórák csírázását (Jiang és mtsai., 2019).

A *P. aurantiaca* ST-TJ4 által termelt illékony vegyületek jelentős gátló hatást fejtenek ki a több mint 200 növényt (pl. gyapot, paradicsom, burgonya, napraforgó) fertőzni képes *Verticillium dahliae* talajban élő gombapatogén konídiumainak csírázására és a mikroszkleróciumok képződésére. Továbbá gátolják a melaninszintézissel kapcsolatos gének kifejeződését (Ni és mtsai., 2022). Két *Pseudomonas* sp. (BJa3 és MCal1) törzs 1-heptoxidekán és tridekán-2-on illékony vegyületeik révén képesek csökkenteni az *A. flavus* micéliális növekedését (Rabiço és mtsai., 2024).

A *P. stutzeri* YM6 törzs dimetil-triszulfid termelése révén a kukorica és földimogyoró tárolása során képes meggátolni az *A. flavus* növekedését és az aflatoxin termelődését (Gong és mtsai., 2022).

A hidrogén-cianid mérgező hatású másodlagos metabolit, ami antimikrobiális hatással rendelkező, számos rizobaktérium által termelt illékony vegyület. A *Pseudomonas* törzsekben a *hcnA*, *hcnB* és *hcnC* bioszintézis gének a HCN-szintáz alegységeit kódolják, amelyek funkcionális komplexet alkotnak, és felelősek a HCN bioszintézisének katalizálásáért. A rizoszférában található fluoreszcens *Pseudomonas* fajok antagonista hatást fejtenek ki a növények gyökerét támadó fitopatogén gombákkal és parazita fonálférgekkel szemben HCN termelésük révén (Schippers és mtsai., 1990). A *P. corrugata* CFBP 5454 és *P. mediterranea* CFBP 5447 törzsekben a gének jelenléte igazolt és a törzsek hidrogén-cianid termelésük révén gátolják a növénypatogén *B. cinerea* konídiumképzését (Strano és mtsai., 2017). A hatásmechanizmus hátterében a közvetlen gátlás áll, miszerint a HCN gátolja a légzési lánc terminális citokróm c-oxidáz enzimét, továbbá fémionokat tartalmazó enzimekhez kötődik (Knowles, 1976). Rijavec és munkatársai alapján a HCN nem mint biokontroll-agens releváns, hanem kelátképzéssel közvetetten növeli a talajban a foszfát hozzáférhetőségét (Rijavec és mtsai., 2016).

Összességében elmondható, hogy a *Pseudomonas* nemzetség egyes tagjai jó biokontroll és növekedésgátló tulajdonságokkal rendelkeznek. A gyors *in vitro* növekedésen túl, képesek a vetőmag és gyökérexudátumok gyors hasznosítására, továbbá sokféle másodlagos metabolit termelésére is (antibiotikumok, sziderofórok, illékony komponensek, hormonok, kitinolitikus enzimek, növény növekedést serkentő vegyületek). Más mikroorganizmusokkal szemben agresszívan lépnek fel, és könnyen adaptálódnak a

környezeti stresszhez, például metabolittermelésük és bioszintézis útvonalaik szabályozása révén (Weller és mtsai., 1988). Mivel nem képeznek spórákat (mint a *Bacillus* nemzetség egyes tagjai), ezért kereskedelmi forgalomba hozatalukat nehezíti nehéz formulázhatóságuk. Bizonyos *Pseudomonas* fajok antagonista aktivitással rendelkeznek a gombapatogénekkal szemben kitináz, β -1,3-glükánáz és celluláz termelésük révén.

3.6.4. A baktériumok által termelt zsírsavak

A baktériumokban több, mint 300 zsírsav és rokon vegyület található, melyek lehetnek telítettek, telítetlenek, lineárisak és elágazóak, valamint tartalmazhatnak hidroxil-, metil- vagy ciklopropán-csoportokat, így minden baktérium fajnak van egy saját, egyedi zsírsavprofilja, melyek úgymond ujjlenyomatként működnek. Az elágazó láncú zsírsavak a Gram-pozitív baktériumokban, míg az egyenes láncú zsírsavak a Gram-negatív baktériumokban gyakoribbak és jellemzőek. Mivel a Gram-negatív baktériumokban található lipopoliszacharidok hidroxil zsírsavak jelenlétét idézik elő, a 10:0 3OH, 12:0 3OH és a 14:0 3OH zsírsavak hiánya arra utal, hogy a baktérium Gram-pozitív. A *Pseudomonas* nemzetség törzseit vizsgálva a kezdeti analízisek során megállapították, hogy a zsírsavprofillal kapott azonosítás néha nincs összhangban a biokémiai kritériumokkal (Huynh és mtsai., 2022). Viszont a növekedési körülmények szabványosításával, mint a táptalaj összetétele, az inkubációs hőmérséklet és a sejtpopuláció fiziológiai életkora, a sejtes zsírsavprofilok reprodukálhatóvá váltak és az azonosítás pontosabbá vált (Huynh és mtsai., 2022). Ez tette lehetővé olyan automatizált rendszerek használatát, mint a Microbial Identification System (MIS; MIDI, Inc., Newark, DE, USA).

3.7. Metabolomikai vizsgálatok

A négy „omika” közül a genomika a gének, a transzkriptomika az mRNS, a proteomika a fehérjék, a metabolomika pedig egy biológiai rendszer kis molekuláinak (<1800 Da) (Fiehn és mtsai., 2002) szerkezeti és funkcionális elemzésével foglalkozik. Egy adott szervezetben megtalálható metabolitok összességét metabolomnak nevezzük. A metabolitokat kémiai tulajdonságaik alapján csoportosíthatjuk, mely alapján lehetnek polárisak, apolárisak és illékony vegyületek, az intracelluláris és extracelluláris térben egyaránt megtalálhatók (Horak és mtsai., 2019). Az elsődleges metabolitok gyorsan cserélődnek, ezért mennyiségük kevesebb a másodlagos metabolitokéhoz képest (Horak és

mtsai., 2019). Nélkülözhetetlenek a túléléshez, növekedéshez, fejlődéshez és szaporodáshoz. Ezzel szemben a másodlagos metabolitok a stresszre adott válaszhoz és a növekedési sebességhez kapcsolatosan jelennek meg (Pinu és mtsai., 2017).

A két anyagcsere útvonal annak ellenére, hogy jelentősen eltérnek egymástól, mégis összefüggnek, mivel az elsődleges anyagcsere szolgáltatja a másodlagos metabolizmushoz szükséges energiát és prekursor molekulákat (Horak és mtsai., 2019). A másodlagos metabolizmus a bioaktív molekulák gazdag forrásának tekinthető (Barkal és mtsai., 2016).

A metabolomikai vizsgálatokat a vizsgálat céljától függően két csoportba sorolhatjuk. A metabolomikai profilvizsgálat (metabolite profile) során egy előre meghatározott metabolitcsoport vizsgálata történik, a metabolikus ujjlenyomatkészítés (metabolite fingerprinting) során pedig különböző állapotú vagy eredetű biológiai minták különbségeinek feltárása zajlik. A vizsgálatok lehetnek célzottak, mely adott vegyületek vagy vegyületcsaládok mennyiségi analízisét jelentik, valamint nem célzottak, melyek elsődlegesen minőségi információval szolgálnak, és csakis relatív mennyiségi meghatározásra alkalmazhatók.

Mivel a metabolitokat fizikai-kémiai sokféleség jellemzi, ezért a jelenleg elérhető analitikai mérés technikai rendszerek nem alkalmasak arra, hogy a teljes metabolomról önállóan átfogó képet alkossanak. A különböző módszereket kombinálva azonban lehetővé válik a teljes metabolom átfogó elemzése (Jeyarajah és mtsai., 2006; Wishart és mtsai., 2008). Két spektroszkópai vizsgálati módszer terjedt el, melyek az NMR spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance, Mágneses Magrezonancia) és a gázkromatográfiával vagy folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (Wishart és mtsai., 2008). Az NMR spektroszkópia előnye a nagyfokú ismételhetőség, a metabolitok könnyű azonosítása, valamint a roncsolásmentes analízis. A tömegspektrometria alkalmazása során jellemző a kiemelkedő szelektivitásra való képesség, valamint a nagyfokú érzékenység.

Az elsődleges metabolizmusban résztvevő illékony, illetve illékonyra tehető vegyületek (Gao és Xu, 2015; Peng és mtsai., 2015) gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával vizsgálhatók (Gas-Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS). Az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás a metabolomikai vizsgálatok során a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS), ami a termikusan labilis, de nem illékony vegyületek elemzésére alkalmas. A különböző, egymást kiegészítő ionizációs technikák lehetővé teszik, hogy a metabolitok széles polaritástartományban vizsgálhatók legyenek,

mint például, az elektroporlasztásos ionizáció (Electrospray, ESI), az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) és az atmoszférikus nyomású fotoionizáció (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Mivel a vegyületek sokféle kémiai tulajdonsággal rendelkeznek, ezért a metabolom teljes körű lefedése érdekében a minták elemzése pozitív és negatív ionizációs módban egyaránt szükséges. A metabolomikai profilvizsgálatok során elsősorban hármas kvadrupól tömegspektrométerek kerülnek alkalmazásra, azonban a metabolikus ujjlenyomatok készítéséhez elengedhetetlen a nagy felbontás és tömegpontosság. Ezt olyan műszerek biztosítják, mint a repülési idő (Time of Flight, TOF) tömegspektrométerek, a Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia (FT-ICR) és az orbitális ioncsapda (Orbitrap) analizátorok. Nem elhanyagolható a tény, hogy a különböző eszközökkel kapott tömegspektrumok a különböző ionforrás-kialakítások és analizátorok miatt eltérhetnek, ezért a spektrumegyezésen alapuló metabolitazonosítás bizonyos kihívásokkal járhat.

A metabolomikai vizsgálatok fő lépései a következők: a kísérlet tervezése, mintavétel, mintaelőkészítés (metabolitok extrakciója), minták analízise, adatok elemzése és értelmezése. A folyamat során a többlépcsős adatelemzés a legidőigényesebb, amelyet a műszergyártók által kifejlesztett programok, vagy szabad hozzáférésű, készülékfüggetlen alkalmazások segítségével végezhetünk el. Az adatelemzés első lépése a szűrés, amely a zajokat és a szennyeződésekét távolítja el. Ezt követi az alapvonal-eltolódás korrekciója. A következő lépés a metabolitokat reprezentáló prekursor ionok és az azonosítást segítő fragmentáció (MS/MS mérés) által keletkező ionok azonosítása. Majd a retenciós idő eltolódásának korrekciója, valamint a metabolithoz tartozó prekursor ionok csoportosítása következik. Mindezek biztosítják, hogy több minta esetén ugyanazt az iont hasonlítsuk össze. Legutolsó lépésként, az adatelemzés statisztikai lépései következnek, amelyek célja azoknak a metabolitoknak a kimutatása, amelyek intenzitás szintje szignifikánsan változik a különböző biológiai csoportok között (Zhou és mtsai., 2012).

A metabolomikai vizsgálatok legnagyobb kihívása pedig kétségkívül a metabolitok azonosítása, hiszen nem célzott metabolomika esetén akár több ezer metabolitot is detektálhatunk és a biológiai vonatkozású vegyületek száma közel 2 millió is lehet (Cui és mtsai., 2008). A rendelkezésre álló adatbázisok az egész metabolitkészlet kis részét fedik le, általában a metabolitok közel 70%-a ismeretlen marad (Zhou és mtsai., 2012).

4. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy új *Pseudomonas* törzseket izoláljunk és fajszinten azonosítsunk kukorica rizoszférából, majd konfrontációs kísérleteket követő metabolom elemzéssel feltárjuk az izolált *Pseudomonas* törzsek és az *A. flavus* közötti kölcsönhatások jellegét, és a konfrontálódó partnerekben keletkezett válaszreakciókat, különös tekintettel az AFB1 toxin termelésének modulálására. A konfrontációs kísérleteket mind szilárd- (külön volatilis vegyületekre és külön oldható vegyületekre fókuszáló), mind pedig folyadékfázisú konfrontációs kísérletekben is meg kívántuk vizsgálni. A metabolom vizsgálatokhoz GC-MS és HPLC-HRMS mérésekkel terveztük a metabolitok detektálását, majd összehasonlító elemzésekkel kívántuk azonosítani a konfrontációban keletkező metabolitokat. Úgy gondoltuk, hogy a konfrontációkban megjelenő metabolitok között találhatunk értékes, akár eddig még nem azonosított bioaktív vegyületeket is, melyek az *A. flavus* elleni biológiai védekezésben hasznosíthatóak lehetnek a szántóföldön, vagy a termények raktározásakor. Célkitűzésünkkel reméltük, hogy a konfrontációkor fellépő metabolikus válaszreakciók majd megvilágíthatják a konfrontáció kimenetelét meghatározó molekuláris mechanizmust is, melyek alapkutatás szinten bővíthetik ismereteinket a mikrobiális interakciók területén.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Anyagok

5.1.1. Felhasznált anyagok

A minták extrakciójához és a HPLC-HRMS mérésekhez LC-MS minőségű vizet, metanolt, acetonitrilt, kloroformot, hangyasavat és ammónium-formiátot használtunk, melyek VWR Kft. termékek voltak. Belső standardként buszpiront és homovaníliásavat alkalmaztunk, melyek a Merck Kft-től kerültek beszerzésre. Az AFB1 standard a Merck Kft-től került beszerzésre. A hidrogén-cianid mérés során alkalmazott reagensek: a Cu-etil-acetoacetát (S433454-50MG) és a 4,4'-metilénbisz(N,N- dimetilanilin) (M44451-5G) a Merck Kft. termékei voltak.

5.1.2. Felhasznált törzsek

A munkánk során felhasznált *Pseudomonas* törzsek listája a Mellékletek című fejezetben található (Mellékletek fejezet **M1. táblázat**), ezen kívül az alábbi baktériumokat használtuk: *P. aeruginosa* PaO1 (ATCC 15692) és *Bacillus subtilis* (SZMC 14624).

5.1.3. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

BBL™ Triptikáz™ szója agar (Becton Dickinson Company, USA)

A mikrobák -80 °C-on történő fagyasztásához és tárolásához szükséges tápoldat: YPD (élesztőkivonat-pepton-dextróz) tápoldat: 1 g/L élesztőkivonat, 1 g/L pepton, 1 g/L D-glükóz+ 42% (v/v) glicerol.

King B táptalaj: 1,5 g/L K₂HPO₄, 20 g/L proteóz pepton, 1,5 g MgSO₄*7H₂O, 20 ml/L 84%-os glicerol, 20 g/L agar.

King B tápoldat: 1,5 g/L K₂HPO₄, 20 g/L proteóz pepton, 1,5 g/L MgSO₄*7H₂O, 20 ml/L 84%-os glicerol.

LB (Luria-Bertani)-tápoldat: 10 g/L húspepton, 10 g/L NaCl, 5 g/L élesztőkivonat.

LB-táptalaj: 10 g/L húspepton, 10 g/L NaCl, 5 g/L élesztőkivonat, 20 g/L agar.

MM63 tápoldat: 13,61 g/L KH₂PO₄, 4,21 g/L KOH, 1,98g/L (NH₄)₂SO₄, 0,25 g/L MgSO₄*7H₂O, 0,0011 g/L FeSO₄*7 H₂O, 5 g/L glükóz*H₂O, 100 g/L NaCl, 20 g/L agar.

nutrient agar: 5 g/L húspepton, 3 g/L húskivonat, 20 g/L agar.

PDA: burgonya-dextróz tápoldat (VWR Kft.) + 20 g/L agar (Biolab Zrt., Magyarország).

PDB: burgonya-dextróz tápoldat (VWR Kft.).

Pseudomonas fajokra szelektív táptalaj: 10 ml/L glicerol, 5 g/L kazamínosav, 1 g/L NaHCO_3 , 1 g/L MgSO_4 , 2,3 g/L K_2HPO_4 , 1,2 g nátrium-lauril-szulfát, 20 g/L agar és 20 mg/L trimetoprim.

TSA (Triptikáz-szója agar) táptalaj (Biolab Zrt., Magyarország).

TSB (Triptikáz-szója) tápoldat (Biolab Zrt., Magyarország).

5.2. Módszerek

5.2.1. *Pseudomonas* törzsek izolálása és azonosítása

A *Pseudomonas* törzseket kukorica (*Zea mays*) rizoszférából származó földmintákból izoláltuk, melyeket 2021 tavaszán Madarásról (46°05'02.5"N 19°15'46.5"E) gyűjtöttünk be. Az izoláláshoz *Pseudomonas* szelektív táptalajt használtunk (Gould és mtsai., 1985), majd a törzseket 28 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A törzsekből LB táptalajon tisztatenyészeteket készítettünk. A törzseket az SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén található Szegedi Mikrobiológiai Gyűjteménybe (SZMC) deponáltuk (a lista a Mellékletek fejezet **M1. táblázatában** található) a fagyasztáshoz szükséges tápoldatban (YPD+50% glicerol), majd hosszú távon -80 °C hőmérsékleten tároltuk.

A *Pseudomonas* törzsek fajsztípus azonosításához a genomi DNS kivonását E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA) segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A 16S rRNS, *rpoD* és *rpoB* gének amplifikálásához szükséges primereket a **2. táblázat** tartalmazza. A PCR elegy összetétele a következő volt (20 µl végtérfogatra számolva) 2 µl 10x DreamTaq-puffer, 2 µl 2 mM dNTP mix, 4-4 µl primerpár (1 µM), 7 µl steril bidesztillált víz, 0,1 µl 5 U/ µl DreamTaq DNS-polimeráz (Thermo Fisher Scientific), 0,1 µl (10 µM) genomi DNS-templát. A felszaporítást Dopper Gradient 2x 48 lyukú PCR (VWR Kft.) készülékkel hajtottuk végre a **2. táblázatban** feltüntetett beállításokkal.

2. táblázat A kísérletek során alkalmazott primerek és PCR paraméterek.

Felszaporítandó szakasz neve	Primer neve	Primer bázissorendje	PCR paraméterek
16S rRNS gén	Eub 8F	5' – cctacgggaggcagcag – 3'	94 °C 3 p
16S rRNS gén	534R	5' –attaccgcggtgctggca– 3'	94 °C 1 p
			55 °C 1 p
			72 °C 1 p
			72 °C 10 p
<i>rpoD</i> gén	PF1	5'–gcgcaatcgcgcaactccc–3'	94 °C 3 p
<i>rpoD</i> gén	PR1	5'–gacatgcgacggtgatgac–3'	94 °C 1 p
			55 °C 1 p
			72 °C 1 p
			72 °C 10 p
<i>rpoB</i> gén	LAPS	5'–tggccgagaaccagttccgcgt–3'	94 °C 1,5 p
			94 °C 0,6 p
			55 °C 0,3 p
<i>rpoB</i> gén	LAPS27	5'–cggcttcgtccagcttcttcag–3'	72 °C 1 p
			72 °C 5 p

A DNS-fragmentumok ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel történt. A DNS-mintákhoz mintafelvivő puffert (6x LD, puffer Thermo Fisher Scientific) adtunk, majd 20 percig futtattuk 90 V-os feszültségen. Az agaróz gél és a futtató puffer is TAE puffert (40 mM Tris-ecetsav (pH=7,6), 1 mM Na₂EDTA oldatban) tartalmazott. A fragmentumokat etídium-bromidos (0,5 µg/ml, Merck Kft.) festéssel tettük láthatóvá. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os létra DNS molekulasúly markert (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk. A gélek kiértékelését az UVP BioDoc-It™ System UV Transluminator (VWR Kft.) készülékkel végeztük.

A PCR termékeket NucleoSpin Gel and PCR purification Kit (Takara Bio USA, Inc.) segítségével tisztítottuk. A DNS vizsgálat során kapott szekvenciákat a Eurofins Genomics szekvenáló cég végezte.

A baktérium törzsek azonosítását a 16S rRNS, *rpoB* és *rpoD* (Pei és mtsai., 2010, Mulet és mtsai., 2009, Ait és mtsai., 2005) lókuszok részleges szekvenciáinak felszaporításával és szekvenciaanalízisével végeztük. A nukleotid szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisba deponáltuk OR571460-OR571469 és OR563981 azonosítószám alatt. A *Pseudomonadaceae* család referencia törzseinek 16S rRNS, *rpoB* és *rpoD* szekvenciáit az NCBI Datasets adatbázisban elérhető genomokból nyertük ki. Az adatbázist olyan törzsekkel is kibővítettük, melyek a leírásukat követően későbbi publikációkban új nevet kaptak vagy

összevonásra kerültek más fajokkal. Az adatsor összesen 495 fajt foglalt magába és közel teljesnek bizonyult mindhárom lókuszt tekintetében. A referencia-szekvenciákat és az általunk vizsgált törzsek részleges szekvenciáit a MAFFT program 7.49 verziójával (Katoh és mtsai., 2013), a G-INS-i iteratív finomítási stratégiát alkalmazva illesztettük. Az illesztéseket a FASconCAT-G program (Kück és mtsai., 2014) segítségével összefűztük, majd a génenként particionált adatsoron modelltesztelést hajtottunk végre az IQ-TREE program 2.0.7-es verziójának (Minh és mtsai., 2020) beépített modell-tesztelő szoftverével (Kalyaanamoorthy és mtsai., 2017). Megállapítottuk az egyes partíciókhoz leginkább illeszkedő evolúciós modellt, melynek során a keresést kiterjesztettük az összes DNS evolúciós modellre. A ráta heterogenitás tesztelése során a gamma- és a szabad rátájú eloszlást is teszteltük 6 kategória alkalmazásával.

Az egyes partíciókhoz legjobban illeszkedő evolúciós modellek alkalmazásával maximum likelihood elemzést végeztünk az IQ-TREE 2 segítségével. Az adatsorhoz leginkább illeszkedő filogram támogatottsági értékeit 5000 ismétlésben alkalmazott UFBoot (Hoang és mtsai., 2018) segítségével állapítottuk meg.

A referenciatörzs pontos taxonómiai helyzetének feltárása érdekében genomi DNS-t vontunk ki a Zymo Research Quick DNA Fungal/Bacterial Midiprep Kit segítségével a gyártó utasításait követve, majd a teljes genomot paired-end leolvasásokkal szekvenáltattuk Illumina MiSeq szekvenáló rendszerrel. A 150 bp hosszúságú paired-end nyers leolvasások minőségét FastQC program 0.12.1 verziójával ellenőriztük, majd az adaptereket és a gyenge minőségű bázisokat a Trimmomatic program 0.39 verziójával távolítottuk el (Bolger és mtsai., 2014). A szűrt leolvasások összerendezése és annotálása az NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) program segítségével készült.

A teljes genomban fellelhető bioszintetikus génklaszterek kimutatását az antiSMASH 7.1.0-es verziójának (Blin és mtsai., 2023) használatával végeztük, érzékeny keresési paraméterek alkalmazásával. A bioinformatikai elemzéseket Dr. Kocsubé Sándor (SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék) végezte.

5.2.2. A baktériumok előtenyésztése

A baktériumokat egy éjszakán át tenyésztettük LB tápoldatban, 130 rpm fordulatszámon és 28 °C hőmérsékleten, majd spektrofotométerrel (BMG Labtech) mértük az optikai denzitást és azt $OD_{600nm}=0,8$ értékre állítottuk be.

5.2.3. *Pseudomonas* másodlagos metabolitok vizsgálata különböző tápoldatokban

A baktériumokat az 5.2.2. pontban leírtak alapján készítettük elő. A különböző tápoldatok másodlagos metabolittermelésre gyakorolt hatásának összehasonlítása során az előtenyésztett baktériumokból 40 µl mennyiséget LB, King, PDB tápoldatokba mértük, majd 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon, három napon keresztül inkubáltuk.

A tenyészetek 5 ml térfogatát hangyasavval savanyítottuk pH=3 értékig, majd kétszer 4 ml HPLC tisztaságú etil-acetáttal extraháltuk a metabolitokat. Az egyesített felső fázisokat nitrogénáram alatt bepároltuk, majd 500 µl 2 ng/µl buszpiront és 10 ng/µl homovaníliásavat, mint belső standardot tartalmazó metanol:víz (8:2) elegyben visszaoldottuk és a HPLC-HRMS analízisig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

5.2.4. A baktériumok zsírsavprofil analízise

A zsírsavanalízishez a baktérium törzseket LB táptalajon tartottuk fenn, majd az analízishez BBL triptikáz szója tápközeghez adagolt Difco bakterológiai agaron három egymást követő napon átoltottuk és 28 °C-on inkubáltuk. A mintaelőkészítést megelőzően 24 ± 2 órával a protokollnak megfelelően a tisztatenyészet 3. kvadránsából oltottuk át a törzseket, majd további 24 ± 2 órán keresztül 28 °C hőmérsékleten inkubáltuk.

A minták előkészítése Sherlock TM Operating CAS Manual szerint történt. A baktériumok tiszta tenyészetéből 20-40 mg mennyiségű baktérium mennyiséget félkémcsövekbe helyeztünk. Ezt követően az „elszappanosítás” (saponification) során 1 ml 1. reagens (45 g NaOH, 150 ml etanol és 150 ml desztillált víz) hozzáadását követően, a mintákat 5 percen keresztül 100 °C hőmérsékletű vízfürdőben (Precíziós vízfürdő NB-301, HandyLAB System, N-BIOTEK, Korea) inkubáltuk. A mintákat homogenizáltuk, majd újabb 25 perc inkubáció következett. A metilációs lépés során 2 ml 2. reagens (325 ml 6 N HCl, 275 ml metanol) hozzáadását követően a mintákat 10 percen keresztül 80 °C hőmérsékletű vízfürdőben inkubáltuk.

A zsírsavak extrakciója során 1,25 ml 3. reagenst (200 ml hexán, 200 ml metil-terc-butil-éter) adtunk a mintákhoz és az észteresített zsírsavakat 10 percig laboratóriumi

vertikális rázatóban (Rotator drive STR4 Stuart, Cole-Parmer™, Vernon Hills, IL, USA) inkubáltuk. A felső szerves fázis kinyerését követően, a bázikus mosás első lépéseként 3 ml 4. reagenst (10,8 g NaOH, 900 ml desztillát víz) adtunk a mintákhoz és 5 percig vertikális rázatóban mostuk. A kapott felső szerves fázist egy tiszta fiolába helyeztük a GC-MS vizsgálathoz.

5.2.5. A baktériumok AFB1-bontó képességének vizsgálata

A baktériumokat az 5.2.2. pontban leírtak alapján készítettük elő. A baktériumok AFB1 bontó képességének vizsgálata során az előtenyésztett baktériumokat 2 µg/ml koncentrációjú AFB1-et tartalmazó PDB oldatba oltottuk, majd 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon, három napon keresztül inkubáltuk.

Az extrakció során a minták sejtmentes felülúszójából 1 ml-t használtunk fel, amelyhez 2 ml HPLC tisztaságú kloroformot adtunk. A homogenizálást (1 perc) és centrifugálást (7500 g, 20 °C, 10 perc) követően az alsó fázist nitrogén alatt bepároltuk. A minták visszaoldása 300 µl metanol:víz (8:2) elegyben történt.

5.2.6. A baktériumok hidrogén-cianid termelésének vizsgálata

A baktériumokat az 5.2.2. pontban leírtak alapján készítettük elő. A hidrogén-cianid képződés vizsgálata során az előtenyésztett baktériumokból 50 µl mennyiséget a 3 ml PDA táptalajt tartalmazó 24-férőhelyes sejtenyésztő edény mintatárolóiba mértünk. Kontrollként a sebfertőzésből izolált DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) törzsgyűjteményből beszerzett *P. aeruginosa* PaO1 törzset (DSMZ 22644) használtuk, mely bizonyítottan hidrogén-cianidot termelő törzs (Létoffé és mtsai., 2022). A mintatárolók tetejére a reagenseleggyel (HPLC tisztaságú kloroformban 5 mg/ml Cu-etil-acetoacetát és 5 mg/ml 4,4'-metilénbisz (N,N- dimetilanilin)) átitatott Whatman 3 MM szűrőpapírt helyeztünk. A reagenselegyet Pasteur-pipettával vittük fel a szűrőpapír felszínére, majd az oldószert elpárolagtattuk. Három éjszakán át tartó inkubációt (28 °C) követően a hidrogén-cianid képződése esetén sötétkék elszíneződés látható a szűrőpapíron.

5.2.7. Növekedési és biokémiai tesztek

Baktérium törzs hőmérsékleti optimumának megállapításához TSA táptalajon végeztük a tenyésztéseket 4, 8, 22, 24, 30, 37 és 45 °C hőmérsékleten. A pH optimum meghatározásához a törzset TSB tápoldatban tenyésztettük 4 napon keresztül, 28 °C

hőmérsékleten különböző pH (pH 6-10) értékeken. A pH 6-8 közötti tartományban 0,1 M KH_2PO_4 /0,1 M citromsav/0,1 M nátrium-citrát puffert, valamint a pH 9-10 közötti tartományban 0,1 M NaHCO_3 /0,1 M Na_2CO_3 puffert alkalmaztunk (Wang és mtsai., 2020). A növekedéshez szükséges optimális sókoncentráció meghatározásához a TSB tápoldatot 0-5% nátrium-kloriddal egészítettük ki (1%-os (w/v) léptéknövelés alkalmazásával), majd 28 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A Gram-festést, Bartholomew és munkatársai módszere alapján végeztük (Bartholomew és mtsai., 1952). A fluoreszcens pigmenttermelés tesztelésére King's B agart használtunk, amely során a baktériumtelep körül sárgás elszíneződés figyelhető meg pigmenttermelés esetén (King és mtsai., 1954). A kataláz aktivitás tesztelése során O_2 képződés figyelhető meg a baktérium telep 3%-os H_2O_2 hozzáadásának hatására, valamint a citokróm-oxidáz aktivitás esetén a baktérium telepek elszíneződése látható 1% (w/v) tetrametil-p-feniléndiamin hozzáadását követően (Kovács és mtsai., 1956). A β -hemolízis megállapításához 5% birkavérrel kiegészített táptalajt alkalmaztunk, mely során pozitív eredmény esetén feltisztulási zóna jelenik meg a baktériumtelepek körül. A leván termelés tesztelésére 5% szacharózzal kiegészített nutrient agart (NA) használtunk (Lelliott és mtsai., 1966), majd 2 napon keresztül 28 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A levánt termelő baktériumok mukoid fenotípust mutatnak. A baktérium biokémiai és fiziológiai jellegeit az API20NE (bioMérieux) kit segítségével vizsgáltuk a gyártó utasításainak követésével. A zsírsavprofil meghatározását GC-MS analízissel végeztük (Sasser és mtsai., 1990).

5.2.8. A poláris lipidek és izoprenoid kinonok extrakciója

A baktériumokat az 5.2.2. pontban leírtak alapján előkészítettük és 160 μl mennyiséget 200 ml LB tápoldatba mértünk, majd 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon, 16 órán keresztül inkubáltuk. Centrifugálást követően (7500 g, 20 °C, 10 perc) a pelletet fagyasztva szárítottuk. A poláris lipidek és izoprenoid kinonok kinyerése Minnikin és munkatársainak módszere alapján készült (Minnikin és mtsai., 1984). A fagyasztva szárított mintákból 50 mg mennyiséget csavaros félkémcsőbe mértünk. 2 ml metanol:víz (100:10) elegye és 2 ml petróleum-éter hozzáadása után homogenizáltuk és ultrahangos kád (Elma Ultrasonic Technology) segítségével extraháltuk a mintákat (80 kHz, 20 °C, 20 perc). További 1 ml petróleum-éter hozzáadása után centrifugáltuk, majd a felső fázist nitrogénáram alatt bepároltuk az izoprenoid kinonok kinyerésének érdekében. A poláris lipidek extrakciójához a megmaradt alsó fázishoz 2,3 ml kloroform:metanol:víz

(90:100:30) elegyet adtunk és vertikális rázógép segítségével 60 percen keresztül extraháltuk. Centrifugálást (7500 g, 20 °C, 10 perc) követően a felső fázist gyűjtöttük. Az alsó fázishoz 750 µl kloroform: metanol: víz (50:100:40) elegyet adtunk, amit vertikális rázógép segítségével 30 percen keresztül extraháltunk. Centrifugálás után a felső fázist hozzáadtuk a korábban elválasztott felső fázishoz. Az előző extrakciós lépést megismételtük. Az összegyűjtött felső fázisokhoz 1,3 ml kloroformot és 1,3 ml 0,3% NaCl oldatot adtunk, az elegyet homogenizáltuk, centrifugáltuk, majd a felső fázis eltávolítása után a poláris lipideket tartalmazó alsó fázist nitrogénáram alatt bepároltuk.

5.2.8.1. Az ektoin és az *N*-acetyl-glutaminil-glutamin amid extrakciója

Az ektoin és az *N*-acetyl-glutaminil-glutamin amid (NAGGN) termeltetését Parwata és munkatársainak módszere alapján végeztük kisebb módosításokkal (Parwata és mtsai., 2018). A baktériumot 8,9% nátrium-kloridot tartalmazó 10 ml MM63 tápoldatban 28 °C hőmérsékleten, 150 rpm fordulatszámon 18 órán keresztül inkubáltuk. A tenyészetből 400 µl-t 20 ml friss MM63 tápoldatba helyeztünk és megegyező körülmények között 22 órán keresztül inkubáltuk. A sejteket centrifugálással nyertük ki és 20 ml 17,5% nátrium-kloridot tartalmazó MM63 tápoldatba helyeztük át, majd az ektoin termelődéséhez szükséges 28 °C hőmérsékleten, 150 rpm fordulatszámon 24 órán keresztül inkubáltuk.

