

37. OTDK Biológia Szekció

Baktérium-gomba kölcsönhatás metabolomikai hátterének vizsgálata

Készítette:

Schwartz Balázs

Kémia BSc szakos hallgató

BSc III. évfolyam

Témavezető:

Dr. Varga Mónika

tudományos munkatárs

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Szeged
2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. <i>A kölcsönhatások jellemzése</i>	<i>5</i>
2.1.1 Fizikai kölcsönhatások	5
2.1.2 Kémiai kölcsönhatások	6
2.2 <i>Metabolomika</i>	<i>9</i>
3. Célkitűzések	11
4. Anyagok és módszerek	12
4.1 <i>Minták</i>	<i>12</i>
4.2 <i>Felhasznált anyagok.....</i>	<i>13</i>
4.3 <i>Mintaelőkészítés</i>	<i>14</i>
4.4 <i>Metabolomikai vizsgálatok.....</i>	<i>14</i>
4.5 <i>Alkalmazott programok.....</i>	<i>15</i>
5. Eredmények	17
5.1 <i>HPLC-HRMS analízis és a metabolitok szűrése</i>	<i>17</i>
5.2 <i>A kísérletek összehasonlító elemzése.....</i>	<i>20</i>
5.3 <i>A kísérletek önálló elemzése.....</i>	<i>23</i>
5.3.1 <i>A gomba és a baktérium másodlagos metabolitkészlete</i>	<i>23</i>
5.3.2 <i>A konfrontáció metabolitkészlete</i>	<i>25</i>
5.3.3. <i>A sejtmentes felülúszókban tenyésztett mikrobák metabolitkészlete</i>	<i>29</i>
6. Összefoglalás	33
7. Köszönetnyilvánítás.....	35
8. Tételes szerzői hozzájárulás.....	36
9. Felhasznált irodalom	37

Rövidítések jegyzéke

4	<i>P. paracarnis</i> önálló tenyésztete;
4CF	<i>A. flavus</i> tenyésztete a baktérium sejtmentes közegében
4D	<i>A. flavus</i> tenyésztete az inaktivált baktérium sejtek jelenlétében
AFB1	Aflatoxin B1
CD	Compound Discoverer
ESI	Electrospray ionization
F	<i>A. flavus</i> önálló tenyésztete
FCF	<i>P. paracarnis</i> tenyésztete a gomba sejtmentes közegében;
FD	<i>P. paracarnis</i> tenyésztete az inaktivált gomba micélium jelenlétében
HPLC-