Az inkubációt követően a sejteket 7500 g fordulatszámon 20 percen keresztül centrifugáltuk, majd fagyasztva szárítottuk. Az intracelluláris ektoin kinyeréséhez 20 mg baktériumpellethez 1 ml vizet adtunk és szilika gyöngy (0,25-0,5 mm) segítségével golyós malom felhasználásával (VWR Star-Beat) 25 Hz frekvencián 4 x 20 másodperces kezeléssel a sejteket feltártuk. Centrifugálást követően (16000 g, 20 °C, 20 perc) a felülúszót HPLC-fiolába mértük és a HPLC-HRMS analízisig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

5.2.8.2. Az aril-poliének extrakciója

A baktériumokat az 5.2.2. pontban leírtak alapján előkészítettük és 160 µl mennyiséget 200 ml LB tápoldatba mértünk, majd 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon, 16 órán keresztül inkubáltuk. Centrifugálás után (7500 g, 20 °C, 10 perc) a pelletet fénytől elzárva metanollal extraháltuk 4 °C hőmérsékleten ultrahangos kád (Elma Ultrasonic Technology) segítségével 80 kHz frekvencián 30 percen keresztül. Centrifugálást követően (16000 g, 20 °C, 20 perc) a felülúszót HPLC-fiolába mértük és a HPLC-HRMS analízisig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

5.2.9. Mintaelőkészítés a pásztázó elektronmikroszkóphoz

A Ps_91 törzs három-dimenziós morfológiájának vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóppal történt (SEM). A sejteket 2,5% glutáraldehiddel fixáltuk és 0,05 M kakodilát pufferrel (pH=7,2) egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A mintából 8 µl mennyiséget vittünk fel 0,01% (w/v) poli-L-lizinnel bevont szilikonlemez felületére. A szilikonlemezt kétszer mostuk PBS oldattal és dehidratáltuk az etanol hígítási sorozatával (30%, 50%, 70%, 80%, 100% etanol (v/v), két órán keresztül, 4 °C hőmérsékleten, majd 100% etanolban egy éjszakán át inkubáltuk. A mintát kritikus-pont szárító segítségével szárítottuk, majd 12 nm vastagságú aranyréteggel vontuk be, majd Zeiss Sigma 300 Field-Emission pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss). A sejtek közül 100 db méretét megmértünk ImageJ program segítségével, majd átlaguk alapján megállapítottuk a sejt valós méretét. A minták előkészítését és mérését Farkas Attila (HCEMM Funkcionális Sejtbiológia és Immunológia ACF) végezte.

5.2.10. Az antagonista tesztekhez szolgáló *A. flavus* tárolása

Az antagonista tesztekhez kukoricáról izolált aflatoxin-termelő *A. flavus* törzset használtunk (SZMC 21417), amit hosszú távon -80 °C-on fagyasztva, rövid távon pedig 4 °C-on tartott 0,01% Tween-80 oldatba felvett konídiospóra szuszpenzió formájában tároltuk. Az egyes kísérletek során inokulálásra használt konídiospóra szuszpenziók spóraszámát Bürker-kamra segítségével állítottuk be. A gomba előtenyésztéséhez minden esetben PDA táptalajt használtunk.

5.2.10.1. Szilárd fázisú konfrontációs tesztek

A konfrontációs tesztek során csészénként 50 ml PDA táptalajt tartalmazó Petri-csészéket használtunk. A friss konídiospóra szuszpenzióból 10 µl 10^5 db/ml mennyiséget a csésze közepére oltottunk. Az 5.2.2. pontban leírtak alapján előkészített baktériumokból 20-20 µl mennyiséget oltottunk a csésze közepétől 2,5-2,5 cm távolságra. Kontrollként a csésze közepére oltott gombát használtuk. A csészéket kétszeres Parafilm réteggel zártuk le, majd 28 °C hőmérsékleten, sötétben inkubáltuk 8 napon keresztül. Kísérleteinket minimum három biológiai és három technikai párhuzamosban hajtottuk végre.

A szilárd konfrontációs tesztek során az AFB1-tartalom meghatározásához egy 1 cm átmérőjű korongot távolítottunk el a gombatelep közepéről, majd 2 ml metanol:víz (8:2) elegyet adtunk hozzá. Az extrakció ultrahangos kád (Elma Ultrasonic Technology)

segítségével történt (80 kHz, 25 °C, 20 perc). Centrifugálást követően (16000 g, 20 °C, 20 perc), a felülúszót HPLC-fiolába mértük és a HPLC-HRMS analízisig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

5.2.10.2. Az illékony komponensek vizsgálata szilárd fázisú konfrontációs tesztek során

A konfrontációs tesztek során termelődő illékony komponensek (VOC) vizsgálatához kétosztatú Petri-csészéket használtunk. A kétosztatú csészékbe osztatonként 5-5 ml PDA táptalajt mértünk. A három napos PDA táptalajon előtenyésztett szilárd *A. flavus* tenyészetekből 1 cm átmérőjű korongokat emeltünk ki, majd fejjel lefelé a kétosztatú csésze egyik mélyedésébe helyeztük. Az ellentétes oldali mélyedésbe az 5.2.2. pontban leírtak alapján előkészített baktériumokból 80 µl-t oltottunk. A csészéket kétszeres Parafilm réteggel zártuk le, majd 28 °C hőmérsékleten, sötétben inkubáltuk 8 napon keresztül.

Az AFB1 extrakciójához a gombát tartalmazó táptalajt feldaraboltuk, majd 20 ml metanol:víz (8:2) elegyet adtunk hozzá. A metabolitextrakció ultrahangos kád (Elma Ultrasonic Technology) segítségével történt (80 kHz, 25 °C, 20 perc). Centrifugálást követően (16000 g, 20 °C, 20 perc), a felülúszót HPLC-fiolába mértük és a HPLC-HRMS analízisig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

5.2.10.3. Folyadékfázisú konfrontációs tesztek

5.2.10.4. A folyadékfázisú konfrontációs teszt fermentlevek AFB1 tartalmának meghatározása

A folyadékfázisú konfrontációs tesztek során 50 ml PDB tápoldatot 10 µl *A. flavus* konídiospóra szuszpenzióval (10^5 spóra/ 1 ml 0,01% Tween-80 oldatban) és 40 µl az 5.2.2. pontban leírtak alapján előkészített baktériummal oltottuk le. Kontrollként 10 µl *A. flavus* konídiospóra szuszpenziót (10^5 spóra/ 50ml 0,01% Tween-80 oldatban) oltottunk 50 ml PDB tápoldatba. A tenyészeteket (konfrontációs tesztek és kontrollok) 3 napig inkubáltuk 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon. Az inkubáció leteltét követően steril gézen szűrtük a micéliumokat, majd fagyasztva szárítást követően szárazanyagtartalmat mértünk.

Az extrakció során a minták sejtmentes felülúszójából 1 ml-t használtunk fel, amelyhez 2 ml HPLC tisztaságú kloroformot adtunk. A homogenizálást (1 perc) és centrifugálást (10 perc, 7500 g) követően az alsó fázist nitrogén alatt bepároltuk. A minták visszaoldása 300 µl 80% (v/v) metanolban történt.

5.2.10.5. A Ps_4 izolátum (*P. paracarnis*) és az *A. flavus* közötti folyadékfázisú konfrontációs kísérlet és mintaelőkészítése

Folyadékfázisban vizsgáltuk az *A. flavus* törzs (SZMC 21417) és a *Pseudomonas paracarnis* izolátum (Ps_4) közötti kölcsönhatást. A konfrontációs kísérletek végrehajtása mellett kontrollként a két mikroorganizmus önálló tenyészetét, valamint a partnerek sejtmentes felülúszójának, és a partner inaktivált micélium/sejt maradékainak jelenlétében vizsgáltuk a tenyészeteket.

Három napon át 28 °C hőmérsékleten PDA táptalajon növesztett *A. flavus* tenyészet konídiospóráiból 0,01%-os Tween-80 oldattal spóraszuszpenziót készítettünk, melynek a koncentrációját 10^5 spóra/ml-re állítottuk be. A baktériumok előtenyésztése az 5.2.2. pontban leírtak alapján történt. A kísérleti elrendezésben alapvetően 3 féle tenyészeteket készítettünk. Önálló gomba, önálló baktérium és konfrontációs tenyészetek. Az önálló tenyészetekből replikátumokat állítottunk be azért, hogy alapanyagot kapjunk olyan mimikált konfrontációs tenyésztésekhez, ahol vagy csak a már feltenyésztett önálló tenyészet sejtmentes fermentlevét, vagy pedig hővel (100 °C hőmérsékleten 1 órán át tartó forralással) inaktivált biomasszáját vittük be a konfrontációs partner tenyészetébe.

A gomba önálló tenyészetét 10^5 konídiospóra 100 ml PDB tápoldatba történő beoltásával, majd három napig tartó 28 °C hőmérsékleten 130 rpm fordulatszám mellett végzett inkubálásával hoztuk létre.

A baktérium önálló tenyészetét $OD_{600}=0,8$ denzitású tenyészet 60 μ l-ének 100 ml PDB tápoldatba történő beoltásával, majd három napig tartó 28 °C hőmérsékleten 130 rpm fordulatszám mellett végzett inkubálásával hoztuk létre.

A konfrontációs kísérletek során oltóanyagként 10^5 *A. flavus* konídiospórát és 60 μ l $OD_{600nm}=0,8$ optikai denzitású *Pseudomonas* törzset használtunk, melyeket 100 ml PDB-be oltottunk. A tenyésztést három napon keresztül 28 °C hőmérsékleten 130 rpm fordulatszámon történő rázatással végeztük.

A kontroll és konfrontációs tenyészeteket az inkubációs idő leteltét követően steril gézen szűrtük. A felfogott micéliumot fagyasztva szárítottuk és szárazanyag-tartalmat határoztunk meg belőle, a fermentlét pedig sejtmentesítettük 7500 g, 10 perc, 25 °C-on történő centrifugálással. A fermentlét felhasználásig -80 °C hőmérsékleten tároltuk.

A mimikált konfrontációknál a baktérium növekedésének vizsgálatához inaktivált micéliumokat friss PDB tápoldatba (100 ml) helyeztük és 60 μ l $OD_{600nm}=0,8$ optikai denzitású baktériummal oltottuk le. A gomba fermentlevét centrifugálással (16000 g, 25 °C,

20 perc) és 0,45 μm pórusátmérőjű PVDF membránon történő szűréssel sejtméntesítettük. Az így kapott sejtektől mentes fermentlevet ezt követően 5 ml 10x töménységű PDB tápoldattal egészítettük ki, majd a beállított optikai denzitású baktériummal oltottuk le. A gomba növekedésének vizsgálatához a mimikált konfrontáció során az inaktivált baktérium biomasszáat friss PDB tápoldatba (100 ml) helyeztük és 10^5 konídiospórával oltottuk be. A baktérium sejtméntes felülszóját 0,22 μm pórusátmérőjű PVDF membránon szűrtük és 5 ml 10x töménységű PDB tápoldattal egészítettük ki, majd 10^5 konídiospórával oltottuk be. Mind a sejtméntes, mind az inaktivált partner jelenlétében történő baktérium- és gomba tenyészeteket további három napon keresztül inkubáltuk 28 °C hőmérsékleten 130 rpm fordulatszám mellett. Az inkubációs idő leteltével a tenyészeteket steril gézen szűrtük, majd az így kinyert micéliumot fagyasztva szárítottuk és szárazanyag- tartalmat mértünk. A fermentleveket centrifugálással (7500 g, 10 perc, 25 °C) sejtméntesítettük és a felhasználásig -80 °C hőmérsékleten tároltuk.

A metabolitösszetétel meghatározásához a minták fermentlevének 2 ml térfogatát fagyasztva szárítottuk. A metabolitok kinyeréséhez a fagyasztva szárított mintákhoz 500 μl , 0,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú buszpiront és homovaníliásavat, mint belső standardot tartalmazó metanol:víz elegyet (8:2) adtunk. Az extrakciót ultrahang (Elma Ultrasonic Technology) segítségével hajtottuk végre (80 kHz, 20 °C, 3 x 10 perc) és az egyes ultrahangos kezelések között a mintákat 1 percig homogenizáltuk. Az extrakciót követően a mintákat centrifugáltuk (16000 g, 20 perc, 20 °C), majd a felülszókat HPLC-fiolába pipettáztuk és a HPLC-HRMS vizsgálatig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

A minőségellenőrző (quality control, QC) minta valamennyi mintából 5 μl térfogatot tartalmazott.

5.2.10.6. A lipidomikai mérések mintaelőkészítése

A 10 mg tömegű fagyasztva szárított micéliumot/sejteket golyós malom segítségével szilika gyöngyök felhasználásával (0,25-0,5 mm) tártuk fel 200 μl víz és 333 μl metanol jelenlétében 25 Hz frekvencián. A feltárást követően 666 μl kloroformot adtunk az elegyhez, majd 15 percen keresztül extraháltuk a lipideket ultrahangos kád (Elma Ultrasonic Technology) felhasználásával 37 kHz frekvencián 4 °C hőmérsékleten. Víz hozzáadása után (400 μl) az elegyet centrifugáltuk (7500 g, 4 °C, 10 perc), majd az alsó fázist 40 °C hőmérsékleten centrifugális bepárló segítségével szárazra pároltuk. A lipidtartalom

meghatározásához a szárazra párolt mintákat 100 µl, az elválasztáshoz használt „B” oldószerben oldottuk.

5.2.11. Analitikai mérések

5.2.11.1. Zsírsavösszetétel meghatározása

A baktérium minták zsírsavösszetételét zsírsav-metil-észterek formájában Nexera GC-2030 lángionizációs detektorral ellátott gázkromatográf segítségével választottuk el HP-Ultra (2,25 m × 0,2 mm × 0,33 µm filmvastagság) kromatográfiás oszlopon 1,48 mL min⁻¹ áramlási sebességű hidrogén vivőgáz, 30 mL min⁻¹ sebességű nitrogén (make up gáz), valamint 30 mL min⁻¹ sebességű oxigén és 350 mL min⁻¹ sebességű hidrogén (detektor) gázok alkalmazásával. Az injektálás (2 µl) „splitless” módban AOC-20i Plus automata injektorral történt. Az elválasztás során a hőmérsékleti program 168,1 °C-ról indult, ami 291 °C-ra emelkedett (28 °C/perc), majd 300 °C hőmérsékletig fűtötte az oszlopot, és ezen az értéken tartotta 1,5 percig. A mérési idő 6,04 perc volt. A GC készülék vezérléséhez és a kiértékeléshez a LabSolution ver. 5.97 programot és a Sherlock CAS ver. 6.4 programot használtuk.

Az 1300-C rapid kalibrációs standard mixet használtunk a retenciós idő és a rendszer megbízhatóságának ellenőrzése céljából. A *Bacillus subtilis* törzs SZMC 14624 és a tiszta hexán minőségi kontrollként és negatív kontrollként szolgáltak.

5.2.11.2. HPLC-HRMS mérések

A méréseket minden esetben Dionex UltiMate 3000 UHPLC készülékhez csatlakoztatott Q-Exactive Plus hibrid kvadrupól-Orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) hajtottuk végre. Valamennyi méréshez fűtött elektroporlasztásos ionforrást használtunk.

5.2.11.2.1. Másodlagos metabolitok vizsgálata

A metabolitok elválasztását Gemini-NX-C18, 4 x 2 mm előtétoszloppal ellátott Gemini NX-C18, 150 x 2mm, 3 µm oszlopon hajtottuk végre. A 0,2 ml/min sebességgel áramló mozgó fázist 0,1 % hangyasavat tartalmazó víz (A) és 0,1 % hangyasavat tartalmazó acetonitril:metanol 1:1 (B) alkotta. Az alábbi grádiens elúciós profilt alkalmaztuk: 0-2 min,

5 % B; 13 min, 95% B; 19 min, 95% B; 19,5 min, 5% B; 24 min, 5% B. A mintákból 3 µl-t injektáltunk. Az elválasztást 25 °C hőmérsékleten valósítottuk meg.

Az ionforrás az alábbi beállításokkal működött: iontovábbító kapilláris, 300 °C; szárítógáz, 350 °C; spray feszültség, 3,5 kV; porlasztógáz, 10; szárítógáz, 35; S-lencse rádiófrekvenciás szint, 50 készülékre jellemző egység.

A metabolitokat pozitív és negatív ionizációs módban vizsgáltuk pásztázó-adatfüggő MS/MS módban (fullscan-ddms2). A pásztázó adatgyűjtéshez a 100-1500 m/z tömegtartományt alkalmaztuk 70000 felbontás, 1×10^6 automatikus erősítésszabályozás (AGC-Automatic Gain Control), és 100 ms izolációs idő (IT) mellett. Az adatfüggő MS/MS mérések esetén a felbontást 17500 értéknek választottuk, a kvadrupól izolációs ablaka 0,4 m/z , a normalizált ütközési energia 35 tetszőleges egység volt.

5.2.11.2.2. Az AFB1 mennyiségének meghatározása

A metabolitok elválasztását Gemini-NX-C18, 4 x 2 mm előtétoszloppal ellátott Gemini NX-C18, 50 x 2 mm, 3 µm oszlopon hajtottuk végre. A 0,3 ml/min sebességgel áramló mozgó fázist 0,1% hangyasavat tartalmazó víz (A) és 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril:metanol 1:1 (B) alkotta. Az alábbi grádiens elúciós profilt alkalmaztuk: 0-1 min, 5% B; 6 min, 95% B; 10 min, 95% B; 10,5 min, 5% B; 15 min, 5% B. A mintákból 3 µl-t injektáltunk. Az elválasztást 25 °C hőmérsékleten valósítottuk meg.

Az ionforrás az alábbi beállításokkal működött: iontovábbító kapilláris, 350 °C; szárítógáz, 350 °C; spray feszültség, 3,5 kV; porlasztógáz, 10; szárítógáz, 40; S-lencse rádiófrekvenciás szint, 50 készülékre jellemző egység.

Az AFB1 toxint pozitív ionizációs módban vizsgáltuk párhuzamos reakció monitorozás (PRM) módszerrel 17500 felbontás, 2×10^5 automatikus erősítésszabályozás (AGC-Automatic Gain Control), és 64 ms izolációs idő (IT) mellett. A kvadrupól az AFB1 $[M+H]^+$ molekulaionját $313.07 \pm 0,2$ m/z tartományban izolálta. A normalizált ütközési energia 35 tetszőleges egység volt.

5.2.11.2.3. Az ektoin és az NAGGN meghatározása

Az ektoin és az NAGGN elválasztását ACQUITY BEH amide, 5 x 2,1 mm előtétoszloppal ellátott ACQUITY BEH amid, 100 x 2,1mm, 1,7 µm oszlopon hajtottuk

vége. A 0,4 ml/min sebességgel áramló mozgó fázist 0,1 % hangyasavat tartalmazó víz (A) és 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril (B) alkotta. Az alábbi grádiens elúciós profilt alkalmaztuk: 0-0,3 min, 97% B; 8,5 min, 60% B; 9,5 min, 60% B; 10 min, 97% B; 15 min, 97% B. A mintákból 5 µl-t injektáltunk. Az elválasztást 45 °C hőmérsékleten valósítottuk meg.

Az ionforrás az alábbi beállításokkal működött: iontovábbító kapilláris, 320 °C; szárítógáz, 350 °C; spray feszültség, 3,5 kV; porlasztógáz, 17; szárítógáz, 50; S-lencse rádiófrekvenciás szint, 50 készülékre jellemző egység.

Az ektoin és az NAGGN metabolitokat pozitív ionizációs módban vizsgáltuk párhuzamos reakció monitorozás (PRM) módszerrel 17500 felbontás, 2×10^5 automatikus erősítésszabályozás (AGC-Automatic Gain Control), és 100 ms izolációs idő (IT) mellett. A kvadrupól az ektoin $[M+H]^+$ molekulaionját $143,25 \pm 0,2$ m/z tartományban, az NAGGN $[M+H]^+$ molekulaionját $316,16 \pm 0,2$ m/z tartományban izolálta. A normalizált ütközési energia 35 tetszőleges egység volt.

5.2.11.2.4. Az aril-poliének meghatározása

A mérési módszer megegyezett a másodlagos metabolitok meghatározásánál alkalmazottal azzal a különbséggel, hogy az oszlopot elhagyó komponensek a tömegspektrometriás analízis előtt UV-detektoron is áthaladtak. A komponensek fényelnyelését 400, 410 és 440 nm hullámhosszon detektáltuk a pontosabb azonosítás érdekében.

5.2.11.2.5. A poláris lipidek és izoprenoid kinonok meghatározása

A poláris lipidek és izoprenoid kinonok elválasztását Discovery HS C18, 20 x 4 mm előtétoszloppal ellátott Discovery HS C18, 150 x 2,1mm, 3 µm oszlopon hajtottuk végre. A 0,2 ml/min sebességgel áramló mozgó fázist 0,1% ecetsavat tartalmazó 5 mM ammónium-acetát (A) és 0,1% ecetsavat tartalmazó metanol: 2-propanol 1:1 (V/V) elegy (B) alkotta. Az alábbi grádiens elúciós profilt alkalmaztuk: 0-2 min, 75% B; 14 min, 100% B; 19 min, 100% B; 19,5 min, 75% B; 25 min, 75% B. A mintákból 5 µl-t injektáltunk. Az elválasztást 45 °C hőmérsékleten valósítottuk meg.

Az ionforrás az alábbi beállításokkal működött: iontovábbító kapilláris, 300 °C; szárítógáz, 350 °C; spray feszültség, 3,5 kV; porlasztógáz, 10; szárítógáz, 35; S-lencse rádiófrekvenciás szint, 50 készülékre jellemző egység.

A kinonokat pozitív, a poláris lipideket pozitív és negatív ionizációs módban vizsgáltuk pásztázó-adatfüggő MS/MS módban (fullscan-ddms2). A pásztázó adatgyűjtéshez a 100-1500 m/z tömegtartományt alkalmaztuk 70000 felbontás, 1×10^6 automatikus erősítésszabályozás (AGC-Automatic Gain Control), és 100 ms izolációs idő (IT) mellett. Az adatfüggő MS/MS mérések esetén a felbontást 17500 értéknek választottuk, a kvadrupól izolációs ablaka 0,4 m/z , a normalizált ütközési energia 35 tetszőleges egység volt.

5.2.11.2.6. Lipidomikai mérések

A lipidek elválasztását Discovery HS C18, 20 x 4 mm előtétoszloppal ellátott Discovery HS C18, 150 x 2,1mm, 3 μ m oszlopon hajtottuk végre. A 0,2 ml/min sebességgel áramló mozgó fázist 5 mM ammónium-acetátot és 0,1% hangyasavat tartalmazó víz:metanol 95:5 (V/V) (A) és 5 mM ammónium-acetátot és 0,1% hangyasavat tartalmazó metanol:2-propanol 1:1 (V/V) (B) alkotta. Az alábbi gradiens elúciós profilt alkalmaztuk: 0-3 min, 50% B; 32 min, 100% B; 47 min, 100% B; 48 min, 50% B; 55 min, 50% B. A mintákból 5 μ l-t injektáltunk. Az elválasztást 45 °C hőmérsékleten valósítottuk meg.

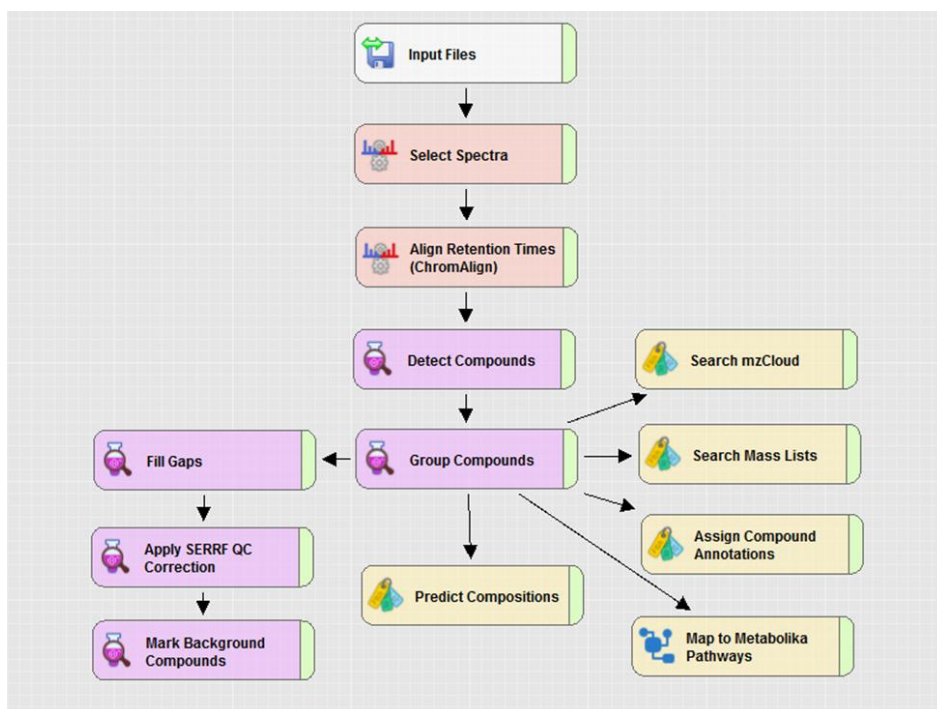
Az ionforrás az alábbi beállításokkal működött: iontovábbító kapilláris, 300 °C; szárítógáz, 350 °C; spray feszültség, 3,5 kV; porlasztógáz, 10; szárítógáz, 40; S-lencse rádiófrekvenciás szint, 50 készülékre jellemző egység.

A lipideket pozitív és negatív ionizációs módban vizsgáltuk pásztázó-adatfüggő MS/MS módban (fullscan-ddms2). A pásztázó adatgyűjtéshez a 200-1200 m/z tömegtartományt alkalmaztuk 70000 felbontás, 1×10^6 automatikus erősítésszabályozás (AGC-Automatic Gain Control), és 100 ms izolációs idő (IT) mellett. Az adatfüggő MS/MS mérések esetén a felbontást 17500 értéknek választottuk, a kvadrupól izolációs ablaka 0,4 m/z , a normalizált ütközési energia 35 tetszőleges egység volt.

5.2.11.3. Alkalmazott programok

Az HPLC-HRMS adatok gyűjtéséhez Thermo Xcalibur 3.1 szoftvert használtunk.

A nyers mérési eredményeket a CompoundDiscoverer 3.3 (CD) program segítségével dolgoztuk fel a **9. ábrán** látható munkamenet szerint.



9. ábra A CD program szerinti nyers mérési adatok feldolgozásának munkamenete.

A metabolitok azonosításához több, nyilvános tömeglista is a rendelkezésünkre állt:

- Arita Lab 6549 Flavonoid Structure Database,
- EFS HRAM Compound Database,
- Endogenous Metabolites database 4400 compounds,
- Extractables and Leachables HRAM Compound Database,
- LipidMaps -Structure Database

Az azonosításhoz felhasználtunk három, a releváns irodalom alapján általunk összeállított tömeglistát is:

- *Aspergillus* fajokra jellemző metabolitok
- Általános gomba másodlagos metabolitok (Nielsen és Smedsgaard, 2003)
- *Pseudomonas* bioaktív metabolitok (Shahid és mtsai., 2021; Kumar és mtsai., 2022; David és mtsai., 1994; Leisinger és mtsai., 1979).

A szimulált fragmentációkat MassFrontier 8.1 és a CFM-ID 4.0 programokkal végeztük el. A MetaboAnalyst online program segítségével határoztuk meg a szignifikáns metabolitokat. Első lépésként a CD programból az adott feltételek szerint szűrt metabolitokat töltöttünk fel

az alábbi paraméterekkel: Data type: peak intensities, format: Samples in columns. A normalizálást még a MetaboAnalyst előtt elvégeztük. A varianciaanalízis (ANOVA) után végrehajtott post-hoc analízisnek a Fisher's LSD féle tesztet választottuk 0,05 szignifikanciaszinttel ($P > 0,05$). A dolgozat során készített hő térképeket (Heatmap) a program alapbeállításával hoztuk létre.

5.2.12. Adat és törzs deponálás elérhető adatbázisokban és törzsgyűjteményekben

A teljes genom szekvenálás során létrejött nyers szekvencia adatokat a NCBI GénBankba deponáltuk JAVLSB000000000 hozzáférési számon. A nukleotid szekvenciákat az NCBI GénBankba deponáltuk, az alábbi elérési számokon: OR571460-OR571469 és OR563981. A Ps_91 törzset több törzsgyűjteménybe is deponáltuk, melyek a NCCB, NCAIM és DSMZ voltak, az alábbi gyűjteményi azonosítós számokon: NCCB 100969^T, NCAIM B.02685^T and DSM 117247^T.

5.2.13. Statisztikai analízis

A szignifikancia számítására Student-féle t-tesztet alkalmaztunk. A statisztikai szignifikanciát minden esetben a következő p-értékek mellett határoztuk meg: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns: nincs szignifikancia.

6. Eredmények és értékelésük

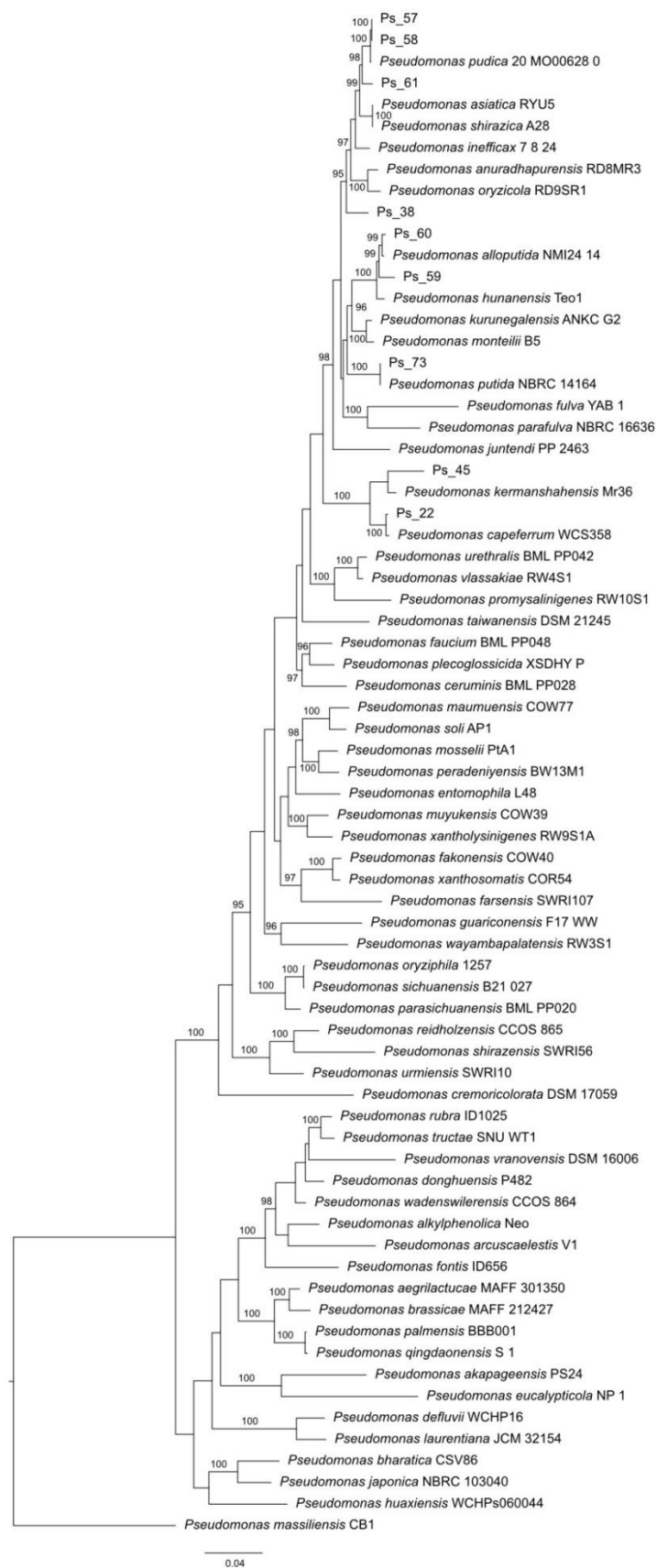
6.1. *Pseudomonas* törzsek izolálása és azonosítása

A mikroorganizmusok közül azok, amelyek a rizoszférában képesek növekedni ideális biokontroll-agensnek tekinthetők, mivel a rizoszféra az első védelmi vonal a növények számára a kórokozók támadásával szemben (Weller és mtsai., 1988). A rizoszféra a talaj azon része, amit az élő növényi gyökerek behálózna, ahol a növény a talaj mikrobiomjával interakciókat tud kialakítani. A rizoszférában élő baktériumok közül a *Pseudomonas* nemzetség tagjai arról nevezetesek, hogy elősegítik a növények növekedését és a növényi betegségek elleni védekezést. Ebben nagy szerepe van a nemzetség tagjainak számos előnyös tulajdonságának, mint pl. biofilmképzés, antifungális anyagok termelése, QS vegyületek termelése, szinergikus kapcsolat létrehozása a növény gyökereivel és a kemotaxis irányítása (Meneguzzi és mtsai., 2024).

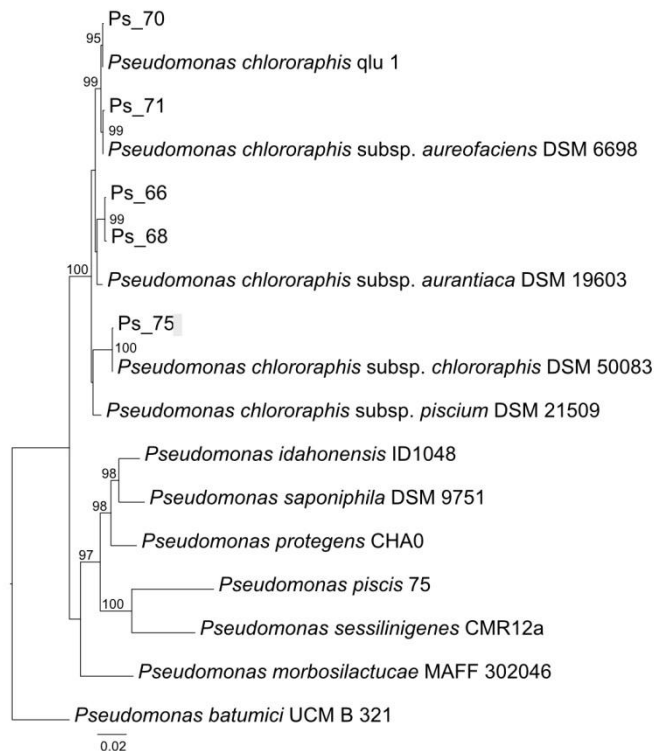
Munkánk során egyik célunk az volt, hogy rizoszférából származó *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumokat izoláljunk és vizsgáljuk biokontroll potenciáljukat. Madaras település melletti kukoricaföld kukorica rizoszféra földmintáiból *Pseudomonas* szelektív táptalajon (Gould és mtsai., 1985) történő tisztítás után 51 izolátumot gyűjtöttünk és azok 16S rRNS gén-specifikus PCR termékeinek szekvencia elemzésével igazoltuk, hogy az izolátumok a *Pseudomonas* nemzetségbe tartoznak. A taxonómiai besorolás pontosítása érdekében az *rpoD* gén (az RNS polimeráz szigma 70 faktorát kódolja) szekvencia analízisét is elvégeztük (Mulet és mtsai., 2010). Az általunk felszaporított és szekvenált részleges *rpoD* szekvenciákat összevetettük az ismert *Pseudomonas* törzsek *rpoD* szekvenciájával. A Girard és munkatársai által létrehozott filogenetikai osztályozás alapján (Girard és mtsai., 2021) az izolátumok 46%-a a *P. fluorescens* csoportba tartozott, miközben 18% a *P. putida*, 10% a *P. chlororaphis*, 8% a *P. koreensis*, 4% a *P. jessenii*, 2% a *P. gessardii* és 2% a *P. pohangensis* csoportba tartozott. Hat izolátum (10%) a 16S rRNS és *rpoD* gének alapján egyik ismert *Pseudomonas* fajjal vagy csoporttal sem mutatott hasonlóságot. Az *rpoD* szekvenciákon alapuló filogenetikai vizsgálat eredményeként kapott törzsfában a saját izolátumaink elhelyezkedését négy részletben (A, B, C és D) a 10. ábrán mutatjuk be. A filogenetikai vizsgálat eredményeként 45 izolátum faji besorolását sikeresen meghatároztuk (Mellékletek fejezet M1 táblázat). A 10/A. ábrán jól látszik, hogy a taxonómiailag újnak számító Ps_89, 90, 91, 96 és 100 izolátumok (a Ps_97 izolátum esetében nem sikerült az *rpoD* gén felszaporítása) a Mandelii klád tagjaival állnak közelebbi rokonságban.



10/A. ábra A Jesseni, Koreensis, Mandelii, Kielensis és Corrugata kládok tagjait és a saját izolátumainkat tartalmazó filogenetikai fa.



10/C. ábra A Putida klád tagjait és a saját izolátumainkat tartalmazó filogenetikai fa.



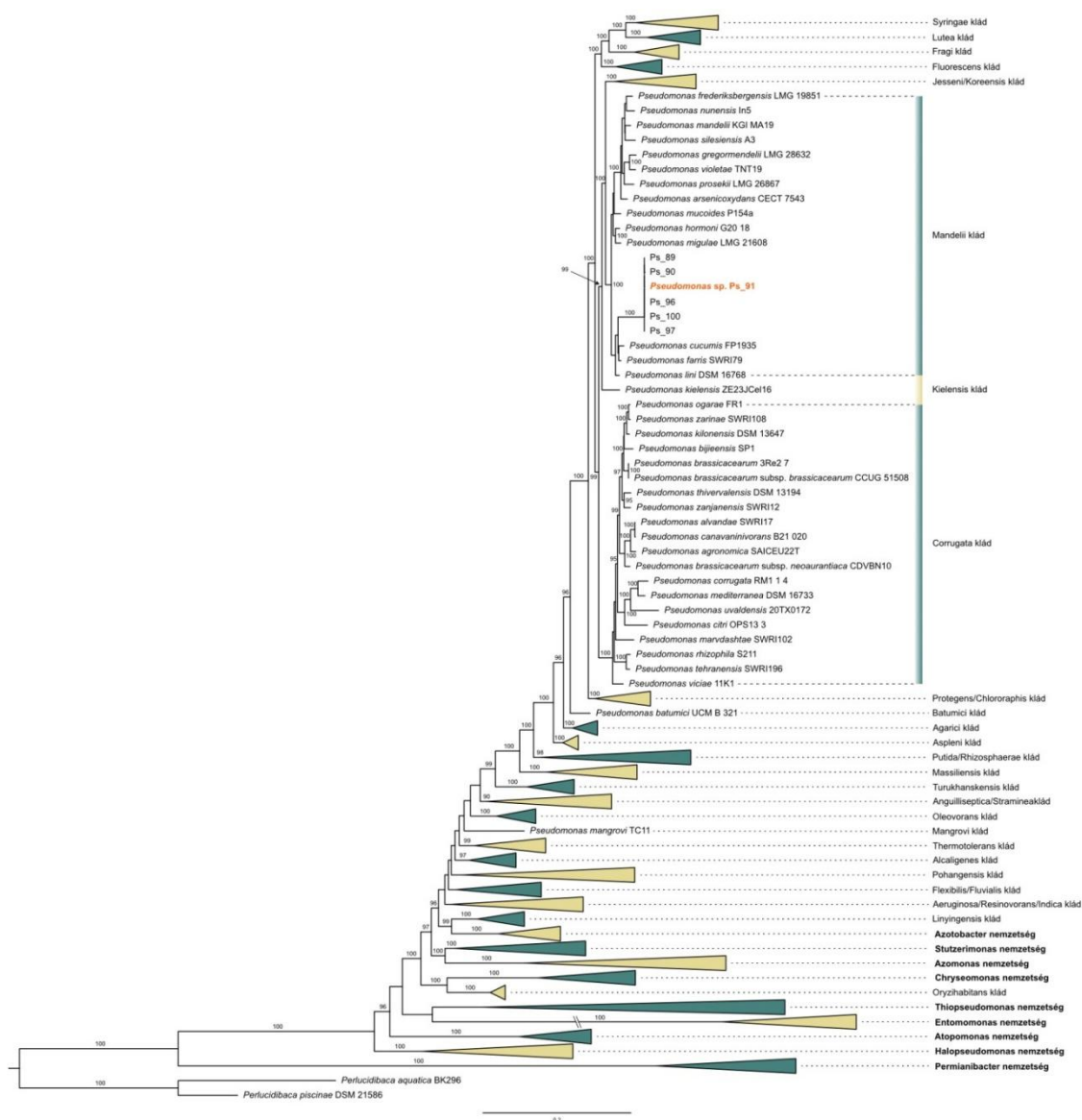
10/D. ábra A *Chlororaphis* klád tagjait és a saját izolátumainkat tartalmazó filogenetikai fa.

A pontos rokonsági viszonyok feltárásának érdekében a már eddig is vizsgált 16S rRNS és *rpoD* szekvenciák bevonásával, kiegészítve az *rpoB* gén (az RNS polimeráz β alegységét kódolja) szekvenciájával (**11. ábra**). Az elemzéshez a Ps_91-gyel izogenikusnak bizonyuló Ps_89, 90, 96, 97 és 100 izolátumok *rpoB*-vel kiegészített 16S rRNS és *rpoD* adatait is bevontuk. Az összehasonlító vizsgálatot minden ismert genommal rendelkező *Pseudomonas* fajra kiterjesztettük, különös tekintettel a *Corrugata*, *Mandelii* és *Kielensis* kládok tagjaira, valamint két fajra a *Protegens* kládból (**11. ábra**).

A 16S rRNS és *rpoD* szekvenciákon alapuló filogenetikai elemzés alapján a Ps_89, 90, 91, 96, 97 és 100 izolátumok bár a *Mandelii* kláddal állnak közelebbi rokonságban, a klád tagjaitól mégis jelentős mértékben elkülönülnek. A filogenetikai fa alapján ésszerű volt azt feltételezni, hogy hat izolátum egy eddig még nem leírt fajhoz tartozik. Ennek kivizsgálása érdekében tetszőlegesen kiválasztottuk az egyik törzset, a Ps_91-et (továbbiakban típus törzs) és részletes genomvizsgálatnak vetettük alá genomszekvenálást követően.

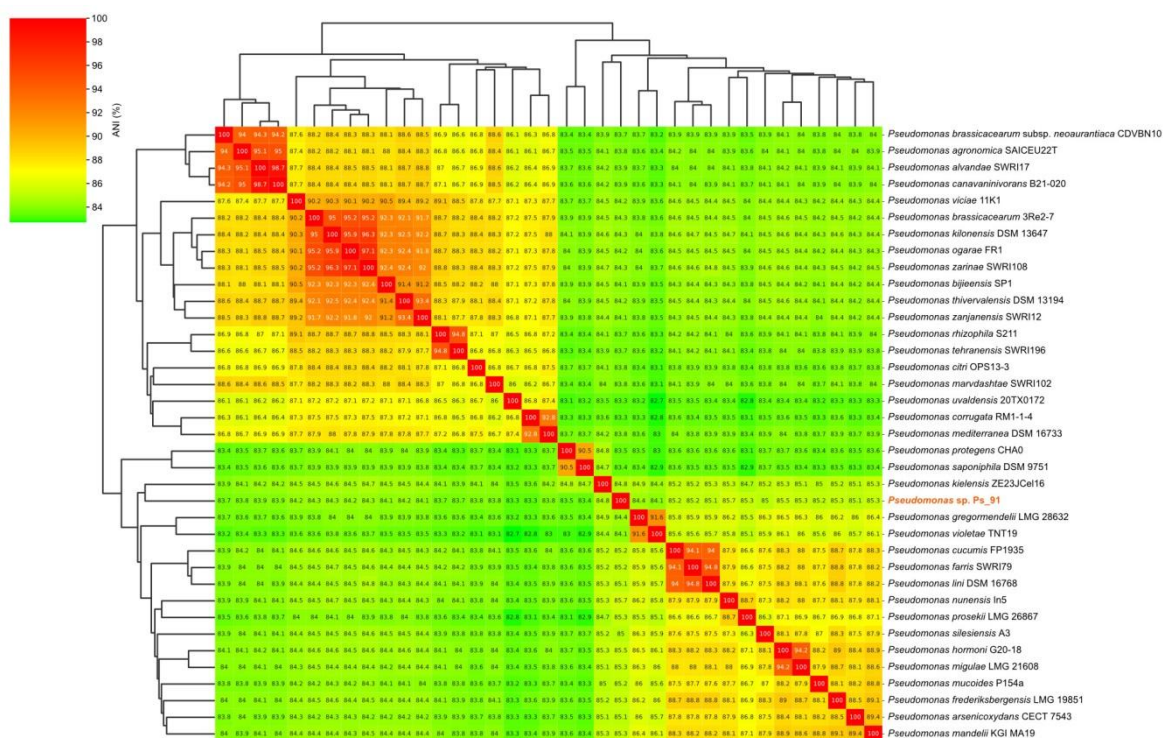
6.2. A Ps_91 törzs genomszekvenálása és genomelemzése

A Ps_91 törzs genomját 76 kontigba tudtuk összeszerelni az NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline programot használva. Az adatokat az NCBI genombankba JAVLSB0000000000 azonosítószámon deponáltuk. A Ps_91 törzs genomméretét 5,9 Mb-ra becsültük. A genom G+C-tartalma 61%-nak bizonyult, ami a *Pseudomonas* nemzetség fajaira jellemző 58-69%-os tartományba esik.



11. ábra. A 16S rRNS, *rpoB* és *rpoD* szekvenciákat tartalmazó összevont adatsor használatával előállított maximum likelihood filogram. A kládok elnevezése Rudra és Gupta (2024), valamint Girard és mtsai. (2021) publikációi alapján történt. A legjobb fa statisztikai támogatottságát UFBoot segítségével számítottuk ki. Csak a 95%-nál magasabb értékek kerültek feltüntetésre. A *Perlucidibaca* nemzetség tagjai szolgáltak külső csoportként.

A FastANI program 1.33-as verzióját használva (Jain és mtsai., 2018) megállapítottuk a Ps_91 genom átlagos nukleotid-azonossági (ANI) értékét az ismert *Pseudomonas* fajok genomjával összevetve és az eredményeket az ANIclustermap program 1.3.0-s verziója segítségével ábrázoltuk (**12. ábra**). A fajhatárhoz megállapított 95%-os küszöbérték alá esett az azonossági érték, bármely ismert *Pseudomonas* fajhoz is történt az összehasonlítás (**12. ábra**). A legmagasabb ANI-értékeket a *P. nunensis* és a *P. hormoni* fajok esetében tapasztaltuk (85,7% és 85,5% azonossági értékkel).

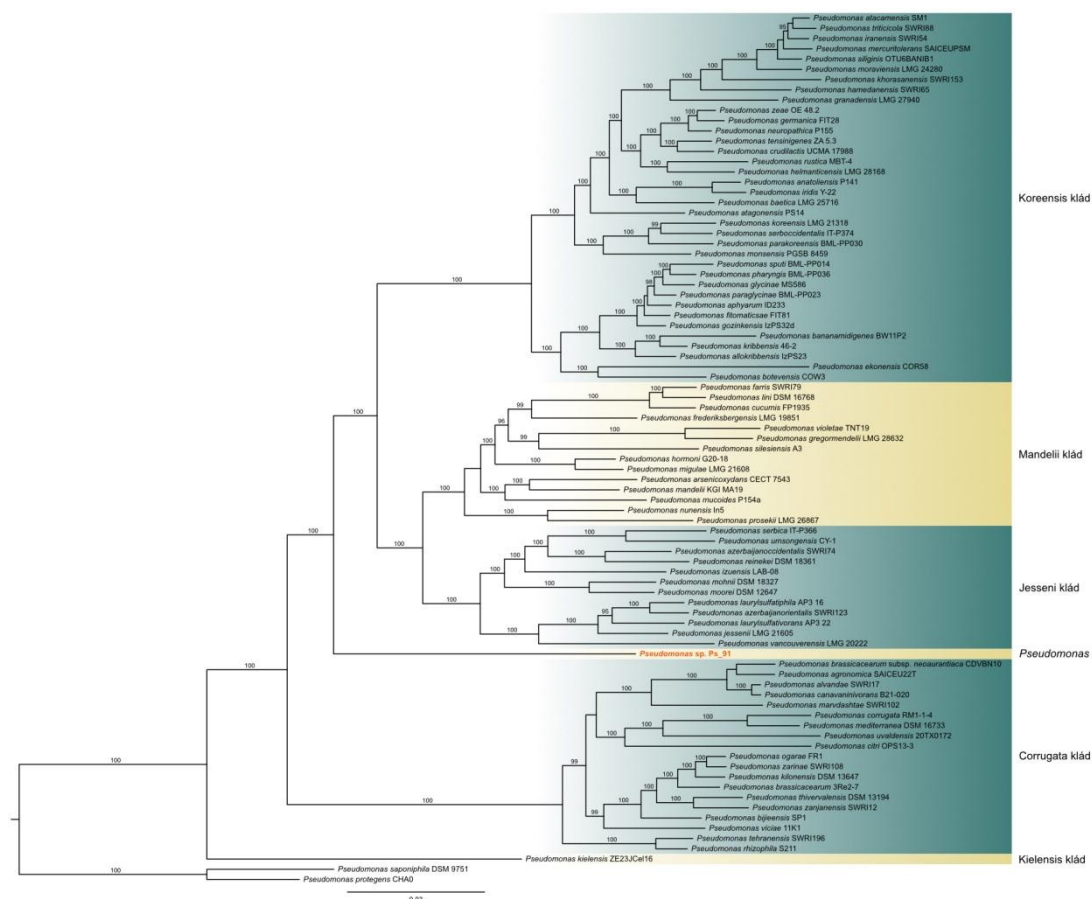


12. ábra A FastAni által számolt átlagos nukleotid-azonossági értékek (ANI) hőtérképe, ami tartalmazza a referencia szekvenciákat és a Ps_91 genomot is.

Digitális DNS-DNS hibridizációs (dDDH) vizsgálatot is végeztünk a Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 3.0) webszerver (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) használatával (Meier-Kolthoff és mtsai., 2021) a Jesseni kládba tartozó fajok genomjaival kiegészített adatsoron. A dDDH vizsgálatok esetén a fajhatárt 70%-nál szabják meg. A Ps_91 törzs a digitális hibridizációs vizsgálattal a *P. nunensis*, a *P. migulae*, a *P. hormoni* és a *P. frederiksbergensis* fajokkal mutatott legnagyobb hasonlóságot, de a kapott 28,3 és 28,4 közötti dDDH értékek jóval a 70%-os fajmeghatározási határérték alatt álltak.

Mind a 16S rRNS-*rpoD-rpoB* szekvencia alapú, mind pedig a genom alapú ANI és dDDH összehasonlító elemzések eredményei egybevégtően arra utaltak, hogy a Ps_91 törzs a *Fluorescens* szuperklád Mandelii kládjába tartozó önálló fajt képvisel. A legközelebb álló rokon faj meghatározása az ANI és dDDH vizsgálatoknál kapott eltérő eredmények alapján nem egyértelmű. Ezért a Ps_91 törzs pontos filogenetikai helyzetének meghatározása érdekében olyan filogenomikai elemzést végeztünk, amelybe bevontuk a *Corrugata*, *Mandelii*, *Kielensis* és *Jessenii* kládok tagjait, valamint külsőként a *Protegens* klád két tagját. Az elemzés tárgya ortológ gének csoportja volt, melyek minden genomban egy kópiában előfordulnak. Az ortológ gének azonosítását alapértelmezett paraméterekkel az OrthoFinder program 2.55 verziójával (Emms és Mtsai., 2019) végeztük. A keresés 1568 egykópiás ortológ gént eredményezett. A gének fehérje szekvenciáit a MAFFT v 7.49 verziójának segítségével, a G-INS-I opció használatával illesztettük. A 100 aminosavnál rövidebb illesztéseket kizártuk a további vizsgálatból. A végleges összefűzött adatsor 85 faj 1343 fehérje szekvenciájából állt (438.532 aminosav). A modell tesztelését és a maximum likelihood elemzést a 16S rRNS-*rpoD-rpoB* szekvenciaelemzés esetében leírtak szerint végeztük el (lásd fentebb). Az így kapott filogram a topológia tekintetében nagymértékben hasonlított a 3 génes adathalmazból kapott filogenetikai fához, kivéve a Ps_91 törzs pozícióját (**13. ábra**).

Az 1343 fehérjén alapuló elemzés kimutatta, hogy a Ps_91 törzs nem tagja a *Mandelii* kládnak, hanem a *Corrugata* és a *Jessenii* kládok között egy különálló kládot képez (**13. ábra**). Ezzel bizonyítottuk tekintettük, hogy a Ps_91 és a vele izogenikus izolátumok egy új fajt képviselnek. A továbbiakban *Pseudomonas* sp. nov. Ps_91-ként fogjuk említeni.



13. ábra Maximum likelihood (legnagyobb valószínűségű) filogenetikai fa, amely 1343, egyetlen kópiában jelen lévő ortológ fehérjén alapul. A legjobb fa statisztikai támogatottságát UFBoot segítségével állapítottuk meg. Csak a 95%-nál magasabb értékek kerültek feltüntetésre. Külcsoportként a *Pseudomonas saponiphila* DSM 9751^T és a *Pseudomonas protegens* CHA0^T törzseket használtuk.

6.2.1. Másodlagos metabolit klaszterek *in silico* azonosítása a Ps_91 törzs genomjában

A másodlagos metabolitok termeléséért felelős génklasztereket NRPS gén (nem-riboszomális peptid-szintetáz gén) vagy PKS (poliketid-szintáz) gén megléte indikálhatja a klaszterben. A teljes genomszekvencia *in silico* elemzésével tizenkét másodlagos metabolit génklasztert azonosítottunk, melyek közül 4 NRPS-t, 3 RiPP-et (riboszomálisan szintetizált és poszt-transzlációsan módosított peptid) és 1 PKS-t hordozott, valamint 4 egyéb kategóriába tartozó másodlagos metabolit génklasztert. Az azonosított 4 NRPS klaszter közül három nem mutatott jelentős hasonlóságot egyetlen ismert klaszterrel sem, azonban egy klaszter 97%-ban hasonlítottak egy ismeretlen funkciójú *P. mandelii* fajban talált NRPS klaszterhez. Az azonosított PKS-klaszter 97%-os hasonlóságot mutatott a *P. Vancouverensis* fajban azonosított aril-polién termelésért felelős klaszterrel. A RiPP klaszterek között egy

redox-kofaktor és egy lineáris azol-tartalmú peptid (LAP) klasztert valószínűsítettünk, melyek 77 és 62%-os hasonlóságot mutattak a *P. viridiflava* és a *P. izuensis* fajokban található RiPP klaszterekkel. A harmadik azonosított RiPP-klaszterben a gének 50%-os hasonlóságot mutattak egy, a *P. fluorescens* fajban található, eddig nem jellemzett RiPP-szerű klaszterben. Az egyéb klaszterek közé soroltak közül kettőt ismerünk a szakirodalomból. Ezek hidrogén-cianid bioszintéziséért felelősek. Ezekben a klaszterekben a gének 75%-os és 83%-os hasonlóságot mutattak a *P. gingeri*, illetve a *P. arsenicoxydans* fajok HCN-bioszintetikus génklasztéréivel. A fennmaradó két egyéb kategóriájú génklaszter közül az egyik a *P. nunensis* fajban is megtalálható NAGGN klaszterrel mutatott 100%-os hasonlóságot, míg a másik a *Rhizobium bangladeshense* faj ektoin bioszintézis klaszterével mutatott 60%-os egyezést.

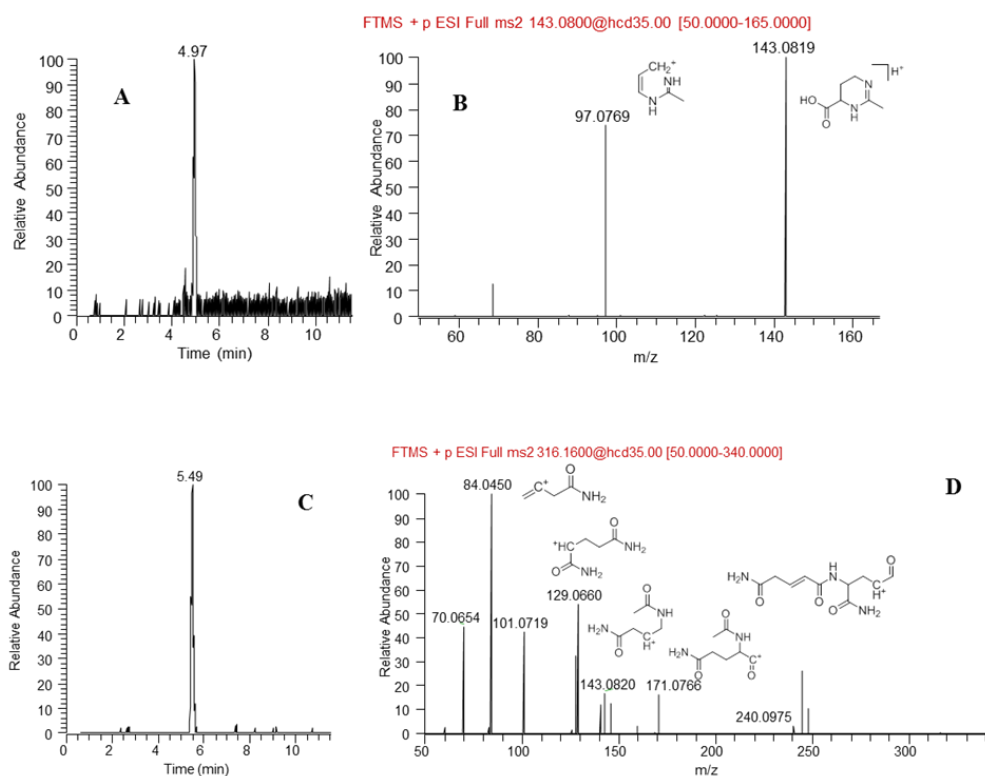
Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Ps_91 által képviselt új *Pseudomonas* faj feltehetően ektoint (Czech és mtsai., 2018) és NAGGN-t (Díaz és mtsai., 2022) tud termelni, ami alapján feltételezhetően jó ozmotikus stressztűréssel rendelkezik. A Ps_91 törzs feltehetően az oxidatív stresszel szemben is ellenálló, a potenciális aril-polién-termelésnek köszönhetően (Schöner és mtsai., 2016). A törzs a mezőgazdaságban hasznos lehet a HCN valószínűsíthető termelése miatt, amely nematocid és aphicid hatással rendelkezik (Kang és mtsai., 2018; Kang és mtsai., 2019), valamint LAP-termelő képessége miatt biokontroll ágensként is alkalmazható (Travin és mtsai., 2019) lehetne.

6.2.2. A klaszterek alapján feltételezett másodlagos metabolitok termelésének *in vivo* vizsgálata

A Ps_91 törzs 6.2.1. fejezetben részletezett *in silico* elemzése során detektált másodlagos metabolit génklaszterek jelenlétét kísérletesen is be szeretnénk volna bizonyítani. Ennek elérése érdekében a baktérium említett metabolitjait HPLC-HRMS módszerrel azonosítottuk.

6.2.3.1. Az ektoin és az NAGGN azonosítása

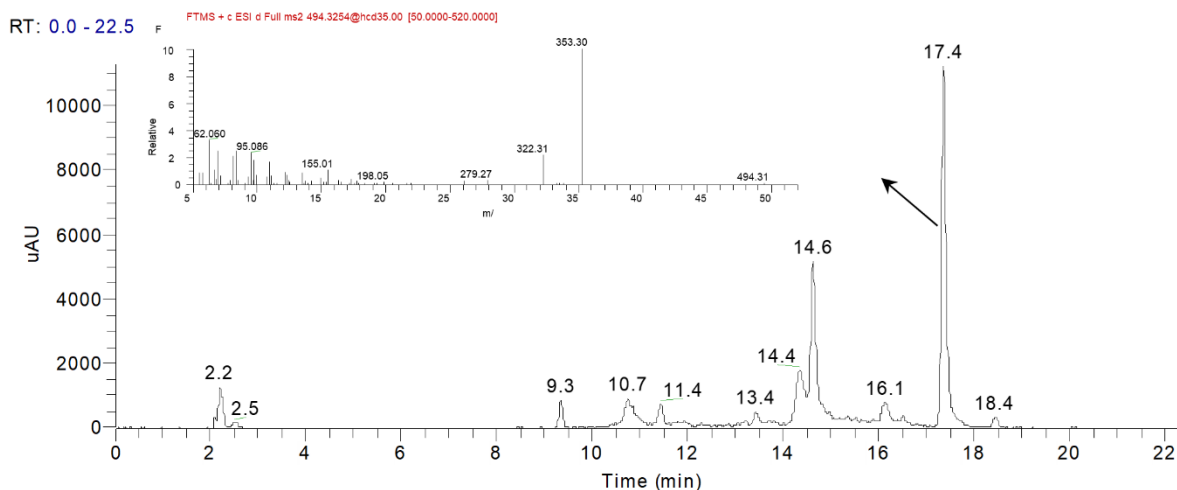
Mivel az ektoin és az NAGGN ozmotikus stressz hatására keletkezik (Reshetnikov és mtsai., 2011; Sagot és mtsai., 2010), a vegyületek jelenlétét magas sókoncentráció mellett tenyésztett Ps_91 sejtek extraktumából mutattuk ki (**14. ábra**). A módszer leírását az 5.2.11.2.3. fejezet tartalmazza.



14. ábra A magas sókoncentráció mellett tenyésztett Ps_91 sejtek extraktumában HPLC-HRMS módszerrel azonosított ektoin és az N-acetil-glutaminil-glutamin extrahált ion kromatogramja (A, C) és az azonosítást lehetővé tevő MS/MS spektruma (B, D).

6.2.3.2. Az aril-polién azonosítása

Az aril-polién típusú bakteriális pigmentek szerkezetileg és funkciójukat tekintve is hasonlítanak a karotinokhoz, védik a baktériumot a reaktív oxigéngyököktől (Schöner és mtsai., 2016). Ezen pigmentek mindegyike egy polién-karbonsavhoz kapcsolódó terminális arilrészt tartalmaz. A karotinokhoz hasonló polién rendszer tömegspektrometriás viselkedése alapján a Ps_91 izolátum metanolos extraktumában több aril-polién pigmentet is azonosítottunk, melyek közül az m/z 494,3254 vegyület van jelen a legnagyobb mennyiségben (15. ábra). A módszer leírását az 5.2.11.2.4. fejezetben tárgyaljuk.

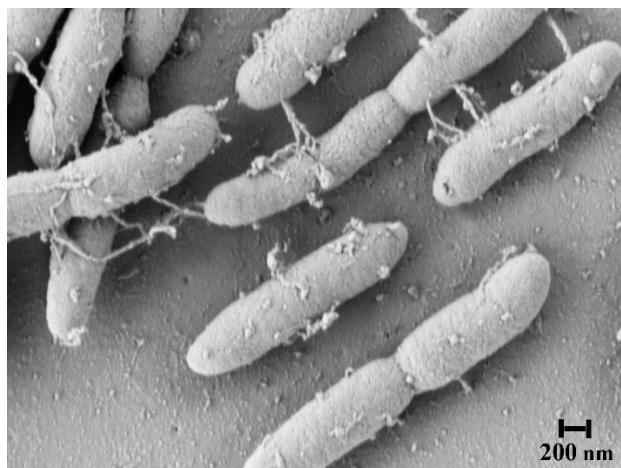


15. ábra A Ps_91 izolátum metanolos extraktumának 410 nm hullámhosszon felvett kromatogramja és az m/z 494,3254 vegyület MS/MS spektruma.

6.2.4. A *Pseudomonas* sp. nov. Ps_91 törzs fenotípus vizsgálata

A teljes genom szekvenálás alapján megállapított új *Pseudomonas* faj további jellemzéséhez és a rokon fajokkal való összehasonlítás érdekében növekedési és biokémiai tesztekkel fenotípus vizsgálatot hajtottunk végre.

A Ps_91 törzs LB táptalajon fehéres-sárgás, nyálkás, sima, kerek, nem átlátszó, ép szélű, 0,5-1,0 mm átmérőjű telepeket hoz létre 28 °C hőmérsékleten 24 órán át inkubálva. Pásztázó elektronmikroszkópiát alkalmazva megállapítottuk, hogy a sejtek 1,1-1,9 μm hosszúak és 0,2-0,5 μm széles pálcák (**16. ábra**). Rendszertani besorolásának megfelelően Gram-negatívnak bizonyult a Gram-festés során. Aerob, nem spóráképző baktérium 28 °C hőmérsékleti optimummal; és 0-5% NaCl (w/v) sótűréssel. Optimális sókoncentrációja 3-4% NaCl (w/v), az optimális környezeti kémhatás pedig pH= 6,0 értékre esett. A baktérium nem termel fluoreszcens pigmentet King's B agaron. A telepek szacharózzal kiegészített táptalajon mukoid fenotípust mutatnak, ami a levántermelésre utal. Véres agaron β -hemolitikus aktivitást mutatnak. A baktériumnak kataláz pozitív és citokróm-oxidáz-aktivitása van.



16. ábra A Ps_91 törzs pásztázó elektronmikroszkópos képe.
A méretskála: 200 nm.

Az API 20 NE biokémiai tesztek alapján a Ps_91 törzs pozitívnak bizonyult az eszkulin hidrolízisére, valamint az N-acetil-glükózamin, a kálium-glükonát, a kaprinsav, a trinátrium-citrát és az adipinsav asszimilációjára. A törzs negatív a D-glükóz fermentációjára, nitrátok redukciójára, indoltermelésre, arginin-dihidroláz aktivitásra, ureáz aktivitásra, zselatin hidrolízisre, β -galaktozidáz aktivitásra, továbbá a maltóz, L-arabinóz, D-mannit, mannóz, almasav és fenil-acetát asszimilációjára. A növekedési és biokémiai jellemzőket a Mellékletek **M2. táblázatában** foglaltuk össze. A Ps_91 fenotípusának más *Pseudomonas* fajok fenotípusával történő összehasonlítása érdekében az **M2. táblázatba** összegyűjtöttük a hasonló fenotípus vizsgálatokon átesett több *Pseudomonas* faj adatait is. A Ps_91 törzs a vizsgált fenotípus jellegek egyedi kombinációját mutatja, ami megerősíti a Ps_91 törzs új falként történő elkülönülését.

A zsírsav-metil észter profilt kvalitatívan és kvantitatívan fontos telített zsírsavak jellemzik, melyek a C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C10:0 3-OH, C12:0 2-OH, C12:0 3-OH, C17:0 ciklo, a legnagyobb mennyiségben jelen lévő zsírsav pedig a C16:0 volt (**M3. táblázat**). A *Pseudomonas* fajokra jellemző összevont 3-as zsírsav csoport (C16:1 ω 7c és/vagy C16:1 ω 6c) és az összevont 8-as csoportot (C18:1 ω 7c and/or C18:1 ω 6c) nem detektáltuk a *Pseudomonas* sp. nov. Ps_91 törzsben. A C10:0 3-OH és a C17:0 ciklo zsírsavak kivételével a Ps_91 törzs zsírsavprofilja megegyezett a *P. jessenii* és *P. vancouverensis* törzsek zsírsavprofiljával. Összességében a Ps_91 törzs zsírsavprofilja is egyedinek bizonyult a többi *Pseudomonas* faj képviselőihez képest.

6.2.5. A poláris lipidek és izoprenoid kinonok vizsgálata a Ps_91 törzsben

A Ps_91 törzs további jellemzésének érdekében meghatároztuk a törzs poláris lipid és izoprenoid kinon tartalmát. A Ps_91 törzs fő poláris lipidjei a foszfatidil-kolin, a foszfatidil-etanolamin, a foszfatidil-glicerol, a lizofoszfatidil-etanolamin és a lizofoszfatidil-glicerol voltak. Az eredmények összhangban vannak a szakirodalomban található *Pseudomonas* izolátumokra jellemző poláris lipid tartalommal.

Az izoprenoid kinonok közül az ubikinon 9 jelent meg a legnagyobb mennyiségben, ezen kívül ubikinon 8, ubikinon 4 és ubikinon 2 is detektálható volt a mintánkban.

A törzsre jellemző poláris lipideket és izoprenoid kinonokat a Mellékletek című fejezetben található **M4. táblázat** foglalja össze.

6.3. Másodlagos metabolitok vizsgálata a rizoszféra *Pseudomonas* izolátumok különböző tápközegekben történt tenyésztését követően

A metabolikusan sokoldalú, számos másodlagos metabolit termelésére képes *Pseudomonas* törzsek növekedésére és biokontroll potenciáljára hatással vannak a környezeti feltételek. Ezért a másodlagos metabolit profil vizsgálathoz az izolátumok különböző összetételű tápközegekben (LB, King és PDB) nevelt tenyészetéből indultunk ki. Az LB tápközeget azért választottuk, mivel a baktériumok számára általánosan használt tápközeget, és ebben a közegben történt az összes konfrontációs kísérlethez a baktériumok előtenyésztése, míg magát a konfrontációs tesztet PDB tápközegekben végeztük, ezért a PDB tápközeget is bevontuk a vizsgálatba. A King tápközeget pedig azért választottuk, mert a szakirodalmi adatok alapján kiterjedt pigmenttermelés történik ebben a tápközegekben (King és mtsai., 1954).

Az izolátumok LB, King és PDB és tápoldatokban történő tenyésztését követően HPLC-HRMS vizsgálattal összesen 33 bioaktív metabolitot tudtunk azonosítani a sejtmentes fermentléből, melyek főleg antibiotikumok, ciklikus peptidek és homoszerin-laktonok voltak (**3. táblázat**). A legtöbb metabolit a King (n=27) és a PDB (n=23) tápoldatokban keletkezett, az LB tápoldatban csupán 18 metabolitot azonosítottunk (**3. táblázat**). A metabolitok közül 15 vegyületet mindhárom tápoldatban detektáltunk.

3. táblázat Az ismert *Pseudomonas* bioaktív metabolitok előfordulása az izolátumokban.

	Metabolit	Összegképlet	LB	King	PD	RT (min)	Detektált ion (<i>m/z</i>)
Biokontroll metabolit	2-acetamidfenol	C ₈ H ₉ NO ₂	+	+		9,26	152,0711
	2-hidroxifenazin	C ₁₂ H ₈ N ₂ O		+	+	12,39	197,0709
	piocianin	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O	+	+		13,72	211,0866
	fenazin-1-karbonsav	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂	+	+	+	13,34	225,0659
	metil-fenazin-1-karboxilát	C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂	+	+		13,13	239,0812
	ciklo-(Pro-Val)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂		+		8,73	197,1285
	ciklo-(Pro-Met)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	+	+	+	9,35	229,1007
	ciklo-(Tyr-Pro)	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	+	+	+	9,27	261,1233
	lahorénsav C	C ₁₆ H ₂₀ O ₂	+	+	+	13,88	245,1537
	lahorénsav B	C ₁₇ H ₂₂ O ₃		+		13,93	275,1638
	massetolid E	C ₅₃ H ₉₃ N ₉ O ₁₆	+	+	+	17,24	1112,68
	viszkozin	C ₅₄ H ₉₅ N ₉ O ₁₆	+	+	+	17,5	1126,695
	massetolid A/D/G	C ₅₅ H ₉₇ N ₉ O ₁₆		+		17,86	1140,711
	massetolid A/D/G	C ₅₅ H ₉₇ N ₉ O ₁₆		+		17,68	1140,712
	massetolid H	C ₅₆ H ₉₉ N ₉ O ₁₆	+	+	+	18,32	1154,727
	CLP1		+		+	17,96	690,9165
	CLP2		+	+	+	21,02	1036,687
	CLP3			+	+	16,39	1109,831
	CLP4			+		16,05	1160,647
	CLP5			+	+	17,49	1171,753
	CLP6			+		16,3	1212,744
QS vegyület	O-etil-homoszerin lakton	C ₆ H ₁₃ NO ₃	+	+	+	1,94	148,0974
	N-butiril-L-homoszerin lakton	C ₈ H ₁₃ NO ₃		+	+	7,49	172,09723
	N-dekanoil-L-homoszerin lakton	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	+		+	14,98	256,1907
	N-oktanoil-homoszerin lakton	C ₁₂ H ₂₁ NO ₃			+	13,55	228,1595
	N-(3-oxodekanoil) - homoszerin lakton	C ₁₄ H ₂₃ NO ₄	+	+	+	13,8	270,17
	N-(3-hidroxi-dekanoil) - homoszerin lakton	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄	+	+	+	13,34	272,1855
	N-(3-hidroxi-oktanoil)- homoszerin lakton	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄		+		12,55	244,1544
	N-(3-hidroxi-tetradekanoil) - homoszerin lakton	C ₁₈ H ₃₃ NO ₄			+	14,2	328,2495
	N-hexanoil-homoszerin lakton	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	+	+	+	11,02	200,1281
	N-(3-hidroxi-dodekanoil) - homoszerin lakton	C ₁₆ H ₂₉ NO ₄			+	12,83	300,2176

Metabolit	Összegképlet	LB	King	PD	RT (min)	Detektált ion (<i>m/z</i>)
N-(3-hidroxi-hexadekanoil)- homoszerin lakton	C ₂₀ H ₃₇ NO ₄			+	14,01	356,2806
2-aminoacetofenon	C ₈ H ₉ NO	+	+	+	8,7	136,0758

A PDB tápoldatban keletkezett metabolitok mennyiségi összehasonlítását a Mellékletek című fejezet **M5. ábrán** található hőtérképén lehet áttekinteni.

A *Pseudomonas* fajokra általánosan jellemző antibiotikumok közül piocianint és fenazinszármazékokat, fenazin-1 karbonsavat és a 2-hidroxifenazint detektáltuk.

A massetolidok a CLP-típusú antibiotikumok közé sorolhatók, azon belül is a viszkozinok csoportjához. Mintáinkban massetolid A/D/E/G és H viszkozin származékokat detektáltunk (Gerard és mtsai., 1997, de Bruijn és mtsai., 2008). A massetolid A-ról ismeretes, hogy a baktériumok rajzó mozgásának kialakításában és a biofilm képzésben létfontosságú, továbbá ismert gombapatogének növekedését gátló biokontroll hatásáról is (de Bruijn és mtsai., 2008).

A lahorénsavak aromás karbonsavak, amelyek közül a lahorénsav B Mehnaz és munkatársai kísérletei alapján mérsékelt gátló hatást fejt ki *Mycobacterium tuberculosis* baktériummal szemben, azonban nincs sem citotoxikus-, sem gombaellenes hatása (Mehnaz és mtsai., 2021). A lahorénsav B a bioszintetikus útvonal terméke, míg a lahorénsav A a lahorénsav B bioszintézisének intermediere. A fenazinszármazékokkal való összehasonlítás során a fenazin-1-karbonsav a mérsékelt növekedésgátláson túl a *Colletotrichum falcatum* hifadenzitását is csökkenti. A 2,8-dihidroxifenazin sem gombaellenes, sem citotoxikus hatással nem rendelkezik, csakis antibakteriális (pl. *Bacillus cereus* és *Arthrobacter crystallopoietes* ellen) hatással bírnak.

A ciklodipeptidek két aminosavból álló laktámgyűrűvel rendelkező vegyületek, melyeket főleg baktériumok és gombák termelnek. Sokrétű biológiai funkcióval rendelkeznek, melyek közül kiemelkedő jelentőségű antimikrobiális és antioxidáns hatásuk (Widodo és mtsai., 2023).

6.4. A *Pseudomonas* törzsek hidrogén-cianid termelő képessége

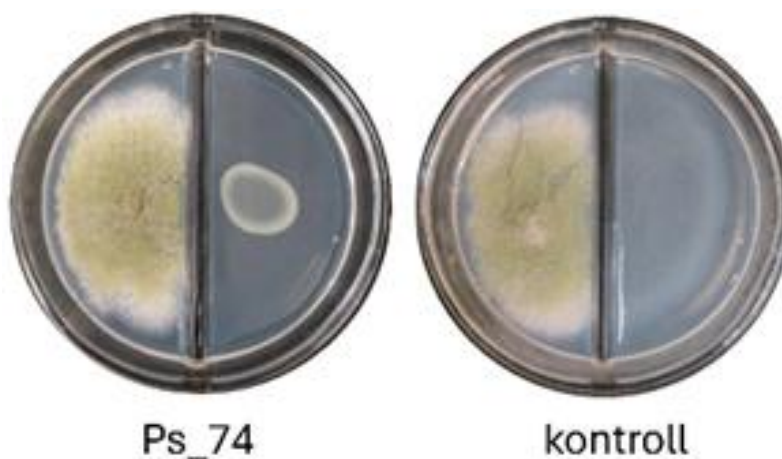
A kukorica rizoszférából izolált *Pseudomonas* törzsek HCN termelő képességét tesztelve azt tapasztaltuk, hogy az 51 *Pseudomonas* izolátum több mint harmada rendelkezett HCN termelő képességgel (a termelők részletes listája a Mellékletek fejezet **1. Mellékletében** van feltüntetve). A *P. chlororaphis* csoportba tartozó izolátumok minden esetben, a *P. koreensis* csoportba tartozó izolátumok közül 3, a *P. fluorescens* csoportba tartozó izolátumok közül 4 és a Ps_91 által reprezentált faj vizsgált 5 izolátumának mindegyike termelte a HCN-t. Rijavec és munkatársai szerint a HCN-nak a talajban a foszfát hozzáférhetőségében van szerepe (Rijavec és mtsai., 2016).

6.5. A *Pseudomonas* izolátumok és az *A. flavus* közötti kölcsönhatások vizsgálata

Mivel a PhD munka célja az izolált *Pseudomonas* törzsek és az *A. flavus* közötti kölcsönhatások jellegének vizsgálata volt, különböző kísérleti tesztrendszereket hoztunk létre, hogy a kölcsönhatásokban részt vevő volatilis, illetve oldott (diffúzibilis) vegyületek hatását tanulmányozhassuk.

6.5.1. Volatilis vegyületek antagonista hatásának vizsgálata szilárd fázisú *A. flavus*-*Pseudomonas* rendszerben

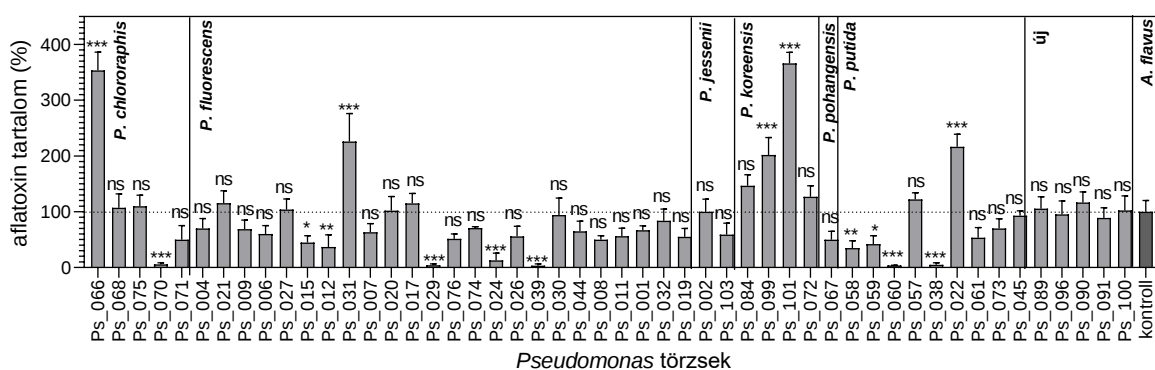
A baktériumok és gombák egyaránt képesek illékony vegyületeket termelni, melyek a mikrobák közötti interakciókat befolyásolják. Bizonyos BCA-k a növekedésük során termelt illékony vegyületeikkel képesek gombaellenes hatást kiváltani, amely támogatja mezőgazdaságban való felhasználhatóságukat. Ezért megvizsgáltuk, hogy az *A. flavus* növekedésére és toxintermelő képességére hatással vannak-e az általunk izolált *Pseudomonas* baktériumok által termelt illékony komponensek. Kétosztatú Petri-csésze alkalmazásával közös légtérben, de egymástól fizikailag elkülönülten felnevelt *A. flavus* vs. *Pseudomonas* izolátum tenyészetek növekedési képességét, valamint a gomba aflatoxin termelését vizsgáltuk a **17. ábrán** bemutatottak szerint.



17. ábra A volatilis vegyületek antagonista hatásának vizsgálatára beállított kísérleti elrendezés szemléltetése.

A kétosztatú csésze egyik oldalán *A. flavus* (bal), a másik oldalán *Pseudomonas* izolátumot teszteltünk (jobb). A bal oldali Petri-csésze *A. flavus* vs. Ps_74 baktérium konfrontációját mutatja. A jobb oldali Petri-csésze a kontrollként szolgáló *A. flavus* önálló tenyészetét mutatja.

Eredményeink szerint a vizsgált *Pseudomonas* izolátumok egyike sem termelt olyan illékony vegyületet, melyek befolyásolták volna a gomba növekedését, azonban az *A. flavus* aflatoxin termelése bizonyos *Pseudomonas* izolátumok illékony vegyületének hatására jelentősen lecsökkent, vagy megemelkedett (**18. ábra**). Összefüggést nem találtunk az izolátumok *Pseudomonas* csoporthoz való tartozása és a toxintermelés modulálása között. Például a *P. chlororaphis* csoport izolátumai közül 3 nem befolyásolta a toxintermelést, egy izolátum (Ps_66) szignifikáns növekedést (3,5-szeres növekedés, $P < 0,001$), egy pedig (Ps_70) szignifikáns toxinszint csökkenést (a kontrollhoz (100%) képest 5,9% termelődött, $P < 0,001$) eredményezett a kontrollként vizsgált *A. flavus* önálló tenyészetéhez képest. Számunkra a legfontosabb eredmény az, hogy a *P. fluorescens* és a *P. putida* csoportokban voltak olyan izolátumok (Ps_29, 39, 60 és 38), melyek volatilis metabolitjának hatására a toxintartalom a kontrollhoz (100%) képest 5% alá csökkent ($P < 0,001$). A Ps_91 izolátum által képviselt új faj egyik izolátuma sem befolyásolta a toxintermelést.



18. ábra Szilárd fázisú, illékony komponens általi, *A. flavus*-*Pseudomonas* konfrontációban a gombapartner micéliumából mért AFB1 toxin relatív aránya a kontroll *A. flavus* önálló tenyészet AFB1 tartalmához (100%) viszonyítva. A szignifikancia vizsgálatot a Student t-tesztel végeztük. A szignifikáns eltéréseket csillagok jelölik (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns: nem-szignifikáns).

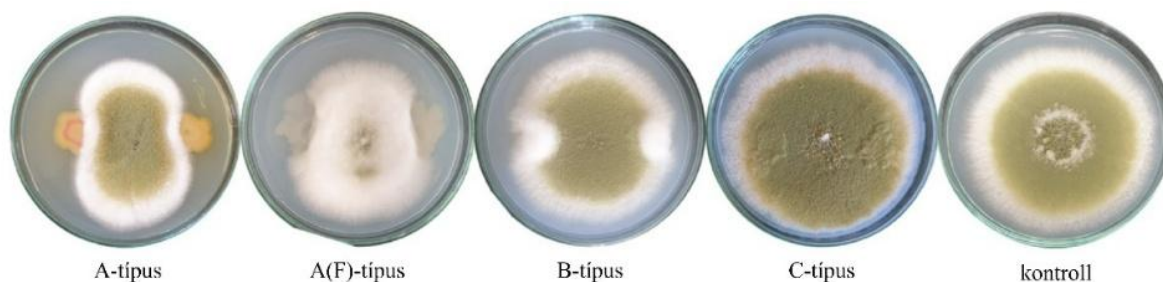
Az illékony vegyületek közül az izolátumok HCN termeléséről voltak kísérlettel alátámasztott adatunk, ezért a konfrontációs kísérlet eredményét megvizsgáltuk a törzsek HCN termelő képességének fényében. Van-e kapcsolat a bakteriális HCN termelés és a gomba toxintermelésének megváltozása között? Egy lehetséges HCN által generált túltermelés magyarázható lehetne a HCN azon hatásával, hogy gátolja a légzési lánc terminális citokróm c-oxidáz enzimét, ami megzavarja a gomba normális fiziológiai folyamatait, stresszhelyzetbe kerül, amire toxin túltermeléssel reagál, így védve magát a

környezeti stressz hatásaitól. A citokróm c-oxidáz gátlása összefüggésben lehet a citokróm P-450 oxidoreduktáz enzim aktiválásával, ami a mikotoxinok előállításáért felelős enzim. Mivel 11 esetben tapasztaltunk toxin túltermelődést, melyből négy izolátum HCN-termelő törzs volt, a többi izolátum viszont nem, így a HCN nem lehetett a túltermelés kiváltó oka. A gombatoxin termelés jelentős lecsökkenése tekintetében csak a Ps_70 izolátum képes a HCN termelésére, a Ps_29, 39, 60 és 38 izolátumok nem. Így megállapítottuk, hogy az ismert volatilis vegyület, a HCN nincs hatással az *A. flavus* toxintermelésére. Az ezt követő kutatásainkban többek között arra fogunk fókuszálni, hogy kiderítsük, hogy a Ps_70, 29, 39, 60 és 38 izolátumok melyik volatilis metabolitja képes az *A. flavus* toxintermelését visszaszorítani.

6.5.2. A *Pseudomonas* izolátumok hatása az *A. flavus* növekedésére és AFB1 termelésére szilárd tápközegben

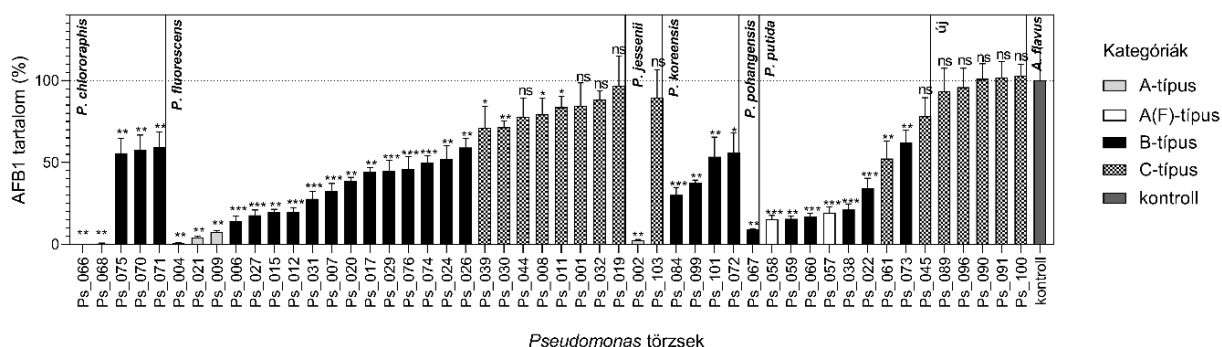
Szilárd közegben végzett konfrontációs kísérletekkel megvizsgáltuk, hogy a *Pseudomonas* izolátumok hogyan befolyásolják az *A. flavus* növekedését és toxintermelését.

A baktériumokat az *A. flavus* gombával együtt PDA táptalajon együtt tenyésztettük 7 napon keresztül, 28 °C hőmérsékleten, majd dokumentáltuk a konfrontációs teszt eredményét a gomba morfológiája és a gomba toxintartalma alapján. Az *A. flavus* konfrontációban mutatott morfológiája alapján négy különböző típusú kölcsönhatást különböztettünk meg, melyet a **19. ábra** szemléltet. Az A- és A(F)- típusú kölcsönhatások során a gomba növekedét csak részben gátolta a baktérium jelenléte, továbbá az A(F)-típusnál (F=fluffy) a gomba konídiumképzése redukálódott miközben gombatelep teljes felületén aeriális hifaburjánzást figyeltünk meg. A B-típusú kölcsönhatás során a gomba növekedése mérsékelten gátlódott, és a gomba lokálisan jellegzetes aeriális hifaburjánzást produkálva képes volt átnőni a baktériumtelepen. A C-típusú kölcsönhatás során a baktérium jelenléte nem befolyásolta a gomba növekedését. A micéliumok minden makromorfológiai változás nélkül ránőttek a baktériumtelepre, anélkül, hogy a konídiumképződés redukálódott volna, és aeriális micéliumok sem jelentek meg. Ahogyan azt más *Pseudomonas* törzseknél is leírták, az általunk vizsgált *Pseudomonas* izolátumok sem tudták szilárd közegben az *A. flavus* növekedését teljesen gátolni (Palumbo és mtsai., 2006; Palumbo és mtsai., 2007).



19. ábra A szilárd fázisú *A. flavus* – *Pseudomonas* konfrontációs tesztek interakciós típusainak (A-, A(F)-, B- és C-típus) makromorfológiája, valamint a kontrollként szolgáló *A. flavus* önálló tenyésztet (kontroll) makromorfológiája.

Bár a vizsgált *Pseudomonas* izolátumok nem mindegyike befolyásolta látványosan a gomba növekedési képességét a szilárd konfrontációs kísérletben, az *A. flavus* aflatoxin termelése majdnem minden *Pseudomonas* izolátummal történő találkozás hatására szignifikánsan megváltozott az önállóan tenyésztett kontroll *A. flavus* toxintartalmához képest (**20. ábra**). Érdekes megjegyezni, hogy a toxintartalom mérést a gombatelep közepéből kivágott 1 cm átmérőjű agaros telep-korongból végeztük (az *A. flavus* önálló tenyésztetében az AFB1 tartalom $6,6 \pm 0,4$ μg volt).



20. ábra Az *A. flavus* interakciós partnerben mért relatív aflatoxin B1 (AFB1) tartalom szilárd fázisú *A. flavus* – *Pseudomonas* konfrontációs tesztekben a kontrollként szolgáló *A. flavus* önálló tenyésztet AFB1 tartalmához képest. A szignifikancia vizsgálatot a Student t-tesztel végeztük. A szignifikáns eltéréseket csillagok jelölik (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns: nem-szignifikáns).

Az *A. flavus* gombával való kölcsönhatás során a vizsgált *Pseudomonas* izolátumok közül 3 esetben (Ps_4, Ps_66 és Ps_68), az AFB1-tartalom a kontroll gombában mért AFB1-tartalomhoz viszonyítva kevesebb mint 1% volt. Mérlegeltük annak lehetőségét, hogy nem a gomba AFB1-termelése sérül, hanem a *Pseudomonas* törzsek bocsájtanak ki AFB1-et átalakító vagy azt degradáló hatóanyagot. Nem tartjuk valószínűnek, hogy a feltételezett hatóanyag a táptalajban a gombatelep közepéig úgy el tud diffundálni, hogy olyan

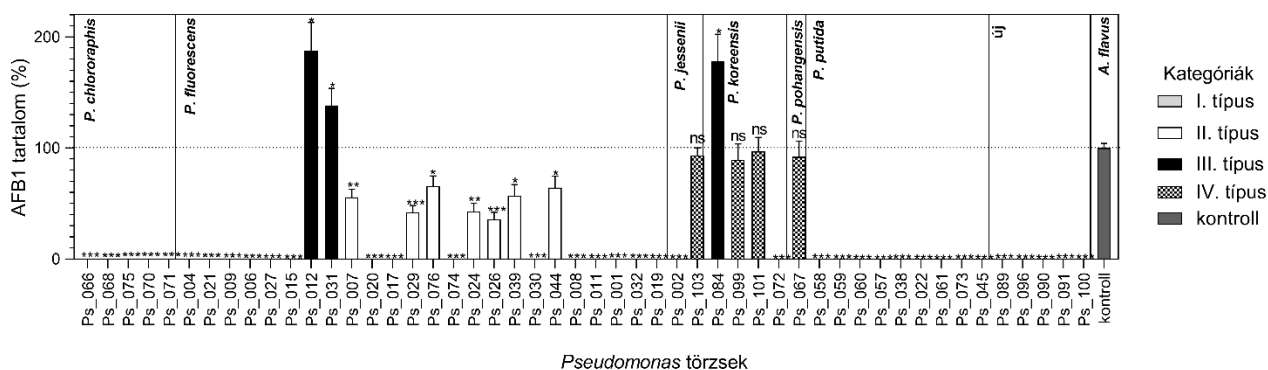
koncentrációban jelen legyen, ami az AFB1 majdnem 100%-át átalakítja vagy degradálja. Ezzel összhangban a Ps_4, Ps_66 és Ps_68 izolátumokkal történt konfrontációk esetén a gombamintából semmilyen AFB1 szerkezetéből levezethető származék vegyületet nem találtunk (pl. prekursorokat vagy bomlástermékeket). Ezért a legkézenfekvőbb magyarázat arra, hogy a Ps_4, Ps_66 és Ps_68 törzsek majdnem 100%-kal visszaszorítják az AFB1 szintjét a gombában az, hogy olyan hatékony diffúzibilis metabolitot szabadítanak fel, amelyek az AFB1 toxintermeléséért felelős kulcsfontosságú szabályozó útvonalakat zavarják meg és génszabályozás szintjén gátolják a gomba AFB1 termelését.

Az izolátumok 22%-a ($n=11$) nem volt hatással a gombapartner AFB1 tartalmára, mialatt a többi izolátum (78%, $n=39$) különböző mértékben, de hatással volt az AFB1 termelésre. Az A-típusú kölcsönhatások során a felhalmozódott AFB1 tartalom 19,5% alatt volt. A B- és C-típusú kölcsönhatásokban ezzel szemben, 9,1% ($\pm 0,6$) - 62,0% ($\pm 7,7$), illetve 52,4% ($\pm 10,8$) - 103,0% ($\pm 6,8$) AFB1-tartalmat mértünk. A korrelációs elemzés erős korrelációt ($r = 0,88$, $P < 0,0001$) mutatott a gombaminta toxintartalma és a kölcsönhatás típusa között, azonban nem találtunk korrelációt a *Pseudomonas* izolátumok taxonómiai besorolása és a gombaminta toxintartalma között.

6.5.3. Az izolátumok hatása az *A. flavus* növekedésére és AFB1 termelésére folyadékfázisban

Bár a természetben előforduló konfrontációt a szilárd fázisú konfrontációs kísérletek (beleértve a volatilis konfrontációt is) képezik le legjobban, mégis indokoltnak láttuk a konfrontációkat folyadéktenyészetes kísérleti rendszerben is megvizsgálni. Úgy gondoltuk, hogy ha a konfrontációs partnerek diffúzibilis bioaktív anyaggal hatnak a másik mikroba életműködésére, akkor a folyékony közeg kiküszöböli a szilárd tápközeg állította diffúziós akadályt és megbízhatóbban detektálhatjuk, ha bioaktív hatóanyag jelenik meg a konfrontációban. Másrészt egy süllyesztett folyadéktenyészetben sosem jut annyi oxigénhez a gomba, mint szilárd fázisú felszíni tenyészetben. Ezért azt is feltételezhetjük, hogy pusztán a hozzáférhető oxigén mennyiségének megváltozása más biokémiai útvonalak megnyilvánulását eredményezheti. A folyadékkultúrában vizsgált konfrontációs kísérleteknél is felállítottunk konfrontációs kategóriákat, ahol a gomba micélium összes száraztömegét és a fermentléből kimutatott AFB1 mennyiségét osztályoztuk az önállóan tenyésztett *A. flavus* kontrolléhoz viszonyítva (az *A. flavus* kontroll önálló kultúrában átlag 2,7 $\mu\text{g/ml}$ AFB1 tartalmat mértünk). Ez alapján négy folyadékkultúras konfrontáció típust

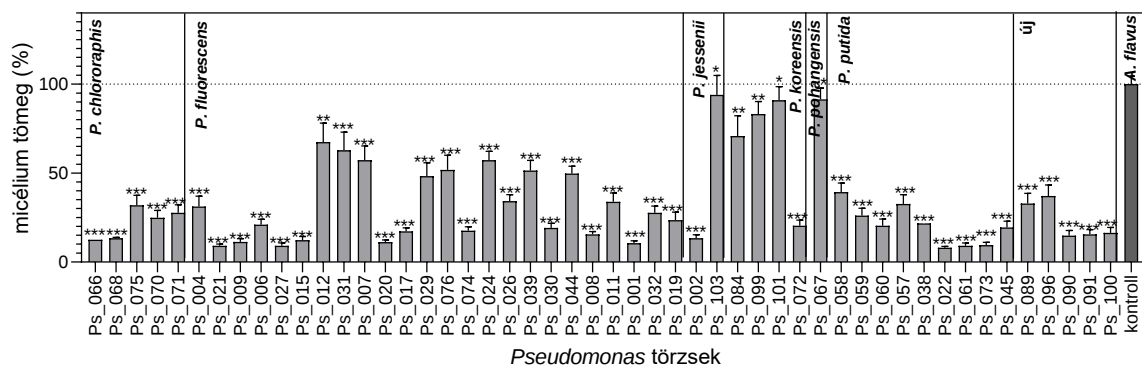
tudtunk elkülöníteni, melyeket I-IV jelöléssel láttunk el (21 és 22. ábra). Az I. típusú kölcsönhatás során az *A. flavus* micélium tömegében legalább 39,3% -os csökkenés mutatkozott (22. ábra) úgy, hogy nem volt detektálható AFB1 tartalom a fermentlében (21. ábra). A II. típusú kölcsönhatás során a gomba kontroll tenyészetéhez viszonyítottan csökkent micélium képződést és csökkent AFB1 termelést mutatott (21 és 22. ábra). A III. típusú kölcsönhatás során a kontrolltenyészetéhez képest csökkent a micélium képződés és az AFB1 termelésben túlermelődést tapasztaltunk (21 és 22. ábra). A IV. típusú kölcsönhatás során nem tapasztaltunk konfrontációs hatást, azaz sem a gomba növekedését tükröző micélium száraztömeg, sem a toxintermelés nem tért el a kontrollként mért *A. flavus* önálló tenyészet adataitól (21 és 22. ábra). A *Pseudomonas* izolátumok 72%-a (n=36) I-es típusú, 14%-a II-es típusú, 6%-a III-as típusú és 8%-a IV-es típusú kölcsönhatást mutatott (21. ábra).



21. ábra A folyadékfázisú konfrontációs tesztekben a fermentléből mért relatív AFB1 tartalom a kontroll önálló *A. flavus* tenyészet fermentlévéből mért AFB1 tartalomhoz képest (%).

A szignifikancia vizsgálatot a Student t-tesztel végeztük. A szignifikáns eltéréseket csillagok jelölik (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns: nem-szignifikáns).

A gombák micéliumnövekedésének különböző mértékű gátlása a tápanyagokért folytatott versengésnek, vagy a micélium növekedését befolyásoló bakteriális enzimek/metabolitok jelenlétének tulajdonítható.



22. ábra A folyadékfázisú konfrontációs tesztekben felnőtt *A. flavus* micélium relatív száraz tömege a kontroll önálló *A. flavus* tenyészet micélium száraz tömegéhez képest (%).

A szignifikancia vizsgálatot a Student t-tesztel végeztük. A szignifikáns eltéréseket csillagok jelölik (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: nem-szignifikáns).

Számottevő különbségeket találtunk az AFB1-tartalomban, amikor ugyanazon baktériumizolátumok szilárd- és folyadék tenyészeit hasonlítottuk össze. A gomba toxintermelése a III. típusú folyadékfázisú kölcsönhatásokban fokozódott a Ps_12, Ps_31 és Ps_84 izolátumokkal való kölcsönhatás során. Ugyanezek az izolátumok azonban szilárd közegben B típusú kölcsönhatást mutattak, azaz 20-30%-ra tudták csökkenteni az AFB1-termelést (a kontroll tenyészet 100%-os AFB1-tartalommal rendelkezett).

A *Pseudomonas* izolátumok AFB1-szabályozó képességének szilárd- és folyadék konfrontációs tesztekben történő eltérése magyarázható szilárd/folyadék-fázisfüggő bakteriális effektorvegyületek eltérő keletkezésével, amelyek ellentétes hatással vannak a gomba toxintermelésére, akár ugyanazon effektorvegyületek koncentrációjával folyadék- és szilárd közegben. Az utóbbi hipotézist támasztják alá azok a tanulmányok, amelyek kimutatták, hogy az *A. flavus* esetében az aflatoxin túltermelése akkor következik be, ha a gomba szuboptimális dózisú antifungális szernek van kitéve (Ferrigo és mtsai., 2019). A mögöttes mechanizmus tisztázása nélkül Campos-Avelar és munkatársai szintén megfigyelték a gombatoxin-túltermelését (ochratoxin) bizonyos *Streptomyces* izolátum *Penicillium verrucosum* törzsekkel történő kölcsönhatása során (Campos-Avelar és mtsai., 2020).

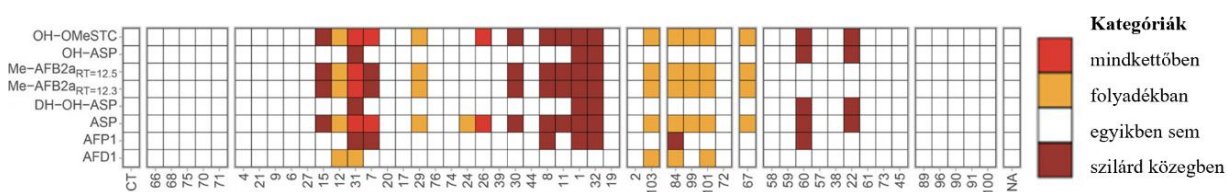
A fenti eredmények azt mutatták, hogy a baktériumok antagonista viselkedése különböző mértékben jelen van mind a folyadék, mind a szilárd konfrontációs tesztek során; azonban nem találtunk szignifikáns korrelációt a szilárd és folyadékkultúrákból származó adatok között. Kivételt képez 3 izolátum (Ps_66, Ps_68 és Ps_4), amelyek mind a szilárd, mind a folyadék konfrontációs tesztek során teljesen gátolták a toxintermelést.

6.5.4. A *Pseudomonas* izolátumok AFB1 bontó képességének tesztelése

Néhány *Pseudomonas* önálló tenyésztete képes a tápoldathoz adagolt AFB1 bontására, feltehetően enzimatis reakciókon keresztül (Singh és mtsai., 2022). Ezért az általunk vizsgált *Pseudomonas* izolátumok AFB1 módosító képességét teszteltük oly módon, hogy a baktériumok 1 napos PDB tenyésztéhez AFB1 hatóanyagot adtunk (2 µg/ml), majd három napos inkubációt követően mértük a tenyészet AFB1-tartalmát. Egyik izolátum esetén sem csökkent a tenyészet AFB1-tartalma, amiből arra következtettünk, hogy egyik izolátum sem bontotta vagy alakította át a toxint.

6.5.5. Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek képződésének azonosítása és értelmezése

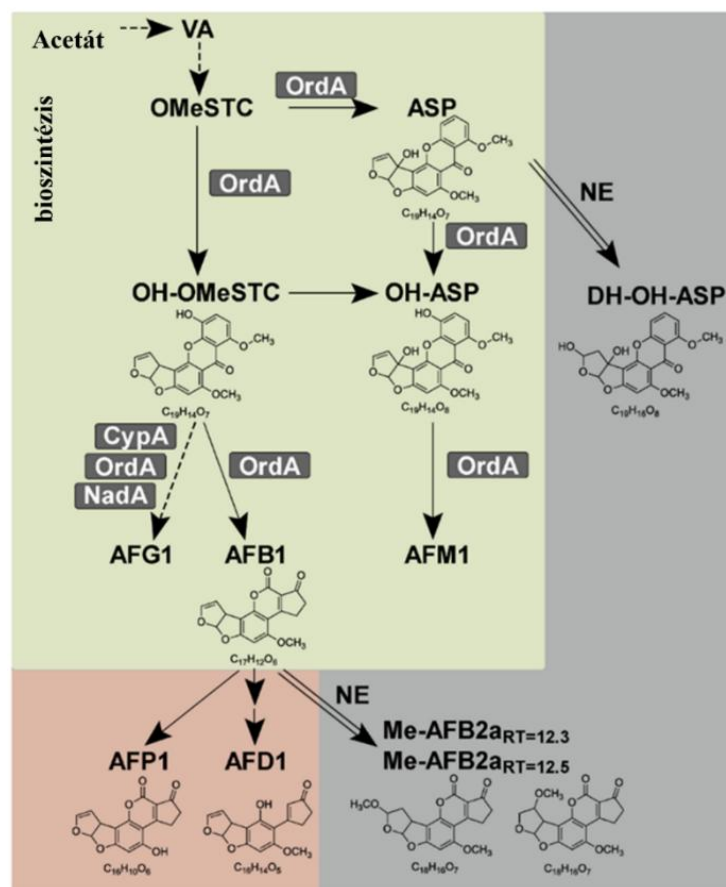
Annak érdekében, hogy közelebb jussunk annak megértéséhez, hogy a különböző konfrontációkban milyen mechanizmus áll az AFB1 szintjének változása mögött, nem célzott metabolomikai vizsgálatot végeztünk HPLC-HRMS módszer segítségével. Különösképpen az AFB1 bioszintetikus prekursorait és a lehetséges összes, AFB1-gyel kapcsolatba hozható degradációval, vagy biotranszformációval képezhető AFB1 származékokat próbáltuk azonosítani. A mérést mind a szilárd-, mind pedig a folyadékfázisú konfrontációs tesztekre kiterjesztettük (23. ábra). Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek azonosítását a kloroformos és metanolos extraktumokban talált összes vegyület kísérletes MS/MS fragmentációs spektrumának és a toxin, valamint a feltételezett biotranszformáció során eltolódott fragmentumok (oxidált, hidroxilált, dehidratált stb.) spektrumának összehasonlításával végeztük.



23. ábra Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek megjelenése az egyes szilárd és folyadék konfrontációk során. Az **OH-OMeSTC**, 11-hidroxi-O-metilsterigmatocisztin; **ASP**, aspertoxin; **OH-ASP**, 11- hidroxiaspersertoxin; **DH-OH-ASP**, dihidroxiaspersertoxin; **Me-AFB2a RT=12,5**, és **Me-AFB2a RT=12,3**, metoxi-aflatoxin B2a 2 izomere; **AFP1**, aflatoxin P1; és **AFD1**, aflatoxin D1. A színkódolás jelentése az ábrán bemutatott magyarázaton látható.

A vegyületek közül a $C_{16}H_{10}O_6$, $C_{16}H_{14}O_5$ és a két különböző retenciós időnél jelentkező $C_{18}H_{16}O_7$ (24. ábra) feltehetően degradációs/transzformációs termékek, ezzel szemben a két

retenciós időnél detektált $C_{19}H_{14}O_7$ és a $C_{19}H_{14}O_8$ vegyületek (24. ábra) prekursor vegyületek, azaz a toxin bioszintetikus útvonalának köztitermékei (24. ábra).



24. ábra Az aflatoxinok bioszintézisének útvonala (Udwary és mtsai., 2002; Yabe mtsai., 2012) és a downstream transzformációs reakciók. Az egy lépéses enzimreakciókat nyilak, a többlépéses enzimreakciókat szaggatott nyilak jelölik. A bioszintetikus útvonal zöld, az enzimatis és a nem-enzimatis útvonalak rózsaszín, illetve szürke háttérszínekkkel vannak jelölve. Csak azon vegyületek szerkezeti képletei vannak feltüntetve, melyeket a konfrontációs tesztekben kimutattunk (23. ábra). Az NE a nem-enzimatis reakciókat jelöli (ezeket az egyes lépések közötti kettős nyilak jelölik). A VA, versicolorin A; **OMeSTC**, O-metilsterigmatocisztin; **OH-OMeSTC**, 11-hidroxi-O- metilsterigmatocisztin; **ASP**, aspertoxin; **OH-ASP**, 11- hidroxi-aspertoxin; **DH-OH-ASP**, dihidroxi-aspertoxin; **AFG1**, **AFB1**, **AFM1**, aflatoxin G1, B1, M1.

A szakirodalmi adatok alapján bizonyos *Aspergillus* fajok, mint például az *A. flavus* képes a saját toxinjait lebontani (Doyle és mtsai., 1978) citokróm P-450 monooxygenáz (Hamid és mtsai., 1987), laktonáz és más reduktáz enzimek (Xing és mtsai., 2017) segítségével. Fontos megjegyezni, hogy a kísérleteink során önmagában sem az alkalmazott *A. flavus*, sem a *Pseudomonas* izolátumok nem voltak képesek az AFB1 lebontására vagy átalakítására. Ezért amikor *A. flavus* – *Pseudomonas* interakcióban AFB1 származékokat

azonosítottunk, az annak a jele, hogy az interakciós partner hatására módosult az AFB1-hez kapcsolható metabolit profil.

6.5.5.1. A citokróm P-450 oxidoreduktáz és más oxidoreduktázok potenciális szerepe az AFB1 szintézisében és átalakításában

Az általunk detektált $C_{16}H_{10}O_6$ az aflatoxin P1-nek (AFP1) felel meg, ami az AFB1 demetilációja során képződő degradációs származéknak tekinthető (**24. ábra**). A metabolit MS/MS spektruma összhangban van a szakirodalomban található AFB1 UV-fény-indukált transzformációs termékével (Li és mtsai., 2022). A szakirodalom alapján a *Trametes versicolor* sejtmentes extraktuma képes az AFB1-et AFP1 toxinná alakítani, ami enzimatisz átalakításra utal (MS/MS spektrum közlés hiányában nem tudtuk összehasonlítani az AFP1-et saját spektrumunkkal) (Suresh és mtsai., 2020). Az AFP1 megjelenése bizonyos szilárd konfrontációs kölcsönhatások során (**23. ábra**) az AFB1 enzimatisz O-demetilációjával magyarázható. Bár az *A. flavus* gombában ezidáig nem azonosítottak AFB1-demetilázt, azonban az köztudott, hogy ezt a reakciót az emberekben és állatokban a citokróm P-450 katalizálja (McLean és mtsai., 1995). A növénypatogén *Fusarium* és *Nectria* fajoknál a citokróm P-450-típusú monooxygenáz enzim, a pisatin-demetiláz (Pda1) felelős a borsó által termelt pisatin toxin demetilációjáért, ami az aflatoxinnal szerkezeti rokonságot mutató vegyület (Coleman és mtsai., 2011). Mindezek alapján citokróm P-450 monooxygenáz típusú enzimet feltételezhetünk az AFP1 bizonyos konfrontációkban történő megjelenéséért. Az nyitott kérdés számunkra, hogy az enzim bakteriális vagy gomba eredetű-e, de az a tény, hogy az AFP1 jelenlétét csak szilárd konfrontáció során tudtuk kimutatni, az arra utalhat, hogy az oxigénszint csökkenésére érzékeny gombapartner lehet a felelős a toxin átalakításáért, aki a folyadékkultúrában a hozzáférhető oxigén kisebb mennyisége miatt nem tudja működtetni az átalakítást végző monooxygenázát.

Az általunk detektált azonos összegképletű, de eltérő retenciós idejű $C_{19}H_{14}O_7$ összegképletű vegyületek a 11-hidroxi-O-metilsterigmatocisztinnak (OH-OMeSTC) vagy az aspertoxinnak (ASP), a $C_{19}H_{14}O_8$ vegyület pedig a 11-hidroxi-aspertoxinnak (OH-ASP) felelnek meg. A vegyületek MS/MS spektruma összhangban van a szakirodalomban található spektrumokkal (Schamann és mtsai., 2022). Ezek a metabolitok az AFB1 és aflatoxin M1 (AFM1) bioszintetikus prekurzorainak tekinthetők (Yabe és mtsai., 2012). A bioszintetikus útvonalban az AFB1 és AFM1 toxinok közös prekurzora az O-

metilsterigmatocisztin (OMeSTC), az OrdA enzim (más néven AflQ, egy citokróm P-450 család monooxygenáza) enzim által különböző szénatomokon hidroxilálódik, amelynek eredményeképpen ASP vagy OH-OMeSTC jön létre, ami további hidroxilációval OH-ASP toxinná alakul át (**24. ábra**) (Yabe és mtsai., 2012). Mind az OH-OMeSTC, mind az OH-ASP tovább alakulhat az OrdA enzim által, ami AFB1 és AFM1 létrejöttéhez vezet (Udwary és mtsai. 2002; Yabe és mtsai., 2012). Az AFM1 toxint sem a gomba önálló tenyésztésében (kontroll), sem a közös tenyésztések során nem detektáltuk, viszont a toxin prekursorai az aspertoxin, a 11-hidroxi-aspertoxin és a 11-hidroxi-O-metilsterigmatocisztin jelen voltak a mintákban (**23. ábra**). Az aspertoxint leginkább a folyadékkultúrákban detektáltuk (**23. ábra**).

Általánosságban elmondható, hogy egy metabolikus útvonal köztitermékei leginkább akkor detektálhatóak, ha az útvonal enzimeit túltermelődnek vagy aktivitásuk megnövekszik (például az alacsony molekulású „accelerator” vegyületek jelenlétében), illetve, ha a legkisebb sebességű reakció szubsztrátjai felhalmozódnak. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az OrdA enzim túltermelődése vagy fokozott aktivitásának eredményeképpen történt az OH-O-MeSTC, az ASP és OH-ASP vegyületek felhalmozódása.

A detektált $C_{16}H_{14}O_5$ vegyület az aflatoxin D1 (AFD1), amely AFB1-ből laktongyűrű hidrolízisével, majd dekarboxilálásával keletkezik (**24. ábra**). A vegyületet az AFB1 degradációs termékeként azonosították az *Escherichia coli* (Wang és mtsai., 2019) vagy a *Rhodococcus erythropolis* (Eshelli és mtsai., 2015) sejtmentes extraktumában és *P. putida* (Samuel és mtsai., 2014) tenyésztésében. Zaccaria és munkatársainak kutatása alapján az AFB1 toxinból lakkázok és más enzimek például laktonázok vagy más meg nem határozott enzimek segítségével AFD1 toxin képződik (Zaccaria és mtsai., 2023). Az *A. flavus* képes lakkázokat előállítani (Kumar és mtsai., 2016), ezért fontos megjegyezni, hogy ez az enzim hozzájárulhat az AFB1 molekulán belül található észterkötés (lakton gyűrű) hidrolíziséhez AFD1 toxint eredményezve. Az AFD1 vegyületet kizárólag a folyadékfázisú tenyésztéseinkben tudtunk detektálni (**23. ábra**). Az továbbra is kérdéses, hogy az AFD1 képződéséhez hozzájáruló enzim bakteriális vagy gombapartner eredetű.

Korábban már leírtak oxidatív enzim termelés fokozódást gombákban gombabaktérium kölcsönhatások során (Levy és mtsai., 1992; Crowe és mtsai., 2001; Baldrian és mtsai., 2004). Ezen megfigyelések alapján feltételezhető, hogy bizonyos bioaktív

vegyületeket termelő antagonista *Pseudomonas* baktériumok hatására válaszul az *A. flavus* citokróm P-450 vagy más oxidoreduktázt kódoló gének indukálódnak. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy az az AFB1-hez kapcsolódó származékok megjelenése mögött a konfrontációs partner által indukált fokozott oxidoreduktáz enzimtermelés áll.

6.5.5.2. A nem-enzimatis reakciókban termelődő vegyületek

Az általunk detektált $C_{18}H_{16}O_7$ vegyület esetében (**24. ábra**) két molekula jelenik meg eltérő retenciós időnél ($RT=12,3$ min és $RT=12,5$ min), ugyanolyan molekulatömeggel és fragmentációs mintázattal (**24. ábra, M6. táblázat**). A két vegyület a furofurán gyűrű kettős kötéseire addicionálódó vízmolekula révén keletkező metil-éter (metoxi-aflatoxin B2a/Me-AFB2a), ami a metoxi csoport helyzetétől függően két retenciós időnél jelenik meg, Me-AFB2a $_{RT=12,3}$ és Me-AFB2a $_{RT=12,5}$ (**M6. táblázat**). A képződött vegyületek MS/MS fragmentációs mintázata összhangban van a szakirodalomban Li és munkatársainak eredményével (Li és mtsai., 2022). A furofurán gyűrű kettős kötésének hidratációja (aflatoxin B2a vagy AFB2a) az előfeltétele a Me-AFB2a vegyületek képződésének. Az AFB2a savas környezetben nem-enzimatisan képződik (Ciegler és mtsai., 1968), amelyet ezt követően a hidroxilcsoport további átalakítása követ. A Me-AFB2a vegyületek megjelenését a közös tenyésztésekben savak felhalmozódása eredményezheti. Az *A. flavus* ismert almasavtermelő, aminek termelődése fokozódhat a környezetben elérhető nitrogénforrások csökkentésével (Abe és mtsai., 1962; Battat és mtsai., 1991). A nitrogénforrás koncentrációjának kritikus csökkenése a közös tenyésztésekben almasav felhalmozódásához vezet, ami az AFB2a metoxi származékainak képződését segíti elő.

Egy további vegyület, a $C_{19}H_{16}O_8$, a Me-AFB2a vegyülethez hasonlóan, nem-enzimatis módon, az OH-OMeSTC vagy ASP furofurán gyűrű kettős kötésének víz addíciójával képződik (**24. ábra**). A két feltételezett vegyület szimulált és mért MS/MS fragmentációs mintázatának összehasonlítása alapján feltételezzük, hogy a $C_{19}H_{16}O_8$ vegyület az aspertoxin dihidro-hidroxi(DH-OH-ASP) származéka lehet (**M6. táblázat**).

6.5.5.3. Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek előfordulása a kölcsönhatások során

Az I-es típusú kölcsönhatások (a baktériumokkal való kölcsönhatások során az összes A-típusú, 12 B-típusú és 8 C-típusú izolátumok, összesen 36 izolátum) egyikében sem detektáltunk az AFB1-hez kapcsolódó vegyületeket, sem a folyadék sem a szilárd

tenyésztések során. Ezért feltételezzük, hogy ezekben a kölcsönhatásokban a teljes toxin bioszintetikus útvonal blokkolva van. Ez összhangban van a szakirodalomban található transzkriptomikai tanulmányok eredményével, miszerint a baktériumok (Zhao és mtsai., 2019) és gombák (Hua és mtsai., 2019; Yang és mtsai., 2020; Sweany és mtsai., 2021) a bioaktív vegyületeik révén képesek az aflatoxin bioszintézisét szabályozó gének alulszabályozására, és így a bioszintézis útvonal gátlására.

Kizárólag azokban a folyadék (n=11) és szilárd (n=12) konfrontációkban tudtunk azonosítani AFB1-hez kapcsolódó vegyületeket, ahol maga az AFB1 toxin képződés is létrejött (**23. ábra**). Csak négy *Pseudomonas* izolátummal (Ps_7, Ps_26, Ps_31 és Ps_84) történő folyadék- és szilárdfázisú kölcsönhatás során termelődött AFB1-hez kapcsolódó vegyület. A többi *Pseudomonas* izolátummal történő kölcsönhatásban (**23. ábra**) vagy csak a folyadék-, vagy csak a szilárdfázisú kölcsönhatásban jelentek meg ezek a vegyületek. Nem találtunk összefüggést az antagonista hatás és az említett vegyületek megjelenése között. A vegyületeket a III. típusú és számos IV. típusú kölcsönhatásban detektáltuk azokban az konfrontációkban, ahol az AFB1 túltermelődött vagy tartalma megegyezett a kontrolléval (**21. ábra**).

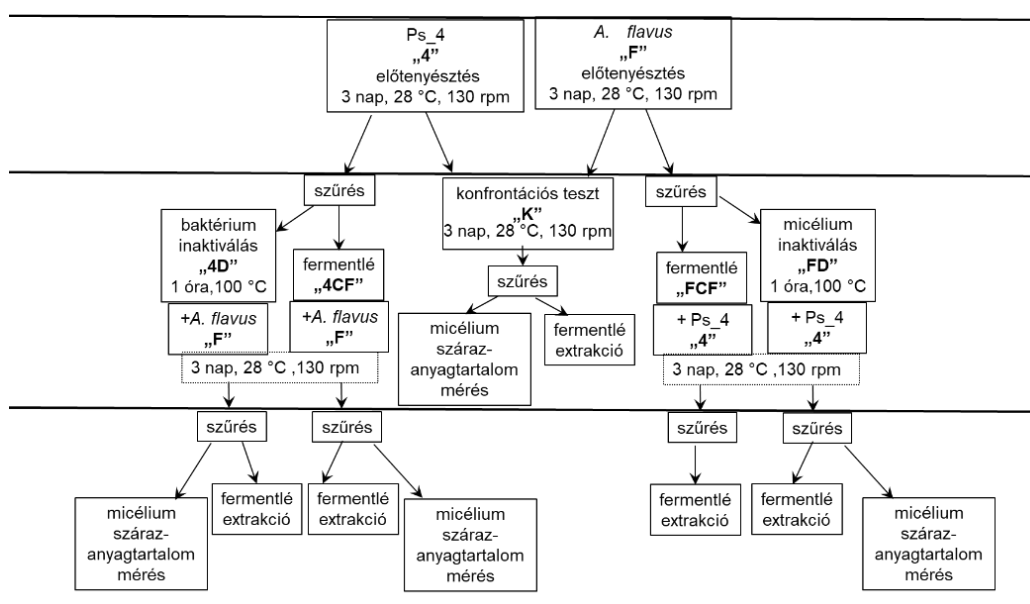
Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek közül, az AFP1 csak a szilárd fázisú konfrontációs tenyészetekben, az AFD1 pedig csak néhány folyadékfázisú konfrontációs tenyészetben jelent meg. Az összes többi vegyületet különböző mértékben, de mind folyadék-, mind szilárd fázisú konfrontációs tenyészetekben detektáltuk (**23. ábra**).

Az ASP és a OH-OMeSTC bioszintetikus köztitermékek két kivételtől eltekintve (az ASP és a OH-OMeSTC a Ps_84 baktériummal való szilárd fázisú konfrontációban, és az OH-OMeSTC a Ps_24 baktériummal való folyadékfázisú konfrontációban hiányoztak) minden konfrontációban felhalmozódtak (**23. ábra**).

A szilárd fázisban tesztelt mintákban az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek a kontroll tenyészethez viszonyítva átlagosan 7%-os és legfeljebb 20%-os AFB1-tartalommal rendelkeztek. A folyadékfázisban kivitelezett tenyésztések a szilárdhoz képest magasabb értékeket mutattak, a kontrollhoz viszonyítva átlagosan 18%-os és legfeljebb 50%-os AFB1-tartalommal rendelkeztek. Az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek megnövekedett arányát a folyadék konfrontációs tenyészetekben az magyarázhatja, hogy a gomba micélium feltehetően fokozottan ki volt téve a baktériumok által termelt bioaktív faktorok hatásának. A szilárd- és folyadékfázisú konfrontációs tesztek, valamint az AFB1-hez kapcsolódó vegyületek eredményei publikálásra kerültek (Papp és mtsai., 2024).

6.6. A Ps_4 izolátum és az *A. flavus* folyadékfázisú konfrontációjának komplex metabolomikai jellemzése

A vizsgált *Pseudomonas* izolátumok antagonista hatásának vizsgálatakor 3 izolátum (Ps_66, Ps_68 és Ps_4) mind folyadék, mind szilárd tápközegben gátolta az *A. flavus* toxintermelését. Közülük kiválasztva a Ps_4 (*P. paracarnis*) izolátumot, megvizsgáltuk ezen *Pseudomonas* izolátum és az *A. flavus* közötti antagonista kölcsönhatás metabolomikai hátterét HPLC-HRMS méréssel, és elemeztük mind a baktérium, mind pedig a gombapartner metabolit profilját. A kísérleti elrendezés kidolgozásakor mérlegeltük annak eshetőségét, hogy a mikroorganizmusok nem csak metabolitok kibocsájtása által közvetett úton, hanem fizikai kontaktus által is érzékelik egymás jelenlétét (különösen a folyadékfázisú konfrontációk során), ezért külön vizsgáltuk az önálló tenyészetek sejtmentes felülúszójának és hővel előlt biomasszájának konfrontációs képességét is. A kísérleti rendszer komplex, ezért a jobb követhetőség érdekében grafikusán mutatjuk be (25. ábra).



25. ábra A Ps_4 *Pseudomonas* izolátum (*P. paracarnis*) *A. flavus*-szal történő folyadékfázisú konfrontációs kísérletének munkamenete.

F=*A. flavus*; **4CF**= sejtmentes baktérium fermentlé; **FCF**= sejtmentes gomba fermentlé; **4**= Ps_4 *Pseudomonas* izolátum; **4D**= inaktivált baktérium; **FD**= inaktivált gomba; **K**= Ps_4 és *A. flavus* konfrontációs teszt. A metabolitok eloszlása az *A. flavus* önálló tenyészetében (**F**), a konfrontációs kísérletben (**K**) és a baktérium önálló tenyészetében (**4**).

6.6.1. A metabolitok szelektálása

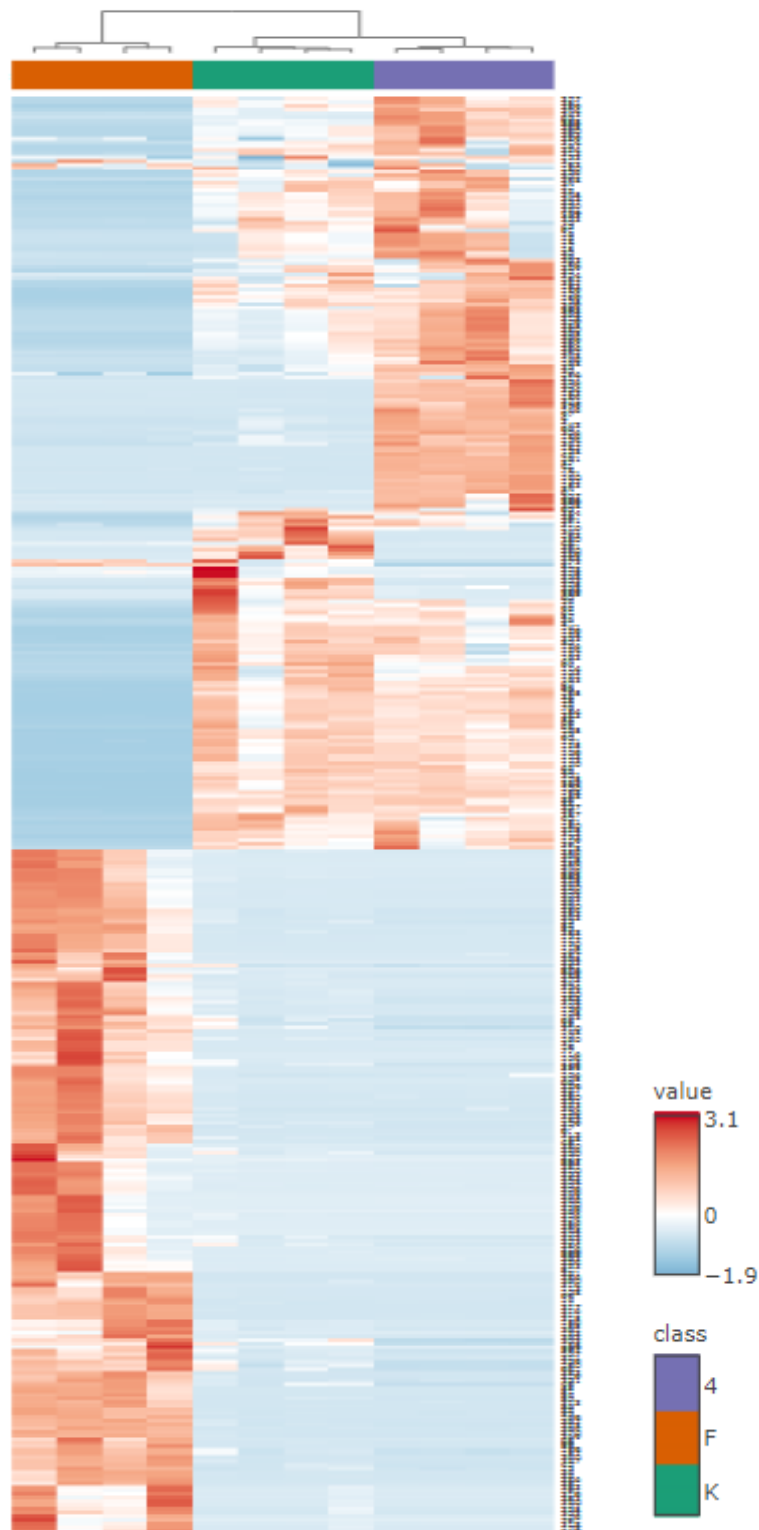
A kiválasztott Ps_4 vs. *A. flavus* antagonista kölcsönhatás nem-célzott metabolomikai vizsgálatát HPLC-HRMS módszerrel valósítottuk meg olyan körülmények között, ami elsősorban a másodlagos metabolitok meghatározására alkalmas. Mivel a Ps_4 izolátumot *P. paracarnis* faj izolátumaként azonosítottuk (**10/B. ábra** és Mellékletek **M1. táblázat**), az izolátumra Ps_4 illetve *P. paracarnis*-ként is hivatkozunk a továbbiakban. Célunk a metabolitkészlet lehető legteljesebb feltárása volt, ezért pozitív és negatív ionizációs módot is alkalmaztunk. A Mellékletek című fejezet **M7. ábrán** mutatjuk be az *A. flavus*, illetve a *P. paracarnis* fermentlevének teljes ion kromatogramját mindkét ionizációs módban.

A nyers mérési adatokat a CD program segítségével dolgoztuk fel a **9. ábrán** bemutatott munkamenet szerint. Az értékelés eredményeképpen pozitív ionizációs módban 11193, negatív ionizáció mellett 8299 metabolitot különített el a program (**4. táblázat**). A metabolitok számát több tényező figyelembevételével szűkítettük. Kizárólag olyan metabolitokat vettünk figyelembe, melyek (i) molekulaionja megfelelő izotópeloszlást mutatott a megbízható összegképlet meghatározásához; (ii) a pontos azonosításhoz jól értékelhető MS/MS spektrummal rendelkeztek; (iii) mennyiségük a detektálási határ legalább ötszöröse volt. A szűrések 5020 pozitív ionizációs módban, valamint 4768 negatív ionizációs módban detektált metabolitra csökkentették a vizsgálandó vegyületek számát. Mivel valamennyi kísérletet egyszerre értékeltük, következő lépésként meghatároztuk, hogy mely vegyületek rendelkeznek a gombához, illetve a baktériumhoz, melyek vesznek részt a konfrontációban, a sejtmentes fermentlét-, illetve az inaktivált partnert tesztelő kísérletekben. Továbbá, kiszűrtük azokat a metabolitokat (ezek elsősorban elsődleges metabolitok voltak), melyek mennyisége állandónak bizonyult valamennyi mintában. Ezt követően meghatároztuk, hogy melyek azok a metabolitok, melyeket mindkét ionizációs módban detektáltunk. A továbbiakban ezeket a vegyületeket úgy vettük figyelembe, mintha csak pozitív ionokat hoztak volna létre. Végeredményként a további számítások alapját képező metabolitok száma 492 metabolitra csökkent, melyből a baktérium önálló tenyészetét, a gomba önálló tenyészetét és a konfrontációs kísérletet összesen 379 metabolit jellemezett.

4. táblázat A metabolitok szelektálása.

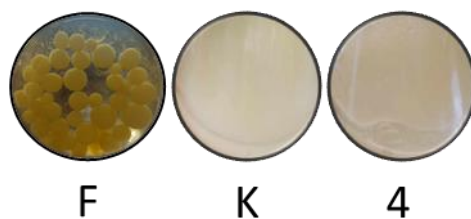
Szelektálási faktor	Pozitív ionizáció	Negatív ionizáció
Összes detektált metabolit	11193	8299
Izotópeloszlással rendelkező metabolit	8571	7030
MS/MS spektrummal rendelkező metabolit	5058	4810
Küszöbérték feletti csúcsterülettel rendelkezik	5020	4768
Az általános metabolitok elhagyásával kapott szignifikáns specifikus vegyületek	267	282
Szignifikáns metabolitok a mindkét ionizációs módban detektált metabolitok elhagyásával	267	225

Hőtérképen ábrázoltuk a 379 vegyület mennyiségének eloszlását a mintákban (**26. ábra**). A hőtérkép alapján megállapítható, hogy a konfrontáció metabolitkészlete a baktérium metabolitkészletével mutat nagyfokú hasonlóságot, tehát kémiai szempontból a konfrontációs kísérletben a *P. paracarnis* dominál.



26. ábra A 379 metabolit eloszlása az *A. flavus* önálló tenyésztésében (F), a konfrontációs kísérletben (K) és a baktérium önálló tenyésztésében (4).

Ezzel összhangban vannak a morfológiai vizsgálatok tapasztalatai, azaz a tenyésztések morfológiája (**27. ábra**) és a tenyésztések OD_{600nm} értékeiből számított sejtszámok és a száraz micéliumtömegek is (**5. táblázat**).



27. ábra A tenyészetek morfológiája. **F**= *A. flavus* önálló tenyészet; **K**= konfrontáció; **4**= baktérium önálló tenyészet.

Az **5. táblázat** adatai szerint a konfrontációs kísérletben a gomba száraz biomassza mennyisége nem éri el a 4%-ot az önálló tenyészetéhez képest. A baktérium egységnyi térfogatra számított sejtszáma viszont szignifikánsan nem különbözik az önálló tenyészetétől.

5. táblázat A tenyészetek sejtszám és micéliumtömeg adatai.

	F	K	4
Sejtszám/ml	-	9,3E8	8,6E8
	-	$\pm 2E8$	$\pm 2,3E8$
$m_{\text{micélium}}(\text{g})$	0,299	0,011	-
	$\pm 0,036$	$\pm 0,004$	-

F= *A. flavus* önálló tenyészet; K= konfrontáció;
4= baktérium önálló tenyészet.

6.6.2. Az *A. flavus* metabolitkészlete

Vizsgálataink szerint a 379 metabolitból 186 metabolit rendelhető az *A. flavus* gombához. A metabolitok fragmentációs mintázatát összehasonlítva a spektrumkönyvtárakban található mintázatokkal és az *in silico* létrehozott fragmentációs mintázatokkal, 12 ismert *A. flavus* metabolitot azonosítottunk, köztük az AFB1-et (**6. táblázat**). Az *A. flavus* önálló tenyészetében a toxin koncentrációja $3,68 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$, a konfrontációban viszont a detektálási határ alatt ($0,03 \mu\text{g/ml}$) volt.

6. táblázat Az *A. flavus* által termelt ismert metabolitok.

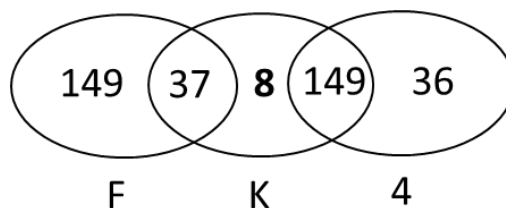
Vegyület	Összegképlet	RT (min)	Detektált ion [M+H] ⁺ m/z	Detektált ion [M-H] ⁻ m/z
citromsav	C ₆ H ₈ O ₇	2,9	193,0345	-
aszperfurán	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	13,2	219,1017	-
strobilakton A	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	11,2	267,1592	-
6-metil-citreozokumarin	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	12,8	293,1025	-
aflatoxin B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	12,6	313,0719	-
2-oxo-ciklopiazonsav	C ₁₈ H ₂₅ O ₅ P	13,7	353,1514	-
ausztdiol	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	11,7	-	235,0613
hidroaszpergilloz sav	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃	9,7	-	239,1403
aszpersav	C ₁₆ H ₂₈ O ₄	13,7	-	283,1915
aszpersav	C ₁₆ H ₂₈ O ₄	13,0	-	283,1916
szerantripinon	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	14,4	-	387,1088
asztelloid F	C ₂₄ H ₂₈ O ₈	12,6	-	443,1713

6.6.3. A *P. paracarnis* metabolitkészlete

A 379 vegyületből 185 metabolitról állapítottuk meg, hogy a baktérium termeli. A metabolitok pontos tömegét és összetételét összehasonlítva az általunk összeállított *Pseudomonas* bioaktív metabolitok tömegét tartalmazó listával azt tapasztaltuk, hogy a *P. paracarnis* az ismert metabolitok közül ciklo Pro-Val, ciklo Tyr-Pro ciklikus dipeptideket és két QS molekulát, valamint a 2-amino-acetofenont és az etil-homoszerin-laktont termeli (Mellékletek fejezet M5. ábra).

6.6.4. A konfrontáció metabolitkészlete

A konfrontáció metabolomikai hátterének tanulmányozásához összehasonlítottuk a konfrontáció metabolitkészletét a résztvevő mikroorganizmusok önálló tenyészetének metabolitkészletével, így meg tudtuk állapítani, hogy mely metabolitok termelődtek csak a konfrontáció során, és azok melyik konfrontációs partnertől származtak (28. ábra).



28. ábra A konfrontációban detektált metabolitok eredet szerinti eloszlása.
F=*A. flavus* önálló tenyészetének metabolitjai; **K**=konfrontációban detektált metabolitok; **4**=*Pseudomonas* önálló tenyészetének metabolitjai.

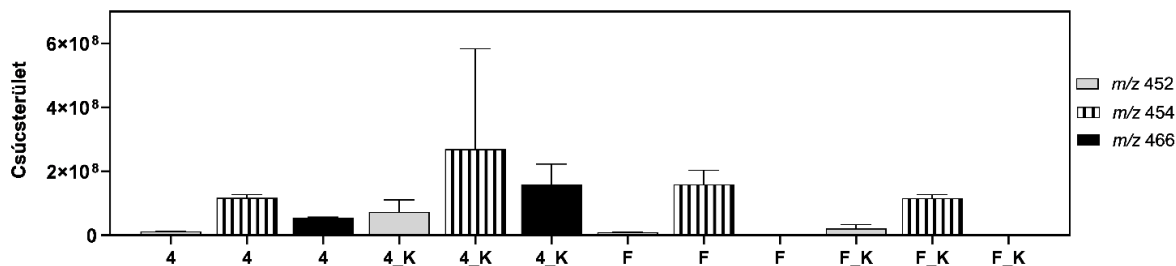
Ahogy azt a **28. ábra** is mutatja, az *A. flavus* metabolikészletének 80%-a nem jelent meg a konfrontáció során. A gomba a baktériummal kölcsönhatva csak 37 rá jellemző másodlagos metabolitot termelt, melyből 15 metabolitot közel azonos mennyiségben, 13 vegyületet pedig több mint ötszörös mennyiségben termelt az önálló tenyészetéhez képest. Ezzel szemben a baktérium másodlagos metabolit készletének közel 81%-a megjelent a konfrontáció során. A konfrontációban 8 olyan metabolit termelődött, amelyeket sem a gomba, sem a baktérium önmagában nem képes előállítani. Ezeket a vegyületeket a gomba és a baktérium sem a partner organizmus sejtmentes felülúszójában, sem az inaktivált partner micélium/sejt jelenlétében nem termelte. A nyolcból négy vegyület (**7. táblázat**) foszfatidil-etanolamin (PE), ami a foszfogliceridek csoportjába tartozik és az egyik legfontosabb sejtmembrán alkotónak számít. Azonosításuk a pontos tömeg és a jellemző fragmentációs mintázat alapján történt.

7. táblázat A konfrontációban megjelenő új metabolitok.

Vegyület	Összegképlet	RT (min)	Detektált ion [M+H] ⁺ <i>m/z</i>
PE(16:1(9Z)/0:0)	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	16,8	452,2779
PE(0:0/16:1(9Z))	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	16,6	452,2781
PE(16:0/0:0)/PE(0:0/16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	17,5	454,2937
PE(17:1(9Z)/0:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₇ P	17,3	466,2935
Triacetil-fuzarinin	C ₃₉ H ₆₀ N ₆ O ₁₅	9,1	545,2819
		11,4	853,4136
		10,3	877,3718
		10,7	906,3255

Annak érdekében, hogy eldönthessük, melyik partner organizmushoz köthető a PE vegyületek megjelenése a konfrontáció fermentlevében, megvizsgáltuk az *A. flavus* és a *P. paracarnis* önálló tenyésztése során, illetve a közös tenyészetben felnőtt micélium és baktérium sejtek lipid összetételét. A **29. ábra** szerint a PE(17:1/00) (*m/z* 466) vegyület csak

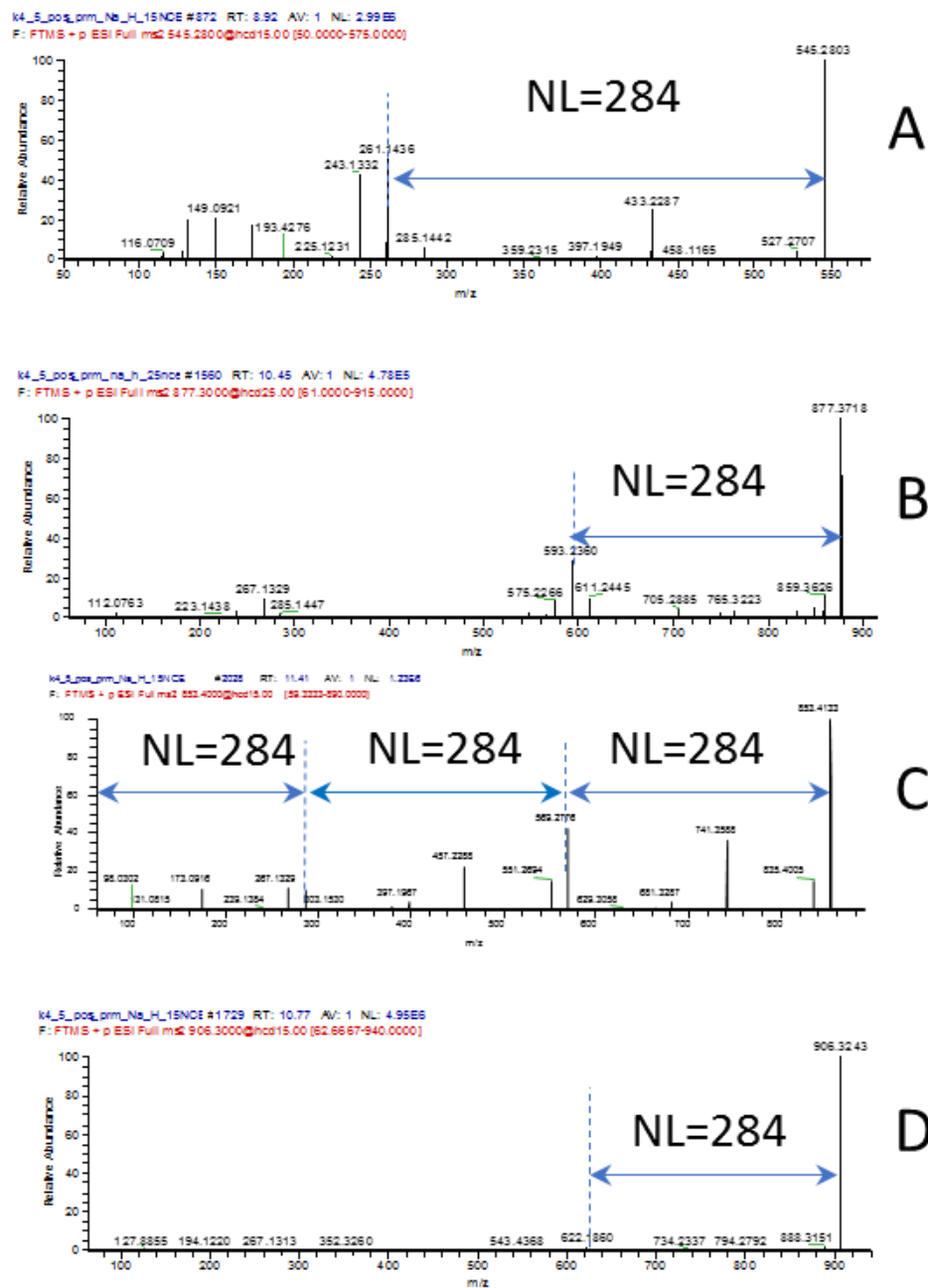
a baktériumra jellemző, a másik három PE mindkét mikroorganizmus membránjában megtalálható.



29. ábra Az *A. flavus* és a *P. paracarnis* lipidösszetétele. **4**= baktérium önálló tenyészet; **4_K**= konfrontációban részt vett baktérium; **F**= *A. flavus* önálló tenyészet; **F_K**= konfrontációban részt vett *A. flavus*. *m/z* 452: PE(16:1(9Z)/0:0) és PE(0:0/16:1(9Z)), *m/z* 454: PE(16:0/0:0)/PE(0:0/16:0), *m/z* 466: PE(17:1(9Z)/0:0)

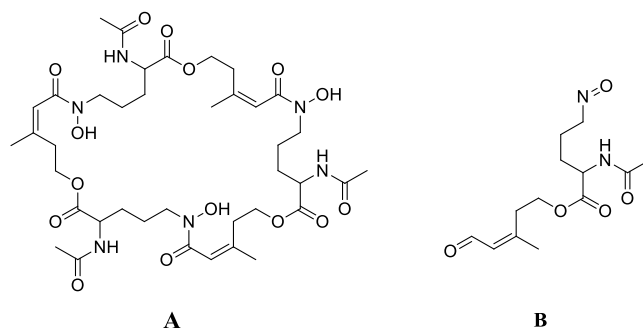
A konfrontáció fermentlévében megjelenő *m/z* 452 és 454 PE vegyületek tehát mindkét mikroorganizmustól származhatnak. Az azonosított lipidek alapján készült PLSDA analízis szerint (**Mellékletek** fejezet **M8. ábra**) a gomba membránja az együttenyésztés során megváltozott az önálló tenyésztéshez képest, míg a baktérium lipidösszetételét nem befolyásolta a gomba jelenléte. A baktérium részéről feltételezhetjük, hogy a PE-ok megjelenése extracelluláris vezikulákhoz köthető, ami jellemző a Gram negatív baktériumokra (Schwechheimer és Kuehn, 2015). A gomba esetén viszont elképzelhető, hogy miközben a baktérium hatására módosította a membránját és PE vegyületeket juttatott a közegbe, illetve nem zárhatjuk ki azt sem, hogy bakteriális eredetű enzimek hatására a sejtek lízist szenvedtek és membránkomponensek kerültek a fermentlébe.

A konfrontációban megjelenő további négy vegyület közül az egyik egyértelműen gomba sziderofórként azonosítható pontos tömege és MS/MS spektruma (**30/C. ábra**) alapján (N,N',N''-triacetil-fuzarinin) (**31/A. ábra**).



30. ábra Az $[M+H]^+$ molekulaion fragmentációjakor 284 tömegű semleges veszteséget mutató metabolitok N-acetil-fuzarinin tartalmúak.

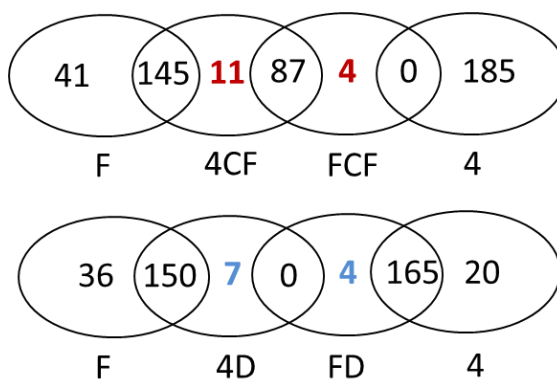
A többi három metabolit fragmentációs mintázatában (**30. ábra**) is fellelhető az N,N',N''-triacetil-fuzarinin alegysége, az N-acetil-fuzarinin (**31/B. ábra**), azonban ezek a vegyületek más alegységeket is tartalmaznak.



31. ábra Az N,N',N''-triacetyl-fuzarinin (**A**) és a monomeregység (**B**) szerkezeti képlete.

Mivel az N,N',N''-triacetyl-fuzarinin sziderofór vegyületet gombákból mutatták ki (Moore és Emery, 1976), ezért nagyon valószínű, hogy a konfrontációban az *A. flavus* termeli. A három másik vegyület esetén nem tudunk eredetet valószínűsíteni, különösen azért, mert a sziderofórok megjelenése a baktérium-gomba kölcsönhatásokban Pierce és munkatársa szerint általános jelenség, a kölcsönhatások konzervált mozgatórugói (Pierce és mtsai., 2021).

Megvizsgáltuk, hogy kizárólag a konfrontációban detektált 8 vegyület keletkezése előidézhető-e a partner mikroorganizmus sejtmentes felülúszójával (az abban található metabolitokkal), illetve az inaktivált micélium/sejtekkel (sejtfalkomponensekkel). A vizsgálatok eredményét a **32. ábrán** foglaltuk össze.



32. ábra A sejtmentes felülúszókban és az inaktivált partner jelenlétében történő tenyésztések során detektált metabolitok származás szerinti eloszlása. **F**= *A. flavus* önálló tenyészetének metabolitjai; **4CF**= baktérium sejtmentesített fermentlevében nevelt *A. flavus* tenyészet fermentlevének metabolitjai; **FCF**= gomba sejtmentesített fermentlevében tenyésztett baktérium tenyészet fermentlevének metabolitjai; **4**= *Pseudomonas* önálló tenyészetének metabolitjai; **4D**= inaktivált baktérium jelenlétében a gomba által termelt metabolitok; **FD**= inaktivált gomba jelenlétében a baktérium által termelt metabolitok.

A **32. ábra** adatai szerint a két mikroorganizmus sejtmentes felülűszójában tenyésztett partnerek 102 olyan vegyületet termeltek, melyeket csak a sejtmentes felülűszókban detektáltunk. Fontos kiemelni, hogy a baktérium és a gomba ugyanazt a 87 vegyületet termelte a partner sejtmentes felülűszó metabolitjainak hatására, és ezek a metabolitok az önálló tenyészetekben nem jelentek meg. Az inaktivált partner jelenlétében is megjelentek olyan vegyületek, melyek kizárólag vagy csak az inaktivált gomba mellett termelt a *P. paracarnis*, vagy csak az inaktivált baktérium mellett termelt az *A. flavus*. A konfrontációban detektált 8 vegyület azonban nem keletkezett sem az inaktivált partner, sem a partner metabolitkészletének jelenlétében.

Abból kiindulva, hogy a 8, kizárólag csak a baktérium-gomba konfrontációban megtermelt vegyület közül az N,N',N''-triacetil-fuzarinint biztosan a gomba termeli, és ezt a sziderofór anyagot a gomba nem termelte meg amikor a baktérium önálló tenyészetének sejtmentes fermentívével konfrontálódott, joggal feltételezhetjük, hogy a baktérium a gomba észlelését követően bocsájtott ki válaszmolekulát, aminek a hatására a gombában N,N',N''-triacetil-fuzarinin termelő válaszreakció alakult ki. Tehát egy összetettebb párbeszéd jön létre az interakciós partnerek között, amelyben az egyes résztvevő molekulákat és azok pontos szerepét a közeljövőben további interakciós vizsgálatok elemzésével kívánjuk felderíteni.

7. Összefoglalás

Az *A. flavus* opportunistá patogén gomba, amely világszerte magas olajtartalmú magvakat fertőz (kukorica, gyapot, földimogyoró), és mikotoxinokkal (aflatoxin) szennyezi a termést. A mikotoxinnal való szennyezettség hosszú távú gazdasági és egészségügyi következményekkel jár. A szennyezettség csökkentésére elérhető eszközök továbbra is korlátozottak. Az *A. flavus* elleni fenntartható biológiai védekezés iránti igénynek köszönhetően szükségszerűvé vált az egyre hatékonyabb biokontroll ágensek azonosítása és antagonistá hatásuk molekuláris mechanizmusának tanulmányozása. Mivel az önfenntartó biológiai védekezés elérése nehéz, a baktériumok által termelt bioaktív metabolitok bevonása a növényvédelembe ígéretes alternatívát jelenthet a gombapatogének elleni biológiai védekezés során. Szakirodalomból ismeretes, hogy számos *Pseudomonas* faj kiváló biokontroll ágensként alkalmazható gombapatogénekkal szemben és minden *Pseudomonas* faj rendelkezik valamilyen bioaktív anyag termelésének képességével.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy kukorica rizoszférából *Pseudomonas* törzseket izolálunk és vizsgáljuk az izolátumok és az *A. flavus* közötti kölcsönhatás jellegét. Összesen 51 *Pseudomonas* baktériumot izoláltunk és azonosítottunk az *rpoD* génszekvenciák alapján. Az izolátumokat hat kivételével a *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. koreensis*, *P. jessenii* és *P. pohangensis* csoportok tagjaiként azonosítottuk. A hat izolátumot az ismert *Pseudomonas* csoportok egyikébe sem tudtuk besorolni, ezért kiválasztottuk az egyiküket (Ps_91) és megszekvenáltuk teljes genomját. Összehasonlító genom analízist és filogenetikai vizsgálatokat követően bizonyítottuk, hogy a Ps_91 izolátum egy eddig ismeretlen új *Pseudomonas* faj képviselője.

Az új *Pseudomonas* faj genomelemzés eredményeként 4 NRPS, 3 RiPP, 1 PKS és 4 egyéb kategóriába sorolható másodlagos metabolit génklasztert azonosítottunk. HPLC-HRMS módszer segítségével igazoltuk az ektoin, NAGGN, aril-polién és HCN termelését, ami felruházza a mikrobát ozmotikus-, és oxidatív stresszel szemben mutatott ellenállóképességgel, valamint (a HCN termelés okán) növeli hasznosíthatóságát a mezőgazdaságban. Az új fajt fenotipizáltuk, mely során megállapítottuk optimális növekedési paramétereit (28 °C; 3-4% NaCl (w/v), pH= 6,0), pásztázó elektronmikroszkópos képe alapján a méretét (1,1-1,9 µm hosszú, 0,2-0,5 µm széles), valamint számos biokémiai jellemzőjét (pozitív eszkulin hidrolízis, N-acetil-glükózamin-, kálium-glükonát-, kaprinsav-, trinátrium-citrát és adipinsav asszimiláció, levántermelés, β-hemolízis és kataláz aktivitás). A *Pseudomonas*-ok fajazonosítására is felhasználható

zsírsavprofil is létrehoztuk, melyben legnagyobb mennyiségben C16:0-t detektáltunk, és emelett C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C10:0 3-OH, C12:0 2-OH, C12:0 3-OH, C17:0 ciklo zsírsavakat. A detektált fő poláris lipidek a foszfatidil-kolin, a foszfatidil-etanolamin, a foszfatidil-glicerol, a lizofoszfatidil-etanolamin és a lizofoszfatidil-glicerol és izoprenoid kinonok (ubikinon 9, 8, 4 és 2) voltak. Mind a biokémiai jellegek, mind a zsírsavmetabolit-profil megerősítette a Ps_91 izolátum az eddig megismert fajoktól történő elkülönülését.

Az 51 *Pseudomonas* izolátum bioaktív metabolittermelését LB, King és PDB tápoldatokban történő tenyésztés után vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a PDB tápoldatban több olyan bioaktív metabolit is képződik, ami alkalmassá teheti az adott izolátumot biokontroll célú felhasználásra. Számos antibiotikumot (fenazin-1-karbonsav, 2-hidroxifenazin), CLP-vegyületet (massetolid E, H), homoszerin-laktont (etil-homoszerin lakton, N-oktanoil homoszerin lakton, N-hexanoil homoszerin lakton, N-dekanoil homoszerin lakton) és ciklodipeptidet (ciklo-Pro-Met, ciklo-Tyr-Pro, ciklo-Pro-Val, ciklo-Tyr-Pro) azonosítottunk, melyek mindegyike különböző hatásmechanizmusokon keresztül hatással van a gombapatogének növekedésére.

A *Pseudomonas* izolátumok és az *A. flavus* közötti kölcsönhatást szilárd és folyadékfázisban vizsgáltuk. Teszteltük, hogy vajon az izolátumok képesek-e önmagukban az AFB1 bontására. Egyik izolátum esetében sem tapasztaltunk AFB1-bontó képességet. Tehát ha konfrontációs kísérletekben tapasztalunk AFB1-szint csökkenést, az nem a baktérium AFB1 jelenlétére adott válasznak köszönhető, hanem a baktérium és gomba közötti más interakció eredménye.

A szilárd fázisú konfrontációban elsőként az illékony vegyületeken keresztül történő kölcsönhatást vizsgáltuk. Öt esetben szignifikánsan megnőtt, 5 esetben pedig szinte teljesen megszűnt a gomba toxintermelése. Megvizsgáltuk a baktérium HCN volatilis metabolit termelő képessége és az interakciós partnergomba AFB1 termelésének megemelkedése, illetve visszaszorítása közötti összefüggés lehetőségét. Nem találtunk korrelációt a HCN termelőképesség és a gombapartner AFB1 termelése között. Az a tény, hogy a Ps_70, 29, 39, 60 és 38 izolátumok volatilis metabolitja képes az *A. flavus* toxintermelését visszaszorítani, a jövőben arra ösztönöz minket, hogy azonosítsuk ezen *Pseudomonas* izolátumok interakció során termelt volatilis metabolitjait.

A szilárd fázisú konfrontációs tesztek során a *Pseudomonas* izolátumok 78%-a képes volt befolyásolni a gomba AFB1 termelését, de csak 3 izolátum tudta szinte teljesen gátolni azt. Érdekes módon folyadékfázisú konfrontációkban az izolátumok 72%-a tudta szinte

teljesen gátolni a toxin képződését és emellett legalább 39,3%-os micéliumtömeg csökkenést is előidézték. A szilárd- és folyadékfázisú konfrontációs tesztek eredményei között mutatkozó eltérések magyarázata a bioaktív hatóanyag oldatban történő hatékony diffúziója lehet. Az AFB1 és az AFB1-hez kapcsolható prekursor vagy downstream transzformációs származékok HPLC-HRMS mérésekkel történő azonosítása alapján feltételeztük, hogy a különböző *Pseudomonas* izolátumok több mechanizmussal is tudják modulálni az *A. flavus* toxintermelését. Valószínűsíthetőleg három *Pseudomonas* izolátum szilárd és folyadékfázisú konfrontáció során is gátolta az AFB1 termelését úgy, hogy sem AFB1 bioszintézis prekursor molekulák, sem pedig downstream transzformációs termékek nem keletkeztek. Feltételezésünk szerint ezen izolátumok esetén a gombatoxin bioszintézis regulációján keresztül történt a gomba AFB1 termelésének gátlása. A három izolátum egyike *P. paracarnis*, a másik kettő pedig *P. chlororaphis* faj képviselői voltak. A *P. paracarnis* izolátum az antagonista interakció szempontjából fontos szerepet betölthető dipeptideket termelt (ciklo-Pro-Val, ciklo-Tyr-Pro) és két QS molekulát (2-amino-acetofenon és az etil-homoszerin-lakton), míg a *P. chlororaphis* izolátumok N-hexanoil HSL-t termeltek. Bár a *Pseudomonas* izolátumok nem tudták jelentősen gátolni az *A. flavus* micéliális növekedését, az AFB1 termelés gátló hatásuknál fogva mégis sikeres és a modern biokontroll ágens elvárásoknak megfelelő biokontroll törzsként szolgálhatnak. Ahogy a tudomány egyre több ismeretre tesz szert a mikrobiális közösségek diverzitás csökkenésének káros következményéről (mind egészségügyi, mind mezőgazdasági területen), egyre nyilvánvalóbb, hogy a legnagyobb sikert biokontroll alkalmazás esetén akkor érhetjük el, ha a biokontroll ágens nem szorítja ki az adott ökológiai niche-ből az antagonizált mikrobát és önfenntartó kontrollt hoz létre. Egyre több szakirodalmi adat gyűlik arról, hogy egy mikroba faj mikrobiomból történő eltüntetésével nagyobb kárt okozunk, mint amilyen hasznot reméltünk. Ezért a modern biokontroll ágens felé olyan elvárást támasztanak, hogy ahol lehetőség van erre, ott a mikrobiális közösségek diverzitásának felbolygatása nélkül érjük el a kívánt hatást.

A másik feltételezett mechanizmus szerint az AFB1 szint szignifikáns csökkenésével egyidejűleg bioszintézis prekursor metabolitok halmozódnak fel, mely jelenség mögött vélhetően az AFB1 bioszintézisében multifunkcionális kulcsszerepet betöltő OrdA oxidoreduktáz aktivitásának túlzott megnövekedése áll. Az, hogy milyen *Pseudomonas* metabolit megjelenése váltja ki ezt a választ a gombában, a jövőben kerül tisztázásra.

A harmadik feltételezett mechanizmus szerint a *Pseudomonas* interakció hatására enzimatis vagy nem-enzimatis lépéssel a gomba az AFB1-et tovább alakítja, vagy degradálja (downstream transzformációs termékeket hoz létre). A szakirodalmi adatok ismeretében azt valószínűsítjük, hogy az interakció során a *Pseudomonas* citokróm P-450 oxidoreduktázok, vagy lakkázok termelését aktiválja a gombában, de bizonyos esetekben a nitrogénforrás felélésével nitrogénéhezést idézhet elő, mely hatására a gomba elsavanyítja a tápközeget, ami nem-enzimatisan keletkező degradációs AFB1 származékok kialakulásához vezet.

A *P. paracarnis* izolátummal olyan folyadékfázisú *A. flavus* konfrontációs kísérletet hajtottunk végre, ahol nyomon tudtuk követni a konfrontáció során a fermentleében megjelenő metabolitok baktérium-, vagy gomba eredetét, illetve vizsgáltuk, hogy az önálló baktérium és gombatenyészetek sejtmentes fermentleve vagy hővel inaktivált biomasszája milyen választ vált ki a konfrontációs partnerben. A kísérlet az interakció során bekövetkező, gombában és baktériumban zajló metabolitszintű válaszreakciók mélyebb feltárását eredményezte. Az önálló tenyésztések során 492 szignifikáns metabolitot detektáltunk, melyből az *A. flavus* esetén 12, a *P. paracarnis* esetén 4, a szakirodalomban fellelhető bioaktív metabolitot azonosítottunk. A konfrontációs kölcsönhatás során a baktérium szinte teljes metabolitkészlete, a gombametabolitoknak pedig alig 7%-a jelent meg. A kölcsönhatás során nyolc olyan metabolitot detektáltunk, amelyeket sem a gomba, sem a baktérium sem önmagában, sem a partner organizmus sejtmentes felülszójában, sem az inaktivált partner micélium/sejt jelenlétében nem termelt. A nyolc metabolitból négy metabolit foszfatidil-etanolamin volt, mely bakteriális vezikulumok kibocsátásával, illetve gombasejt pusztulást kísérő membrán törmelék kiszabadulásával magyarázható. A másik négy metabolit közül az egyik egy egyértelműen beazonosítható gomba sziderofór, az N,N',N''-triacetil-fuzarinin, ezért valószínű, hogy a konfrontációban az *A. flavus* termeli. A maradék három N-acetil-fuzarinin tartalmú metabolit, melynek eredete nem ismert, de szerepe feltételezhetően sziderofór. Jelentősége a tápanyagokért, pontosabban a vasért folytatott versengésben van. Kísérleteink egy nagyívű projekt kezdetét jelentik, mely során a jövőben mélyebben megérthetjük a *Pseudomonas* vs. *A. flavus* interakciók kimenetelét meghatározó metabolikus mozgatórugókat és metabolikus válaszokat.

8. Summary

Aspergillus flavus is an opportunistic pathogenic fungus that infects oil-rich seeds worldwide (such as maize, cotton, and peanuts) and contaminates crops with mycotoxins (e.g., aflatoxin). Contamination with these toxins has long-term economic and health consequences, yet available mitigation strategies remain limited. The demand for sustainable biological control against *A. flavus* has made it necessary to identify increasingly effective biocontrol agents and to study the molecular mechanisms underlying their antagonistic effects. Since achieving self-sustaining biological control is difficult, the incorporation of bioactive metabolites produced by bacteria into plant protection may offer a promising alternative for the biological control of fungal pathogens. The literature indicates that many *Pseudomonas* species can serve as effective biocontrol agents against fungal pathogens, and all *Pseudomonas* species have the ability to produce some form of bioactive substance.

In our study, we aimed to isolate *Pseudomonas* strains from the maize rhizosphere and studying the nature of the interaction between the isolates and *A. flavus*. We isolated and identified a total of 51 *Pseudomonas* bacteria based on *rpoD* gene sequences. Except for six isolates, the strains were classified within the *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. koreensis*, *P. jessenii*, and *P. pohangensis* groups. The six unclassified isolates did not fit into any known *Pseudomonas* groups, so we selected one of them (Ps_91) for whole-genome sequencing. Comparative genomic and phylogenetic analyses confirmed that Ps_91 represents a previously undescribed *Pseudomonas* species.

Genome analysis of this new *Pseudomonas* species identified four NRPS, three RiPP, one PKS, and four other secondary metabolite gene clusters. Using HPLC-HRMS, we confirmed the production of ectoine, NAGGN, aryl-polyene, and HCN. These metabolites confer resistance to osmotic and oxidative stress and, due to HCN production, enhance the strain's potential application in agriculture. We phenotypically characterized this new species, determining its optimal growth parameters (28°C, 3–4% NaCl (w/v), pH 6.0), its cell size based on scanning electron microscopy (1.1–1.9 µm in length, 0.2–0.5 µm in width), and various biochemical characteristics (positive esculin hydrolysis, assimilation of N-acetylglucosamine, potassium gluconate, capric acid, trisodium citrate, and adipic acid; levan production, β-hemolysis, and catalase activity). We also established its fatty acid profile, which can aid in *Pseudomonas* species identification. The major fatty acids detected were C16:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C10:0 3-OH, C12:0 2-OH, C12:0 3-OH, and

C17:0 cyclo-fatty acids. The main polar lipids identified included phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, lysophosphatidylethanolamine, lysophosphatidylglycerol, and isoprenoid quinones (ubiquinone-9, 8, 4, and 2). Both the biochemical characteristics and fatty acid metabolite profile confirmed that Ps_91 is distinct from previously described species.

To further explore bioactive metabolite production, we cultivated the 51 *Pseudomonas* isolates in LB, King, and PDB media. We found that PDB medium facilitated the production of bioactive metabolites, making certain isolates suitable for biocontrol applications. We identified antibiotics (phenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxy-phenazine), CLP compounds (massetolid E, H), homoserine lactones (ethyl-homoserine lactone, N-octanoyl homoserine lactone, N-hexanoyl homoserine lactone, N-decanoyl homoserine lactone), and cyclodipeptides (cyclo-Pro-Met, cyclo-Tyr-Pro, cyclo-Pro-Val, cyclo-Tyr-Pro), all of which influence fungal pathogen growth through various mechanisms.

The interaction between the *Pseudomonas* isolates and *A. flavus* was studied in both solid and liquid phases. We tested whether these *Pseudomonas* isolates could degrade AFB1 on their own, but none exhibited AFB1-degrading activity. Therefore, any observed reduction in AFB1 levels during confrontation experiments must be attributed to interactions between the bacteria and fungi rather than a direct response to AFB1 presence.

In solid-phase confrontation assays, we first investigated the interaction via volatile compounds. In five cases, the fungal toxin production significantly increased, while in another five cases, toxin production was nearly completely suppressed. We examined the potential correlation between bacterial HCN volatile metabolite production and fungal AFB1 production, but found no direct relationship. The fact that the volatile metabolites of Ps_70, 29, 39, 60, and 38 suppressed *A. flavus* toxin production suggests the need for future studies to identify the volatile metabolites responsible.

Overall, 78% of the *Pseudomonas* isolates influenced AFB1 production in solid-phase confrontation assays, but only three isolates almost completely inhibited it. Interestingly, in liquid-phase confrontation assays, 72% of the isolates nearly completely blocked toxin production, and at least 39.3% also reduced fungal mycelial mass. The discrepancies between solid- and liquid-phase assays could be attributed to the efficient diffusion of bioactive compounds in liquid media. HPLC-HRMS analyses of AFB1 and its precursors or

downstream transformation products revealed that different *Pseudomonas* isolates modulate AFB1 production through multiple mechanisms.

We identified three main mechanisms of toxin modulation:

1. Inhibition of AFB1 biosynthesis, likely through regulation of the fungal toxin biosynthesis pathway. Only three isolates (*P. paracarnis* and two *P. chlororaphis* representatives) were able to completely suppress AFB1 production in both solid- and liquid-phase confrontation assays without the accumulation of precursors or degradation products. The *P. paracarnis* isolate produced antagonistic dipeptides (cyclo-Pro-Val, cyclo-Tyr-Pro) and 2 QS molecules (2-amino-acetophenone and ethyl-homoserine-lactone), while the *P. chlororaphis* isolates produced N-hexanoyl HSL, which might contribute to the antagonistic capacity of the bacteria.
2. According to another proposed mechanism, a significant decrease in AFB1 levels is accompanied by the accumulation of biosynthetic precursor metabolites. This phenomenon is likely due to the overactivation of OrdA oxidoreductase, a key enzyme in AFB1 biosynthesis. The bacterial metabolite responsible for triggering this response remains to be identified.
3. AFB1 transformation or degradation, potentially via enzymatic (cytochrome P-450 oxidoreductases, laccases) or non-enzymatic pathways (e.g., acidification due to nitrogen depletion).

We conducted a liquid-phase confrontation experiment with *P. paracarnis*, allowing us to track metabolite origins (bacterial vs. fungal) and examine confrontation-induced metabolic responses. Among 492 significant metabolites detected, 12 from *A. flavus* and one from *P. paracarnis* had no known literature references. During interaction, the bacterial metabolite profile was nearly entirely altered, while only 7% of fungal metabolites remained. Notably, we identified eight metabolites that were absent in individual cultures and required the presence (and therefore the interaction) of both organisms for production. Four of these were phosphatidylethanolamines, likely originating from bacterial vesicles or fungal membrane breakdown. Another was N,N',N''-triacetyl-fusarinin, a fungal siderophore, suggesting an *A. flavus* response to iron limitation. The remaining three were N-acetyl-fusarinin derivatives, which may also function as siderophores.

Our research marks the beginning of a broader project aimed at deciphering the metabolic drivers of *Pseudomonas-A. flavus* interactions. Future studies will focus on identifying key bacterial metabolites and understanding their regulatory roles in fungal toxin suppression.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani korábbi és jelenlegi tanszékvezetőinknek Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának és Prof. Dr. Papp Tamásnak, amiért lehetővé tették számomra, hogy PhD munkámat a tanszéken végezhessem.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Varga Mónikának és Dr. Hamari Zsuzsannának, akik kitartó és fáradhatatlan munkájukkal és szakmai odafigyelésükkel és segítségükkel támogattak a munkám során és akikhez minden körülmény között bizalommal fordulhattam, akik nélkül a dolgozat és a publikációk nem jöhettek volna létre.

Hálával tartozom házibírómnak Dr. Ámon Juditnak, aki elvállalta és szakmai észrevételeivel segítette disszertációm jobbá tételét.

Köszönettel tartozom Dr. Kocsubé Sándornak, aki a bioinformatikai vizsgálatok során nyújtott segítséget.

Köszönet illeti Dr. Szekeres Andrást, akihez bármikor fordulhattam segítségért, valamint amiért az Elválasztástudományi Kutatócsoport tagja lehettem.

Köszönet illeti a 310. labor munkatársait. Külön szeretném megköszönni Buella-Tóth Barbarának, Valentiny Robertának, Tari Kittinek, Schwartz Balázsnak, Hercegfalvi Dánielnek és Kasuba Csengének, akik segítségükkel és bátorításukkal hozzájárultak munkám sikeréhez.

Köszönettel tartozom Dr. Farkas Attilának, aki a pásztázó elektronmikroszkópos képek készítésében nyújtott segítséget.

Szeretném megköszönni Dr. Allaga Henriettának a kukorica rizoszféra minták beszerzésében nyújtott segítségét.

Külön szeretném megköszönni Dr. Veres Csillának, Dr. Homa Mónikának, Kovács Tamásnak, Varga Andrásnak és Jáger Olivérnek a segítséget és a támogatást, mellyel nagyban hozzájárultak munkám előrehaladásához.

Szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni Családomnak és Barátaimnak, akik támogatásukkal mindig segítették tanulmányaimat és akiknek biztató szavai nagyban hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönet illeti a Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi dolgozóját, akik bármilyen módon hozzájárultak munkám sikeréhez.

A disszertáció a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFIH K139312, a 2021-1.2.4-TÉT-2021-00039 és a Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj (NTP-NFTÖ-22-B-0096) pályázatok támogatásával készült.

10. Irodalomjegyzék

- Abdel-Rhman, S.H., El-Mahdy, A. M., El-Mowafy, M. Effect of tyrosol and farnesol on virulence and antibiotic resistance of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed. Res. Int.* 2015.
- Abe, S., Furuya, A., Saito, T., Takayama, K. Method of Producing L-Malic Acid by Fermentation. *U.S. Patent* 3,063,910, 13 November 1962.
- Adebo, O.A., Njobeh, P.B., Sidu, S., Tlou, M.G., Mavumengwana, V. Aflatoxin B1 degradation by liquid cultures and lysates of three bacterial strains. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 233, 11–19.
- Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., Grimont, P. D. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol.* 2005, 156:763–773.
- Agustí, L., Bonaterra, A., Moragrega, C., Camps, J., Montesinos, E.. Biocontrol of root rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum* with a combination of two *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Pathol.* 2011, 93, 363–372.
- Andersen, SM., Johnsen, K., Sørensen, J., Nielsen, P., Jacobsen, CS. *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000, 50 Pt 6:1957–1964.
- Baldrian, P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004, 50, 245–253.
- Ballio, A., Barsyringaera, D., Bossa, F., Collina, A., Grgurina, I., Marino, G., és mtsai.. Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEMS Lett.* 1991, 291(1),109-112.
- Barkal, L. J., Theberge, A. B., Guo, C. J., Spraker, J., Rappert, L., Berthier, J., Brakke, K. A., Wang, C. C. C., Beebe, D. J., Keller, N. P., Berthier, E. Microbial metabolomics in open microscale platforms. *Nat. Commun.* 2016, 7, 10610.
- Bassarello, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., Riccio, R., és mtsai. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J. Nat. Prod.* 2004, 67(5), 811-6.
- Battat, E.; Peleg, Y.; Bercovitz, A.; Rokem, J.S.; Goldberg, I. Optimization of l-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 1991, 37, 1108–1116.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., Smalla, K. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front Microbiol.* 2014, 5, 148.
- Bartholomew, JW., Mittwer, T. The Gram stain. *Bacteriol Rev.* 1952, 16:1–29.
- Bennett, J.W., Klich, M., Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003, 16:497–516.
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, HE., Reitz, ZL., Biermann, F. és mtsai. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Res.* 2023, 51:W46–W50.
- Blount, W.P. Disease of turkey poults. *Vet. Rec.* 1960, 72(38):786.
- Bolger, AM., Lohse, M., Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014, 30:2114–2120.
- Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., Montesinos, E. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms.* 2022, 10, 1759.
- Calderón, C. E., Pérez-García, A., de Vicente, A., Cazorla, F. M.. The dar genes of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 are crucial for biocontrol activity via production of the antifungal compound 2-hexyl, 5-propyl resorcinol. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2013, MPMI, 26(5), 554–565.

- Campos-Avelar, I., Colas de la Noue, A., Durand, N., Fay, B., Martinez, V., Fontana, A., Strub, C., Schorr-Galindo, S. Minimizing ochratoxin A contamination through the use of Actinobacteria and their active molecules. *Toxins*. 2020, 12, 296.
- Campos, V.L., Valenzuela, C., Yarza, P., Kämpfer, P., Vidal, R. és mtsai. *Pseudomonas arsenicoxydans* sp. nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. *Syst Appl Microbiol*. 2010, 33:193–197.
- Cámara, B., Strömpl, C., Verbarg, S., Spröer, C., Pieper, DH. és mtsai. *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007, 57:923–931.
- Cern, A., Connolly, K.L., Jerse, A.E., Barenholz, Y. *In Vitro* Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* Strains to Mupirocin, an Antibiotic Reformulated for Parenteral Administration in Nanoliposomes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2018, 62, e02377-17.
- Chang, D-H., Rhee, M-S., Kim, J-S., Lee, Y., Park, MY. és mtsai. *Pseudomonas kribbensis* sp. nov., isolated from garden soils in Daejeon, Korea. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016, 109:1433–1446.
- Chaurasia B, Pandey A, Palni LM, Trivedi P, Kumar B, Colvin N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiol. Res*. 2005, 160(1):75-81.
- Chen, Y., Wang, J., Yang, N. és mtsai. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. *Nat. Commun*. 2018, 9, 3429.
- Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z., Chet, I. Pyrrolnitrin Production by an *Enterobacter agglomerans* Strain with a Broad Spectrum of Antagonistic Activity Towards Fungal and Bacterial Phytopathogens. *Curr. Microbiol*. 1996, 32, 208–212.
- Ciegler, A., Peterson, R.E. Aflatoxin detoxification: Hydroxydihydro-aflatoxin B1. *Appl. Microbiol*. 1968, 16, 665–666.
- Coleman, J.J.; Wasmann, C.C.; Usami, T.; White, G.J.; Temporini, E.D.; McCluskey, K.; VanEtten, H.D. Characterization of the gene encoding pisatin demethylase (FoPDA1) in *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2011, 24, 1482–1491.
- Conly, J.M., Johnston, B.L. Mupirocin-Are We in Danger of Losing It? *Can. J. Infect. Dis*. 2002, 13, 157–159.
- Crowe, J.D., Olsson, S. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001, 67, 2088–2094.
- Cui Q., Lewis I.A., Hegeman A.D., Anderson M.E., Li J., Schulte C.F., Westler W.M., Eghbalian H.R., Sussman M.R., Markley J.L. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol*. 2008, Feb;26(2):162-4.
- Cuppels, D. A., Stipanovic, R. D., Stoessl, A. Stothers, J. B.. The constitution and properties of a pyochelin-zinc complex. *Can. J. Chem*. 1987, 65, 2126–2130.
- Czech, L., Hermann, L., Stöveken, N., Richter, AA., Höppner, A. és mtsai. Role of the Extremolytes Ectoine and Hydroxyectoine as Stress Protectants and Nutrients: Genetics, Phylogenomics, Biochemistry, and Structural Analysis. *Genes (Basel)*. 2018, 9:177.

- David, N. Dowling., Fergal, O’Gara. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*. 1994, Volume 12, issue 4:133-141.
- de Bruijn, I., de Kock, M.J.D., de Waard, P., van Beek, T.A., Raaijmakers, J.M. Massetolide A Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J of Bacteriology*. 2008, Vol. 190, No. 8.
- Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, JM. és mtsai. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002, 52:513–523.
- Deveau A., Bonito G., Uehling J., Paoletti M., Becker M., Bindschedler S., Hacquard S., Hervé V., Labbé J., Lastovetsky O.A., Mieszkina S., Millet L.J., Vajna B., Junier P., Bonfante P., Krom B.P., Olsson S., van Elsas J.D., Wick L.Y. Bacterial-fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol Rev*. 2018, May 1;42(3):335-352.
- Díaz, M., Bach, T., González, AG., Agaras, B., Wibberg, D. és mtsai. Agronomic efficiency and genome mining analysis of the wheat-biostimulant rhizospheric bacterium *Pseudomonas pergaminensis* sp. nov. strain 1008T. *Front Plant Sci*. 2022, 13:894985.
- Dorner, J.W., Lamb, M.C. Development and commercial use of afla-Guard®, an aflatoxin biocontrol agent. *Mycotoxin Res*. 2006, 22, 33–38.
- Doyle, M.P., Marth, E.H. Aflatoxin is degraded by mycelia from toxigenic and nontoxigenic strains of aspergilli grown on different substrates. *Mycopathologia*. 1978, 63, 145–153.
- Dudareva, N., Klemm, A., Muhlemann, J.K., Kaplan, I. Biosynthesis, Function and Metabolic Engineering of Plant Volatile Organic Compounds. *New Phytol*. 2013, 198, 16–32.
- Duman, M., Mulet, M., Altun, S., Satıcıoğlu, IB., Gomila, M. és mtsai. *Pseudomonas piscium* sp. nov., *Pseudomonas pisciculturæ* sp. nov., *Pseudomonas mucoides* sp. nov. and *Pseudomonas neuropathica* sp. nov. isolated from rainbow trout. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2021, 71:004714.
- Dwivedi, D., Johri, B.N.. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Curr. Sci*. 2003, 85, 1693-1703.
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., Picheulla, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J Chem Ecol*. 2012, 8(6):665-703.
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem. Toxicol*. 1998, 36, 321–326.
- Emms, DM., Kelly, S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol*. 2019, 20:238.
- Eshelli, M., Harvey, L., Edrada-Ebel, R., McNeil, B. Metabolomics of the Bio-Degradation Process of Aflatoxin B1 by Actinomycetes at an Initial pH of 6.0. *Toxins*. 2015, 7, 439–456.
- Ferrigo, D., Mondin, M., Scopel, C., Dal Maso, E., Stefenatti, M., Raiola, A., Causin, R. Effects of a prothioconazole- and tebuconazole-based fungicide on *Aspergillus flavus* development under laboratory and field conditions. *Eur. J. Plant Pathol*. 2019, 155, 151–161.
- Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002, Jan;48(1-2):155-71.

- Fierer N., Jackson R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006,103(3):626–631.
- Furmanczyk, EM., Kaminski, MA., Lipinski, L., Dziembowski, A., Sobczak, A. *Pseudomonas laurylsulfatovorans* sp. nov., sodium dodecyl sulfate degrading bacteria, isolated from the peaty soil of a wastewater treatment plant. *Syst Appl Microbiol.* 2018, 41:348–354.
- Gao, P., Xu, G. Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: recent developments and applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407(3), 669–680.
- Gerard, J., Lloyd, R., Barsby, T., Haden, P., Kelly, M.T., Andersen, R.J. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two Pseumonads isolated from marine habitats. *Journal of Natural Products* 60. 1997, 60, 223–229.
- Geudens, N., Martins, J. C. Cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp. - Biological swiss-army knives. *Front Microbiol.* 2018, 9, 1867.
- Ghooi R.B., Thatte S.M. Inhibition of cell wall synthesis is this the mechanism of action of penicillins? *Med Hypotheses.* 1995, 44(2):127-31.
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., De Mot, R.. The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida*. Group. *Microorganisms.* 2021, 9(8), 1766.
- Gong A.D., Wu N.N., Kong X.W., Zhang Y.M., Hu M.J., Gong S.J., Dong F.Y., Wang J.H., Zhao Z.Y., Liao Y.C. Inhibitory effect of volatiles emitted from *Alcaligenes faecalis* N1-4 on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in storage. *Front Microbiol.* 2019, 10:1419.
- Gong, A.D., Lei, Y.Y., He, W.J., Liao, Y.C. és mtsai. The Inhibitory Effect of *Pseudomonas stutzeri* YM6 on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxins Production by the Production of Volatile Dimethyl Trisulfide. *Toxins.* 2022, 14(11), 788.
- Gould, W.D., Hagedorn, C., Bardinelli, T.R., Zablutowicz, R.M. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent Pseudomonads from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 49, 28–32.
- Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., Gerwick, W. H. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem. Biol.* 2007, 14(1), 53-63.
- Grosse, C., Brandt, N., Antwerpen, PV., Wintjens, R., Matthijs, S. Two new siderophores produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 10586: The anti-oomycete non-ribosomal peptide synthetase-dependent mupirochelin and the NRPS-independent triabactin. *Sec. Microbial Physiology and Metabolism.* 2023, vol.14.
- Groupé, V., Pugh, L. H., Weiss, D., and Kochi, M. Observations on antiviral activity of viscosin. *Exp. Biol. Med.* 1951, 78(1), 354-358.
- Haas, D., Défago, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3, 307–319.
- Hamid, A.B., Smith, J.E. Degradation of Aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *J. Gen. Microbiol.* 1987, 133, 2023–2029.
- Harwood, C. S., Fosnaugh, K., Dispensa, M. Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *J. Bacteriol.* 1989, 171(7), 4063–4066.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 3086–3091.

- Herrington P.R., Craig J.T., Sheridan J.E., Methyl vinyl ketone: A volatile fungistatic inhibitor from *Streptomyces griseoruber*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1987, 19:5, 509-512.
- Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh, L.S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol*. 2018, 35:518–522.
- Horak, I., Engelbrecht, G., van Rensburg, P. J. J., Claassens, S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *J. Appl. Microbiol*. 2019, 127(2), 326-342.
- Höfte, M., Altier, N. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol*. 2010, 161(6), 464-471.
- Hruska, Z., Rajasekaran, K., Yao, H., Kincaid, R., Darlington, D., Brown, R.L., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. Co-inoculation of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* to study fungal invasion, colonization, and competition in maize kernels. *Front. Microbiol*. 2014, 5, 122.
- Hu, W., Gao, Q., Hamada, M. S., Dawood, D. H., Zheng, J., Chen, Y., Ma, Z. Potential of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pcho10 as a Biocontrol Agent Against *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*. 2014,104(12), 1289–1297.
- Hua, S.S.T., Sarreal, S.B.L., Chang, P.-K., Yu, J. Transcriptional regulation of aflatoxin biosynthesis and conidiation in *Aspergillus flavus* by *Wickerhamomyces anomalus* WRL-076 for reduction of aflatoxin contamination. *Toxins*. 2019, 11, 81.
- Huang, R., Feng, Z., Chi, X., Sun, X., Lu, Y., Zhang, B., Lu, R., Luo, W., Wang, Y., Miao, J., Ge, Y. Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum*. *Microbiol Res*. 2018, 215, 55–64.
- Huynh, T., Vörös, M., Kedves, O., Turbat, A., Sipos, G., Leitgeb, B., Kredics, L., Vágvölgyi, C., & Szekeres, A. Discrimination between the Two Closely Related Species of the Operational Group *B. amyloliquefaciens* Based on Whole-Cell Fatty Acid Profiling. *Microorganisms*. 2022,10(2):418.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Summaries and Evaluations: Aflatoxins. *IARC Press*. Lyon, France. 2002.
- Jain, C., Rodriguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T., Aluru, S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun*. 2018, 9:5114.
- Jayakumar, P., Rahul, G.R., Kennedy, R., Subashri, R., Sakthivel, N. Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *J. Biol. Control*. 2011, 25. 165-181.
- Jermnak, U., Chinaphuti, A., Poapolathep, A., Kawai, R., Nagasawa, H., Sakuda, S. Prevention of aflatoxin contamination by a soil bacterium of *Stenotrophomonas* sp. that produces aflatoxin production inhibitors. *Microbiology*. 2013, 159, 902–912.
- Jeyarajah, E. J., Cromwell, W. C., Otvos, J. D. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin. Lab. Med*. 2006, 26(4), 847–870.
- Jia, J., Wang, X., Deng, P., Ma, L., Baird, S.M. és mtsai. *Pseudomonas glycinae* sp. nov. isolated from the soybean rhizosphere. *Microbiology Open*. 2020, 9:e1101.
- Jiang, M. Y., Wang, Z. R., Chen, K. W., Kan, J. Q., Wang, K. T., Zal' an, Z. és mtsai.

- Inhibition of postharvest gray mould decay and induction of disease resistance by *Pseudomonas fluorescens* in grapes. *Acta Alimentaria*. 2019, 48(3), 288–296.
- Josselin, L., Clerck, CD., Boevre, MD., Moretti, A., Fauconnier, ML. Impact of Volatile Organic Compounds on the Growth of *Aspergillus flavus* and Related Aflatoxin B1 Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(24).
- Kaddes, A., Fauconnier, M.L., Jijakli, M.H., Sassi, K., Nasraoui, B. Antifungal Properties of Two Volatile Organic Compounds on Barley Pathogens and Introduction to Their Mechanism of Action. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019, 16, 2866.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, BQ., Wong, TKF., von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nat Methods*. 2017, 14:587–589.
- Kaminski, MA., Furmanczyk, EM., Sobczak, A., Dziembowski, A., Lipinski, L. *Pseudomonas silesiensis* sp. nov. strain A3T isolated from a biological pesticide sewage treatment plant and analysis of the complete genome sequence. *Syst Appl Microbiol*. 2018, 41:13–22.
- Kang, BR., Anderson, AJ., Kim, YC. Hydrogen Cyanide Produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6 Exhibits Nematicidal Activity against *Meloidogyne hapla*. *Plant Pathol J*. 2018, 34:35–43.
- Kang, BR., Anderson, AJ., Kim, YC. Hydrogen Cyanide Produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a key aphicidal metabolite. *Can J Microbiol*. 2019, 65:185–190.
- Katoh, K., Standley, DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol*. 2013, 30:772–780.
- Khoshnood, S., Heidary, M., Asadi, A., Soleimani, S., Motahar, M., Savari, M., Saki, M., Abdi, M. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomed. Pharmacother*. 2019, 109, 1809–1818.
- King, EO., Ward, MK., Raney, DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med*. 1954, 44:301–307.
- Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 1980, 286, 885–886.
- Knowles, C. J. Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev*. 1976, 40:652–680.
- Kong, Q., Chi, C., Yu, J., Shan, S., Li, Q., Li, Q., Guan, B., Nierman, W.C., Bennett, J.W. The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2014, 98, 5161–5172.
- Kosina, M., Barták, M., Mašláňová, I., Pascutti, AV., Sedo, O. és mtsai. *Pseudomonas prosekii* sp. nov., a novel psychrotrophic bacterium from Antarctica. *Curr Microbiol*. 2013, 67:637–646.
- Kovács, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*. 1956, 178:703.
- Kumar, R.; Kaur, J.; Jain, S.; Kumar, A. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *J. Genet. Eng. Biotechnol*. 2016, 14, 125–131.
- Kumar, R. S., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A. V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O., Sakthivel, N. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J. Appl. Microbiol*. 2005, 98(1), 145–154.

- Kumar, V., Bahuguna, A., Ramalingam, S., Dhakal, G., Shim, J.-J., Kim, M. Recent technological advances in mechanism, toxicity, and food perspectives of enzyme-mediated aflatoxin degradation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022, 62, 5395–5412.
- Kück, P., Longo, G.C. FASconCAT-G: extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Front. Zool.* 2014, 11:81.
- Kwon, S.W., Kim, J.S., Park, I.C., Yoon, S.H., Park, D.H. és mtsai. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003, 53:21–27.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective, *Microorganisms.* 2022, 10(3), 596.
- Lakkis, S., Trotel-Aziz, P., Rabenoelina, F., Schwarzenberg, A., Nguema-Ona, E., Clément, C., Aziz, A. Strengthening grapevine resistance by *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 relies on distinct defense pathways in susceptible and partially resistant genotypes to downy mildew and gray mold diseases. *Front. Plant. Sci.* 2019, 10, 1112.
- Leisinger, T., Margraff, R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* 1979, 43(3), 422–442.
- Lelliott, R.A., Billing, E., Hayward, A.C. A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonads. *J Appl Bacteriol.* 1966, 29:470–489.
- Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., Hochman, A. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1992, 40, 163–171.
- Létoffé, S., Wu, Y., Darch, S.E. és mtsai. *Pseudomonas aeruginosa* Production of Hydrogen Cyanide Leads to Airborne Control of *Staphylococcus aureus* Growth in Biofilm and In Vivo Lung Environments. *mBio.* 2022, 26;13(5):e0215422.
- Li, S., Li, X., Liu, X., Zhang, Q., Fang, J., Li, X., Yin, X. Stability evaluation of aflatoxin B1 solution certified reference material via Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with High-Resolution Mass Spectrometry. *ACS Omega.* 2022, 7, 40548–40557.
- Li, Z., & Nair, S. K. Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein. Sci.* 2012, 21(10), 1403–1417.
- Liao, K., Liu, J., Gu, Y.-L., Wang, C., Wei, H.-L. *Pseudomonas cucumis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of crop plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2023, 73:006208.
- Liu, D.-L., Yao, D.-S., Liang, Y.-Q., Zhou, T.-H., Song, Y.-P., Zhao, L., Ma, L. Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food Chem. Toxicol.* 2001, 39, 461–466.
- Liu X., Bimerew M., Ma Y., Müller H., Ovadis M., Eberl L., Berg G., Chernin L. Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007, 270(2):299–305.
- Lurthy, T., Gerin, F., Rey, M., Merccier, P.E., Comte, G., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C. *Pseudomonas* produce various metabolites displaying herbicide activity against boomrape. *Microbiological Research.* 2025, 290, 127933.

- Lutz M.P., Wenger S., Maurhofer M., D'Á Fago G.V., Duffy B. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004, 48(3):447–455.
- Ma, Z., Geudens, N., Kieu, N. P., Sinnaeve, D., Ongena, M., Martins, J. C., Höfte, M. Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 382. (a)
- Ma, Z., Hua, G. K. H., Ongena, M., Höfte, M. Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean. *Environ. Microbiol. Rep.* 2016, 8(5), 896–904. (b)
- Madbouly, A.K.; Rashad, Y.M.; Ibrahim, M.I.M.; Elazab, N.T. Biodegradation of Aflatoxin B1 in Maize Grains and Suppression of Its Biosynthesis-Related Genes Using Endophytic *Trichoderma harzianum* AYM3. *J. Fungi.* 2023, 9, 209.
- Mannaa, M., Oh, J., Kim, K.D. Microbe-mediated control of *Aspergillus flavus* in stored rice grains with focus on aflatoxin inhibition and biodegradation. *Ann. Appl. Biol.* 2017, 171, 376–392.
- Marshall, H., Meneely, J.P., Quinn, B., Zhao, Y., Bourke, P., Gilmore, B.F., Zhang, G., Elliott, C.T. Novel decontamination approaches and their potential application for post-harvest aflatoxin control. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 106, 489–496.
- McLean, M., Dutton, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacol. Ther.* 1995, 65, 163–192.
- Mehnaz, S., Saleem, R.S., Yameen, B., Pianet, I., Schnakenburg, G., Pietraszkiewicz, H., Valeriote, F., Josten, M., Sahl, H.G., Franzblau, S.G., Gross, H. Lahorenoic acids A-C, ortho-dialkyl-substituted aromatic acids from the biocontrol strain *Pseudomonas aurantiaca* PB-St2. *J Nat Prod.* 2013, 76(2):135-141.
- Meier-Kolthoff, J.P., Carbasse, J.S., Peinado-Olarte, R.L., Göker, M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2021, 50:D801–D807.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A., Raaijmakers, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria, *Science.* 2011, 332(6033), 1097–1100.
- Meneguzzi, R.V., Fernandez, M., Cappellari, L.R., Giordano, W., Banchio, E. Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Bacteria from the Rhizosphere of Medicinal and Aromatic Plant *Minthostachys verticillata*. *Plants.* 2024, 13(15), 2062.
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., és mtsai. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol.* 2020, 37:1530–1534.
- Minnikin, D.E., O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M. és mtsai. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *Journal of Microbiological Methods.* 1984, 2:233–241.
- Moore R.E., Emery T. Nalpa-acetylufusarinines: isolation, characterization, and properties. *Biochemistry.* 1976, 15(13):2719-23.
- Mukherjee S., Bassler B.L. Bacterial quorum-sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol.* 2019, 17(6):371–382.
- Mulet, M., Bennisar, A., Lalucat, J., García-Valdés, E. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol Cell Probes.* 2009, 23:140–147.

- Mulet, M.; Lalucat, J.; García-Valdés, E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 2010, 12, 1513–1530.
- Ni, H., Kong, W.L., Wu, X.Q. Effects of Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas aurantiaca* ST-TJ4 against *Verticillium dahliae*. *J Fungi.* 2022, 30;8(7):697.
- Nielsen K.F., Smedsgaard J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A.* 2003, 1002(1-2):111-36.
- Ntana, F., Hennessy, R.C., Zervas, A., Stougaard, P. *Pseudomonas nunensis* sp. nov. isolated from a suppressive potato field in Greenland. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2023, 73.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Int. J. Food. Microbiol.* 2001, 70(1-2), 53–61.
- Palumbo, J.D., Baker, J.L., Mahoney, N.E. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microb. Ecol.* 2006, 52, 45–52.
- Palumbo, J.D., O’Keeffe, T.L., Abbas, H.K. Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *J. Food Prot.* 2007, 70, 1615–1621.
- Papp, D.A., Kocsubé, S., Farkas, Z., Szekeres, A., Vágvölgyi, C., Hamari, Z., Varga, M. Aflatoxin B1 Control by Various *Pseudomonas* Isolates. *Toxins.* 2024, 16, 367.
- Parwata, I.P., Wahyuningrum, D., Suhandono, S., Hertadi, R. Production of ectoine by *Halomonas elongata* BK-AG25 using osmotic shock technique. *Earth and Environmental Science.* 2018, 209,012017.
- Pei, A.Y., Oberdorf, W.E., Nossa, C.W., Agarwal, A., Chokshi, P. és mtsai. Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Appl Environ Microbiol.* 2010, 76:3886–3897.
- Pellicciaro, M., Padoan, E., Lione, G., Celi, L., Gonthier, P. Pyoluteorin Produced by the Biocontrol Agent *Pseudomonas protegens* Is Involved in the Inhibition of *Heterobasidion* Species Present in Europe. *Pathogens.* 2022, 23;11(4):391.
- Peng, B., Li, H., Peng, X. X. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein Cell.* 2015, 6(9), 628–637.
- Piechulla B., Degenhardt J. The emerging importance of microbial volatile organic compounds. *Plant Cell Environ.* 2014, 37(4):811-2.
- Pierce E.C., Morin M., Little J.C., Liu R.B., Tannous J., Keller N.P., Pogliano K., Wolfe B.E., Sanchez L.M., Dutton R.J. Bacterial-fungal interactions revealed by genome-wide analysis of bacterial mutant fitness. *Nat Microbiol.* 2021, 6(1):87-102.
- Pinu, F. R., Villas-Boas, S. G., Aggio, R. Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: Quenching and extraction protocols. *Metabolites.* 2017, 7(4), 53.
- Poblete-Morales, M., Carvajal, D., Almasia, R., Michea, S., Cantillana, C. és mtsai. *Pseudomonas atacamensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of desert bloom plant in the region of Atacama, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2020, 113:1201–1211.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., De Kock, M. J. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2006, 19(7), 699–710.

- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010, 34(6), 1037–1062.
- Rabiço, F., Borelli, TC., Alnoch, RC. és mtsai. Novel *Pseudomonas* Species Prevent the Growth of the Phytopathogenic Fungus *Aspergillus flavus*. *Bio Tech.* 2024, 13(2), 8
- Rainey, P. B., Brodey, C. L., Johnstone, K. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1991, 39, 57-70.
- Raio, A. Diverse roles played by “*Pseudomonas fluorescens* complex” volatile compounds in their interaction with phytopathogenic microorganisms, pests and plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2024, 40:80.
- Rauscher, M. International Trade, Factor Movements, and the Environment; Clarendon Press: Oxford, UK. 1997.
- Rawal, S.; Kim, J.E.; Coulombe, R. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res. Vet. Sci.* 2010, 89, 325–331.
- Razo-Belman, R., Ozuna, C. Volatile Organic Compounds: A Review of Their Current Applications as Pest Biocontrol and Disease Management. *Horticulturae.* 2023, 9(4), 441.
- Ren, X., Zhang, Q., Zhang, W., Mao, J., Li, P. Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. *Toxins.* 2020, 12, 24.
- Reshetnikov, AS., Khmelenina, VN., Mustakhimov, II., Trotsenko, YA. Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs. *Methods Enzymol.* 2011, 495:15-30.
- Rijavec, T., Lapanje, A. Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Front Microbiol.* 2016, 18:7:1785.
- Robens, J.F., Richard, J.L. Aflatoxins in animal and human health. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1992, 127, 69–94.
- Rudra, B., Gupta. RS. Phylogenomics studies and molecular markers reliably demarcate genus *Pseudomonas* sensu stricto and twelve other Pseudomonadaceae species clades representing novel and emended genera. *Front Microbiol.* 2024, 14:1273665.
- Saati-Santamaría, Z., Peral-Aranega, E., Velázquez, E., Rivas, R., García-Fraile, P. Phylogenomic analyses of the genus *Pseudomonas* lead to the rearrangement of several species and the definition of new genera. *Biology.* 2021,10(8), 782.
- Sagot, B., Gaysinski, M., Mehiri, M., Guigonis, J., Le Rudulier, D., Alloing, G., Osmotically induced synthesis of the dipeptide N-acetylglutaminyglutamine amide is mediated by a new pathway conserved among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010,107 (28) 12652-12657.
- Samuel,M.S.; Sivaramakrishna, A.; Mehta, A. Degradation and detoxification of aflatoxin B1 by *Pseudomonas putida*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014, 86, 202–209.
- Sangare, L., Zhao, Y., Folly, Y.M.E., Chang, J., Li, J., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Liu, Y. Aflatoxin B1 Degradation by a *Pseudomonas* Strain. *Toxins.* 2014, 6, 3028–3040.
- Sasser, M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc. 1990.

- Schamann, A., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., Kulling, S.E., Soukup, S.T. Formation of B- and M-group aflatoxins and precursors by *Aspergillus flavus* on maize and its implication for food safety. *Mycotoxin Res.* 2022, 38, 79–92.
- Schalk, I.J., Rigouin, C., Godet, J. An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environ. Microbiol.* 2020, 22, 1447–1466.
- Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A.H.M., Peer, R.V. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant and Soil.* 1990, 129, 75–83.
- Schmidt R., Jager V., Zuhlke D. és mtsai. Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite Sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C. *Sci Rep.* 2017, 7(1):862.
- Schöner, TA., Gassel, S., Osawa, A., Tobias, NJ., Okuno, Y. és mtsai. Aryl Polyenes, a Highly Abundant Class of Bacterial Natural Products, Are Functionally Related to Antioxidative Carotenoids. *ChemBioChem.* 2016, 17:247–253.
- Schwechheimer, C., Kuehn, MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol.* 2015, 13(10):605–19.
- Segre, A., Bachmann, R. C., Ballio, A., Bossa, F., Grgurina, I., Iacobellis, N. S., és mtsai. The structure of syringomycins A1, E and G. *FEMS Lett.* 1989, 255.
- Shahid, I., Han, J., Hardie, D., Baig, D. N., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. Profiling of antimicrobial metabolites of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. isolated from different plant hosts. *3 Biotech.* 2021, 11(2), 48.
- Sindhu, S. S., Dadarwal, K. R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea, *Microbiol. Res.* 2001, 156(4), 353–358.
- Singh, J.; Mehta, A. The main Aflatoxin B1 degrading enzyme in *Pseudomonas putida* is thermostable lipase. *Heliyon.* 2022, 8, e10809.
- Sipos, P., Peles, F., Brassó, D.L., Béri, B., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., Győri, Z. Physical and chemical methods for reduction in aflatoxin content of feed and food. *Toxins.* 2021, 13, 204.
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. *Microb. Biotechnol.* 2021, 14(1), 136–146.
- Sorensen, D., Nielsen, T. H., Christophersen, C., Sørensen, J., Gajhede, M. Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Acta crystallogr. C.* 2001, 57(Pt 9), 1123–1124.
- Spraker J.E., Jewell K., Roze L.V., Scherf J., Ndagano D., Beaudry R., Linz J.E., Allen C., Keller N.P. A volatile relationship: profiling an inter-kingdom dialogue between two plant pathogens, *Ralstonia solanacearum* and *Aspergillus flavus*. *J Chem Ecol.* 2014, 40(5):502–513.
- Spraker, J.E., Wiemann, P., Baccile, J.A., Venkatesh, N., Schumacher, J., Schroeder, F.C., Conserved responses in a war of small molecules between a plant-pathogenic bacterium and fungi. *Mbio.* 2018, 9: e00820–e00818
- Strano, C.P., Bella, P., Licciardello, G., Caruso, A., Catara, V. Role of secondary metabolites in the biocontrol activity of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*. *Eur J Plant Pathol.* 2017, 149:103–115.
- Suresh, G., Cabezudo, I., Pulicharla, R., Cuprys, A., Rouissi, T., Brar, S.K. Biodegradation of aflatoxin B1 with cell-free extracts of *Trametes versicolor* and *Bacillus subtilis*. *Res. Vet. Sci.* 2020, 133, 85–91.

- Sweany, R.R., Mack, B.M., Moore, G.G., Gilbert, M.K., Cary, J.W., Lebar, M.D., Rajasekaran, K., Damann, K.E. Genetic responses and aflatoxin inhibition during co-culture of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Toxins*. 2021, 13, 794.
- Taylor, M.C., Jackson, C.J., Tattersall, D.B., French, N., Peat, T.S., Newman, J., Briggs, L.J., Lapalikar, G.V., Campbell, P.M., Scott, C. Identification and characterization of two families of F420H2-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation. *Mol. Microbiol.* 2010, 78, 561–575.
- Tchagang, C. F., Xu, R., Overy, D., Blackwell, B., Chabot, D., Hubbard, K., Doumbou, C. L., Bromfield, E., Tambong, J. T. Diversity of bacteria associated with corn roots inoculated with Canadian woodland soils, and description of *Pseudomonas aylmerense* sp. nov.. *Heliyon*. 2018, 4(8), e0076.
- Thomashow LS, Weller DM. Plant-microbe interactions. US: Springer; Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. *Plant-Microbe Interact.* 1996, 1, 187–235.
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., Raaijmakers, J. M. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.* 2007, 175(4), 731–742.
- Travin, DY., Watson, ZL., Metelev, M., Ward, FR., Osterman, IA. Structure of ribosome-bound azole-modified peptide phazolicin rationalizes its species-specific mode of bacterial translation inhibition. *Nat Commun.* 2019, 10:4563.
- Tripathi, R. K., Gottlieb, D. Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *J. bacteriol.* 1969, 100(1), 310–318.
- Uduary, D.W.; Casillas, L.K.; Townsend, C.A. Synthesis of 11-hydroxyl O-methylsterigmatocystin and the role of a cytochrome P-450 in the final step of aflatoxin biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 5294–5303.
- Uroz S., Heinonsalo J. Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008, 65(2):271-8.
- Usta, C. Microorganisms in Biological Pest Control - A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors). *InTech*. 2013, 32, 137–144.
- Vandenkoornhuyse P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., and Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *N. Phytol.* 2015, 206, 1196–1206.
- Verheecke, C., Liboz, T., Mathieu, F. Microbial degradation of aflatoxin B1: Current status and future advances. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 237, 1–9.
- Verhille, S., Baïda, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Izard, D. és mtsai. *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. *Int J Syst Bacteriol.* 1999, 49 Pt 4:1559–1572.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D., Leclerc, H. Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Natural Mineral Waters: Proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 1999, 22:45–58.
- Walsh J.P., DesRochers N., Renaud J.B., Seifert K.A., Yeung K.K., Sumarah M.W. Identification of N,N',N''-triacetylfulvarinine C as a key metabolite for root rot disease virulence in American ginseng. *J Ginseng Res.* 2021, 45(1):156-162.

- Wang, J., Ogata, M., Hirai, H., Kawagishi, H. Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011, 314, 164–169.
- Wang, L., Wu, J., Liu, Z., Shi, Y., Liu, J., Xu, X., Hao, S., Mu, P., Deng, F., Deng, Y. Aflatoxin B1 degradation and detoxification by *Escherichia coli* CG1061 isolated from chicken cecum. *Front. Pharmacol.* 2019, 9, 1548.
- Wang, X., He, S-W., Guo, H-B., Thin, KK., Gao, J-S. *Pseudomonas rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020, 70:944–950.
- Wang, Y.; Wang, X.; Li, Q. Aflatoxin B1 in poultry liver: Toxic mechanism. *Toxicon.* 2023, 233, 107262.
- Wang, Z., Zhong, T., Chen, K. és mtsai. Antifungal activity of valtile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX and potential biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus. *Food Control.* 2021, 120,107499.
- Weller, DM. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of phytopathology.* 1988, Vol. 26:379-407.
- Widodo, W.S., Billerbeck, S. Natural and engineered cyclodipeptides: Biosynthesis, chemical diversity, and engineering strategies for diversification and high-yield bioproduction. *Engineering Microbiology.* 2023, 3,1.
- Wishart D.S. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2008, 27(3), 228-237.
- Wongsuk T., Pumeesat P., Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol.* 2016, 56(5):440–447.
- Xing, F., Wang, L., Liu, X., Selvaraj, J.N., Wang, Y., Zhao, Y., Liu, Y. Aflatoxin B1 inhibition in *Aspergillus flavus* by *Aspergillus niger* through downregulating expression of major biosynthetic genes and AFB1 degradation by atoxigenic *A. flavus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2017, 256, 1–10.
- Xu, S., Liu, YX., Cernava, T. és mtsai. *Fusarium* fruiting body microbiome member *Pantoea agglomerans* inhibits fungal pathogenesis by targeting lipid rafts. *Nature Microbiology.* 2022, 7, pages 831–843.
- Xu, Y., Zhao, R., Liu, C. Degradation of aflatoxin B1 in moldy maize by *Pseudomonas aeruginosa* and safety evaluation of the degradation products. *Foods.* 2023, 12, 1217.
- Yabe, K., Chihaya, N., Hatabayashi, H., Kito, M., Hoshino, S., Zeng, H., Cai, J., Nakajima, H. Production of M-/GM-group aflatoxins catalyzed by the OrdA enzyme in aflatoxin biosynthesis. *Fungal Genet. Biol.* 2012, 49, 744–754.
- Yakubu, A.; Vyas, A. Aflatoxin: Occurrence, Regulation, and Detection in Food and Feed. In *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications*; Springer: Singapore. 2020, pp. 337–353.
- Yang, X., Zhang, Q., Chen, Z.-Y., Liu, H., Li, P. Investigation of *Pseudomonas fluorescens* strain 3JW1 on preventing and reducing aflatoxin contaminations in peanuts. *PLoS ONE.* 2017, 12, e0178810.
- Yang, K., Geng, Q., Song, F., He, X., Hu, T., Wang, S., Tian, J. Transcriptome sequencing revealed an inhibitory mechanism of *Aspergillus flavus* asexual development and aflatoxin metabolism by soy-fermenting non-aflatoxigenic *Aspergillus*. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6994.
- Yao, Y., Shu, X., Wang, D., Kan, W., Su, P., Hu, H., Chen, X., Wang, D., Huang, S., Wu, L. Non-enzymatic transformation of aflatoxin B1 by *Pseudomonas geniculata* m29. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 724103.

- Zaccaria, M., Dawson, W., Russel Kish, D., Reverberi, M., Bonaccorsi di Patti, M.C., Domin, M., Cristiglio, V., Chan, B., Dellaflora, L., Gabel, F. Experimental-theoretical study of laccase as a detoxifier of aflatoxins. *Sci. Rep.* 2023, 13, 860.
- Zentai, A., Jó'zwiak, Á., Süth, M., Farkas, Z. Carry-over of aflatoxin B1 from feed to cow milk-A review. *Toxins*. 2023, 15, 195.
- Zhao, Y., Zhang, C., Folly, Y.M.E., Chang, J., Wang, Y., Zhou, L., Zhang, H., Liu, Y. Morphological and transcriptomic analysis of the inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Toxins*. 2019, 11, 636.
- Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., Liu, Y. Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 2022, 13.
- Zheng H., Kim J., Liew M., Yan J.K., Herrera O., Bok J.W., Kelleher N.L., Keller N.P., Wang Y. Redox metabolites signal polymicrobial biofilm development via the NapA oxidative stress cascade in *Aspergillus*. *Curr Biol*. 2015, 25(1):29–37.
- Zhou B., Xiao J.F., Tuli L., Ressom H.W. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst*. 2012, 8(2):470-81.
- Zhou, L., de Jong, A., Yi, Y., Kuipers, O. P. Identification, isolation, and characterization of medipeptins, antimicrobial peptides from *Pseudomonas mediterranea* EDOX. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 732771.

11. Mellékletek

M1. táblázat A *Pseudomonas* izolátumok.

Egyedi azonosító	SZMC szám	Fajnév	<i>Pseudomonas</i> csoport	HCN termelő
Ps 001	SZMC 28882	<i>P. lurida</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 002	SZMC 28883	<i>P. umsongensis</i>	<i>P. jessenii</i>	-
Ps 004	SZMC 28855	<i>P. paracarnis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 006	SZMC 28884	<i>P. lurida</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 007	SZMC 28885	<i>P. brenneri</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 008	SZMC 28886	<i>P. lurida</i>	<i>P. fluorescens</i>	+
Ps 009	SZMC 28887	<i>P. paracarnis</i>	<i>P. fluorescens</i>	+
Ps 011	SZMC 28888	<i>P. lurida</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 012	SZMC 28889	<i>P. paracarnis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 015	SZMC 28890	<i>P. synxantha</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 017	SZMC 28891	<i>P. marginalis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 019	SZMC 28892	<i>P. lurida</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 020	SZMC 28893	<i>P. veronii</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 021	SZMC 28894	<i>P. paracarnis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 022	SZMC 28895	<i>P. capeferrum</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 024	SZMC 28896	<i>P. canadensis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 026	SZMC 28897	<i>P. canadensis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 027	SZMC 28898	<i>P. paracarnis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 029	SZMC 28899	<i>P. simiae</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 030	SZMC 28900	<i>P. lurida</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 031	SZMC 28901	<i>P. paracarnis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 032	SZMC 28902	<i>P. lurida</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 038	SZMC 28903	<i>P. persica</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 039	SZMC 28904	<i>P. canadensis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 044	SZMC 28905	<i>P. canadensis</i>	<i>P. fluorescens</i>	-
Ps 045	SZMC 28906	<i>P. capeferrum</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 057	SZMC 28907	<i>P. asiatica</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 058	SZMC 28908	<i>P. asiatica</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 059	SZMC 28909	<i>P. allopütida</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 060	SZMC 28910	<i>P. allopütida</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 061	SZMC 28911	<i>P. asiatica</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 066	SZMC 28912	<i>P. chlororaphis</i> subs. <i>aurantiaca</i>	<i>P. chlororaphis</i>	+
Ps 067	SZMC 28913	<i>P. pohangensis</i>	<i>P. pohangensis</i>	-
Ps 068	SZMC 28914	<i>P. chlororaphis</i> subs. <i>aurantiaca</i>	<i>P. chlororaphis</i>	+
Ps 070	SZMC 28915	<i>P. chlororaphis</i> subs. <i>aureofaciens</i>	<i>P. chlororaphis</i>	+
Ps 071	SZMC 28916	<i>P. chlororaphis</i> subs. <i>aureofaciens</i>	<i>P. chlororaphis</i>	+
Ps 072	SZMC 28917	<i>P. mousensis</i>	<i>P. koreensis</i>	+
Ps 073	SZMC 28918	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	-
Ps 074	SZMC 28919	<i>P. lactis</i>	<i>P. fluorescens</i>	+
Ps 075	SZMC 28920	<i>P. chlororaphis</i> subs. <i>chlororaphis</i>	<i>P. chlororaphis</i>	+
Ps 076	SZMC 28921	<i>P. canadensis</i>	<i>P. fluorescens</i>	+
Ps 084	SZMC 28922	<i>P. atacamensis</i>	<i>P. koreensis</i>	-
Ps 089	SZMC 28355	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
Ps 090	SZMC 28356	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
Ps 091	SZMC 28357	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
Ps 096	SZMC 28358	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
Ps 097	SZMC 28360	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
Ps 099	SZMC 28361	<i>P. crudilactis</i>	<i>P. koreensis</i>	+
Ps 100	SZMC 28923	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
Ps 101	SZMC 28359	<i>P. crudilactis</i>	<i>P. koreensis</i>	+
Ps 103	SZMC 28924	<i>P. azerbaijanoccidans</i>	<i>P. jessenii</i>	-

M2. táblázat A *Pseudomonas* sp. nov. Ps_91 törzs összehasonlítása a *Pseudomonas* nemzetség rokon törzseivel. A tulajdonságok jelölése: +, pozitív reakció; –, negatív reakció; ND, nincs adat; VC, különböző tulajdonságok az egyes törzsek/kísérletek során.

Tulajdonságok	<i>P. rhizozeae</i> sp. nov.,	<i>P. mandelii</i> ^{a,l,o,p}	<i>P. migulae</i> ^{b,d,m}	<i>P. lini</i> ^{c,d,l,m,n,o}	<i>P. arsenicoxydans</i> ^{d,l,m,n,o}	<i>P. koreensis</i> ^{e,g,h,i,j}	<i>P. jessenii</i> ^{a,e,f,g,h,i,j}	<i>P. laurylsulfativorans</i> ^f	<i>P. glycinae</i> ^g	<i>P. kribbensis</i> ^{h,g}	<i>P. vancouverensis</i> ^{f,g,h,i,j}	<i>P. atacamensis</i> ^j	<i>P. frederiksbergensis</i> ^{k,l,p,n,o}	<i>P. mucoides</i> ^l	<i>P. prosekii</i> ^m	<i>P. cucumis</i> ⁿ	<i>P. stilesiensis</i> ^{o,n}	<i>P. nunensis</i> ^p
hőmérsékleti tolerancia(°C)	10-45	4-35	4-35	4-36	4-37	4-30	4-35	8-42	4-36	4-30	ND	4-37	4-30	4-37	5-30	4-37	4-35	4-28
hőmérsékleti optimum (°C)	24-30	30	30	ND	30	ND	30	30	28-30	30	30	28	ND	28	ND	28	15-30	20-25
NaCl konc. tolerancia(%)	0-5	ND	0-5	0-4	0-4	1<7	ND	0-6	5-6	1-3	ND	ND	0-4	0-4,5	ND	0-3	0-4	0-4
Optim. NaCl konc. (%)	3-4	ND	ND	ND	0	ND	ND	0-2	ND	1	ND	0-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pH tolerancia	6-10	ND	ND	ND	6,5-10,0	ND	ND	5-10	4-10	5-10	ND	ND	ND	7-9	ND	6-9	6-9	5-9
pH optimum	6	ND	ND	ND	7,5-8,0	ND	ND	7	6-7	7	ND	ND	ND	ND	ND	7	7-8	6-7
fluoreszcens pigmentek	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	ND
leván	+	+	+	VC	ND	-	VC	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
nitrát red.	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
indol term.	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	ND
glükóz fermentáció	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	-	-	ND	-	-	ND	ND	-	-	ND
citokróm-oxidáz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
kataláz	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
hemolízis	β	γ	γ	ND	ND	ND	γ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	γ	ND	ND	ND	ND
arginin hidrolízis	-	VC	+	ND	+	+	VC	-	+	+	-	+	-	-	ND	-	-	+
urea hidrolízis	-	VC	-	ND	+	VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
eszkulin hidrolízis	+	-	-	-	-	ND	VC	-	-	-	ND	-	VC	ND	-	+	ND	+
zselatin hidrolízis	-	-	-	+	-	VC	-	-	+	-	-	-	VC	+	+	+	-	+
asszimiláció																		
Glükóz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+
Arabinóz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannóz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Mannit	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Tulajdonságok	<i>P. rhizozene</i> sp.nov.,	<i>P. mandelii</i> ^{a,l,o,p}	<i>P. migulae</i> ^{b,d,m}	<i>P. lini</i> ^{c,d,l,m,n,o}	<i>P. arsenicoxydans</i> ^{d,l,m,n,o}	<i>P. koreensis</i> ^{e,g,h,i,j}	<i>P. jessenii</i> ^{a,e,f,g,h,i,j}	<i>P. laurylsulfivorans</i> ^f	<i>P. glycinae</i> ^g	<i>P. kribbensis</i> ^{h,g}	<i>P. vancouverensis</i> ^{f,g,h,i,j}	<i>P. atacamensis</i> ⁱ	<i>P. frederiksbergensis</i> ^{k,l,p,n,o}	<i>P. mucoides</i> ^l	<i>P. prosekii</i> ^m	<i>P. cucumis</i> ⁿ	<i>P. silesiensis</i> ^{o,n}	<i>P. nunensis</i> ^p
N-acetil-glükózamin	+	+	+	VC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Maltóz	-	VC	-	-	VC	-	VC	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	+	ND
Glükonát	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+
Kaprát	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	+	+	+	ND	ND	+	+	ND	ND	+	ND
Adipinsav	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	ND	-	-	ND
Almasav	-	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+
Citrát	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Fenil-acetát	-	VC	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	ND	-	-	ND

^a Verhille és msai., 1999; ^b Verhille és mtsai., 1999; ^c Delorme és mtsai., 2002; ^d Campos és mtsai., 2010; ^e Kwon és mtsai., 2003; ^f Furmanczyk és mtsai., 2018; ^g Jia és mtsai., 2020; ^h Chang és mtsai., 2016; ⁱ Cámara és mtsai., 2007; ^j Poblete-Morales és mtsai., 2020; ^k Andersen és mtsai., 2000; ^l Duman és mtsai., 2021; ^m Kosina és mtsai., 2013; ⁿ Liao és mtsai., 2023; ^o Kaminski és mtsai., 2018; ^p Ntana és mtsai., 2023.

M3. táblázat A *Pseudomonas* sp. nov. Ps_91 törzs és a rokon *Pseudomonas* fajok zsírsav összetétele (%).

8 ^b	3 ^a	C _{17:0} ciklo	C _{12:0} 3-OH	C _{12:0} 2-OH	C _{10:0} 3-OH	C _{18:0}	C _{16:0}	C _{14:0}	C _{12:0}	Zsírsavak
n.d.	n.d.	5.5	3.54	3.73	0.65	1	36.38	0.38	2.71	<i>P. rhizozeae</i>
7.1	15.5	31.4	4.3	5.4	3.9	0.3	28	0.6	2.5	<i>P. mandelii</i>
15.3	28.3	7.2	4.2	3.3	3	0.9	28.3	0.7	5.5	<i>P. migulae</i>
21.3	32.4	2	3	2	3.1	1	25.4	0.6	6.3	<i>P. lini</i>
17.1	21.2	12.2	4.6	3.8	3	0.8	27.9	4.6	5	<i>P. arsenicoxydans</i>
13.02	36.72	2.07	3.98	4.98	2.24	0.73	33.33	0.73	1.63	<i>P. korensis</i>
12.47	30.5	1.32	3.85	3.41	3.92	0.72	34.89	0.49	3.61	<i>P. jessenii</i>
11.22	38.81	1.31	4.22	3.17	3.89	n.d.	31.55	n.d.	4.09	<i>P. laurylsulfatorans</i>
13.4	23.6	10.3	6.7	5.5	6.6	0.3	22.9	0.6	2.9	<i>P. glycinae</i>
8.9	16.8	15.1	7.5	6.8	5.4	0.8	33.4	1.2	n.d.	<i>P. kribbensis</i>
9.81	22.10	13.91	3.88	3.37	3.37	0.78	35.70	0.66	3.39	<i>P. vancouverensis</i>
9.53	26.87	n.d.	n.d.	10.27	n.d.	n.d.	24.98	n.d.	n.d.	<i>P. atacamensis</i>
11.6	35.5	1.1	6.5	4.6	5.7	n.d.	30.4	n.d.	2.5	<i>P. frederiksbergensis</i>
6.4	36	1.5	4.5	3.3	4.5	n.d.	36.4	n.d.	4.8	<i>P. mucoides</i>
7.4	19.2	n.d.	12	n.d.	13.6	n.d.	14.9	n.d.	1.4	<i>P. cucumis</i>
n.d.	36.9	1	3.1	1	3.7	n.d.	27.9	n.d.	6.5	<i>P. silasiensis</i>

Összevont csoport 3 and 8*

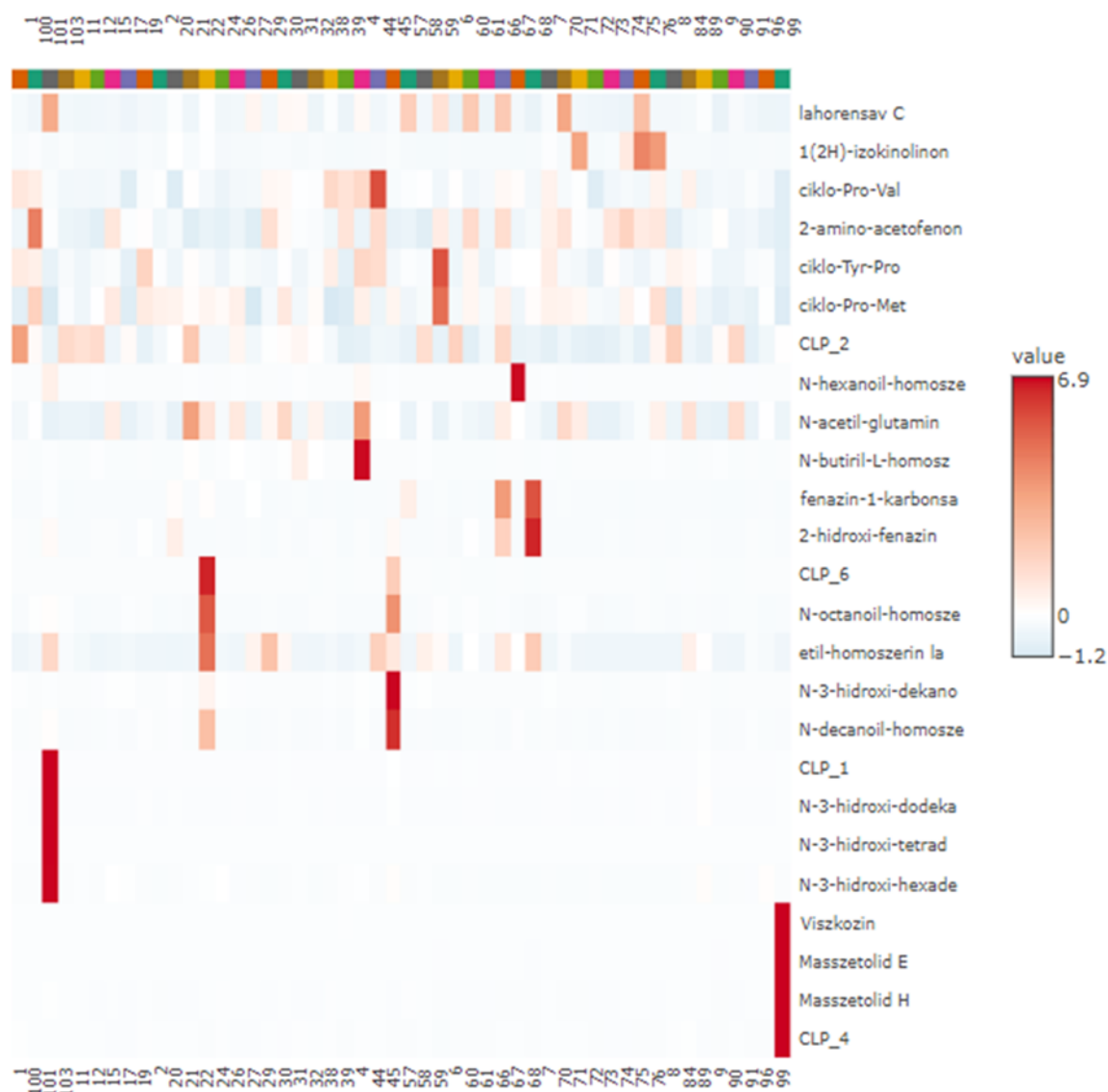
* két vagy három zsírsavból álló összevont csoportok, amelyeket a Sherlock Mikrobiális Azonosító Rendszer nem képes szétválasztani gázkromatográfiás-tömegspektrometriával (GC-MS) : C16:1 ω7c és/vagy C16:1ω6c; b C18:1ω7c és/vagy C18:1ω6c.

n.d., nem detektáltuk.

M4.táblázat A Ps_91 törzsben detektált poláris lipidek és izoprenoid kinonok.

Vegyületek	Név	<i>m/z</i>	Referencia ion	Retenciósidő (perc)	Abundancia*
Foszfatidil-kolin	PC 18:1	522,3541	[M+H] ⁺¹	6,8	6,97
	PC 37:7	790,5410	[M+H] ⁺¹	16,6	8,86
	PC 37:0	804,6466	[M+H] ⁺¹	17,5	8,85
	PC 38:0	818,6623	[M+H] ⁺¹	17,9	8,12
Foszfatidil-etanol-amin	PE 14:0_16:1	660,4618	[M-H] ⁻¹	14,6	8,30
	PE 16:1_16:1	686,4773	[M-H] ⁻¹	14,9	8,31
	PE 14:0_17:1	674,4773	[M-H] ⁻¹	15,2	9,31
	PE 16:1_17:1	700,4929	[M-H] ⁻¹	15,4	8,88
	PE 14:0_16:0	662,4773	[M-H] ⁻¹	15,5	9,76
	PE 16:1_18:1	714,5085	[M-H] ⁻¹	15,7	9,74
	PE 15:0_16:0	676,4930	[M-H] ⁻¹	15,9	8,90
	PE 17:1_18:1	728,5243	[M-H] ⁻¹	16,3	9,84
	PE 16:0_16:0	690,5087	[M-H] ⁻¹	16,4	9,87
	PE 16:0_19:1	730,5401	[M-H] ⁻¹	16,7	8,58
	PE 17:1_19:1	742,5401	[M-H] ⁻¹	16,8	10,11
	PE 18:1_20:1	770,5716	[M-H] ⁻¹	17,3	7,25
Foszfatidil-glicerol	PG16:1_17:1	731,4874	[M-H] ⁻¹	13,7	8,76
	PG 14:0_16:0	693,4716	[M-H] ⁻¹	13,7	9,77
	PG 16:0_16:1	719,4875	[M-H] ⁻¹	13,9	10,01
	PG 15:0_16:0	707,4874	[M-H] ⁻¹	14,3	8,90
	PG 17:1_17:1	745,5031	[M-H] ⁻¹	14,3	9,49
	PG 16:0_17:1	733,5032	[M-H] ⁻¹	14,4	10,5
	PG 17:1_18:1	759,5187	[M-H] ⁻¹	14,6	9,90
	PG 16:0_18:1	747,5190	[M-H] ⁻¹	14,8	10,07
	PG 17:1_19:1	773,5344	[M-H] ⁻¹	15,2	9,81
	PG 16:0_18:0	749,5341	[M-H] ⁻¹	15,6	9,40
Lizofoszfatidil-etanol-amin	LPE 14:0	424,2478	[M-H] ⁻¹	4,3	7,49
	LPE 17:1	464,2787	[M-H] ⁻¹	5,9	8,42
	LPE 16:0	452,2788	[M-H] ⁻¹	6,4	9,67
	LPE 18:1	478,2944	[M-H] ⁻¹	6,8	9,04
	LPE 19:1	492,3104	[M-H] ⁻¹	7,7	7,43
	LPE 19:1	492,3102	[M-H] ⁻¹	8,3	8,67
	LPE 18:0	480,3102	[M-H] ⁻¹	8,8	8,18
Lizofoszfatidil-glicerol	LPG 14:0	455,2424	[M-H] ⁻¹	3,2	7,02
	LPG 16:0	483,2734	[M-H] ⁻¹	4,6	9,27
	LPG 18:1	509,2890	[M-H] ⁻¹	4,9	8,72
	LPG 18:0	511,3044	[M-H] ⁻¹	6,8	8,06
Izoprenoid kinon	Ubikinon 8	744,5896	[M+NH ₄] ⁺¹	19,4	9,62
	Ubikinon 4	455,3153	[M+H] ⁺¹	20,8	8,55
	Ubikinon 9	812,6540	[M+NH ₄] ⁺¹	20,8	10,54
	Ubikinon 2	319,1916	[M+H] ⁺¹	20,8	8,16

*Log-transzformált abundancia

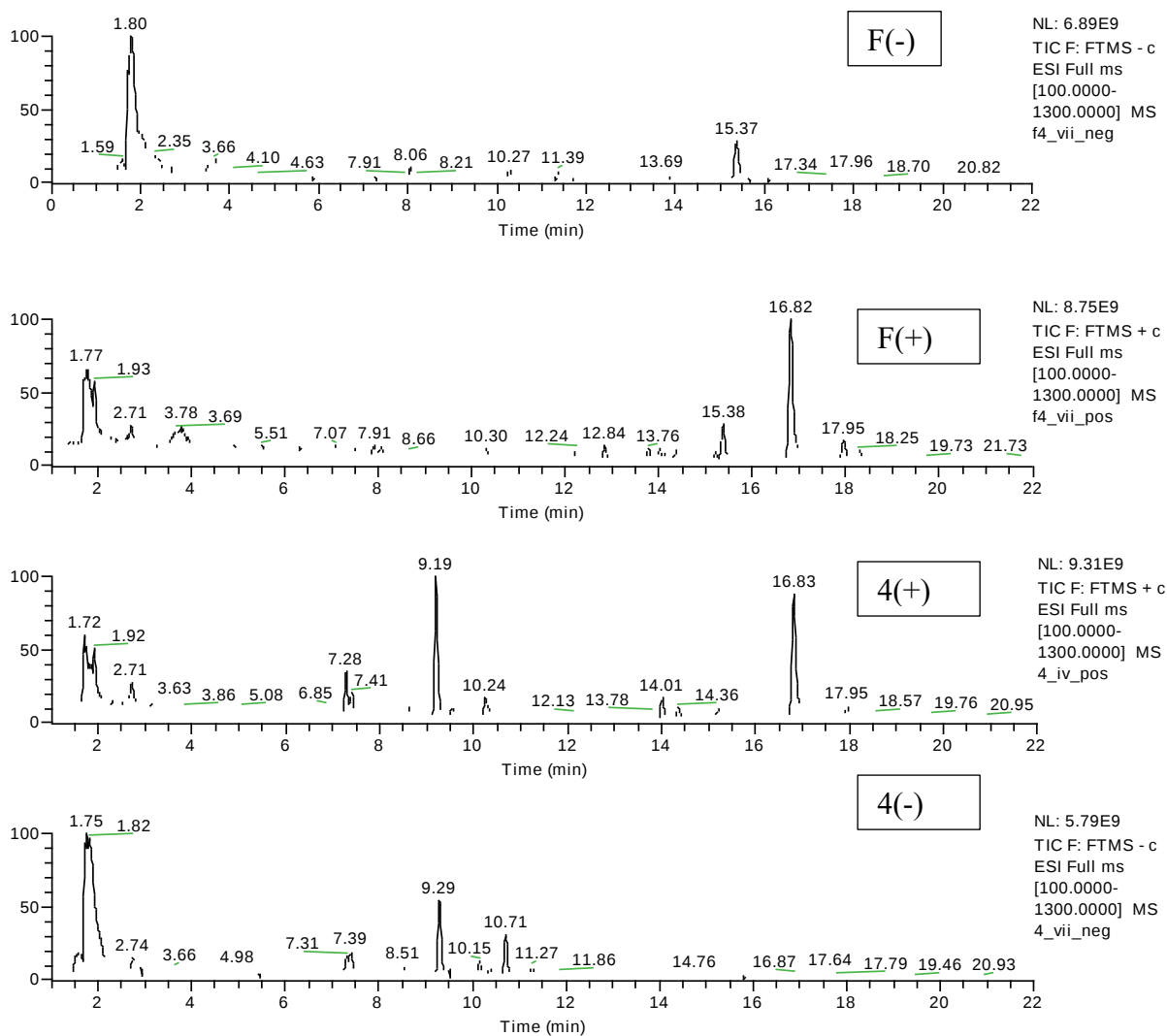


M5. ábra A PDB tápoldatban detektált metabolitok hőterképe.

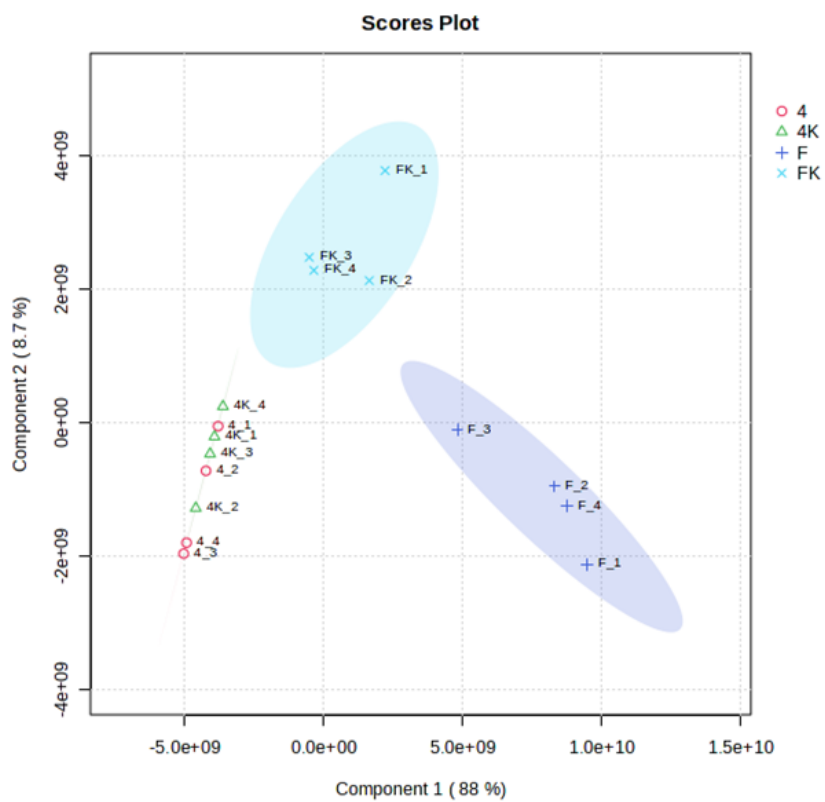
M6. táblázat Az *A. flavus* konfrontációs kísérletek során detektált AFB1-hez kapcsolható prekursor vagy származék vegyületek.

Összegképlet	Metabolit	RT (min)	Molekulaion		Fragmensek (m/z)
				m/z	
C ₁₆ H ₁₀ O ₆	AFP1	14.0	[M+H] +	299.0562	281.0451(53); 271.0604(32); 257.0446(82); 253.0495(21); 243.0653(13); 231.0290(100); 229.0498(58); 225.0544(12); 203.0342(22)
C ₁₆ H ₁₄ O ₅	AFD1	11.6	[M+H] +	287.0919	259.0619(16); 255.0651(100); 227.0704(19); 199.0759(12); 185.0593(11); 157.0657(19)
C ₁₈ H ₁₆ O ₇	Me-AFB2a	12.3	[M+H] +	345.0980	313.0718(100); 298.0489(2.6); 285.0763(58.2); 284.0684(13.7); 257.0807(9.2); 243.0654(2.8); 229.0855(2.3)
C ₁₈ H ₁₆ O ₇	Me-AFB2a	12.5	[M+H] +	345.0980	313.0712(100); 312.0630(2.6); 298.0484(2.9). 285.0762(61.3); 284.0685(14.5); 283.0610(2.7); 269.0442(2.0); 257.0807(9.9); 243.0652(2.6); 229.0856(2.7)
C ₁₉ H ₁₄ O ₇	OH-OMeSTC	12.2	[M+H] +	355.0828	340.0597(3); 327.0884(32); 299.0927(100); 285.0765(35); 266.0575(6); 255.0650(4)
C ₁₉ H ₁₄ O ₇	ASP	12.5	[M+H] +	355.0828	340.0596(75); 327.0885(8); 322.0491(100); 311.0564(16); 294.0532(7); 293.0453(4)
C ₁₉ H ₁₄ O ₈	OH-ASP	11.9	[M+H] +	371.0776	343.0833(44); 338.0440(16); 315.0876(100); 301.0719(38); 300.0636(22); 282.05316(20)
C ₁₉ H ₁₆ O ₈	DH-OH-ASP	10.7	[M+H] +	373.0933	337.0727(100); 327.0886(25); 313.0718(12); 309.0767(28); 297.0777(26); 295.0609(21); 285.0775(20); 281.0808(18); 271.0604(43); 267.0656(16); 255.0652(54)

A táblázatban szereplő rövidítések a következők: **AFP1**, **AFD1**, aflatoxin P1, D1;
Me-AFB2a RT=12,5, és **Me-AFB2aRT=12,3**, metoxi-aflatoxin B2a 2 izomere;
OH-OMeSTC, 11-hidroxi-O- metilsterigmatocisztin; **OH-ASP**, 11-
hidroxiaspertoxin; **DH-OH-ASP**, dihidroxiaspertoxin.



M7. ábra A gomba teljes ion kromatogramja negatív F(-) és pozitív F(+) ionizációs módban és a baktérium önálló tenyészetének teljes ion kromatogramja negatív 4(-) és pozitív 4(+) ionizációs módban.



M8. ábra Az *A. flavus* és a *P. paracarnis* lipidösszetétel alapján készült PLSDA. **4**= baktérium önálló tenyészet; **4_K**= konfrontációban részt vett baktérium; **F**= *A. flavus* önálló tenyészet; **F_K**= konfrontációban részt vett *A. flavus*.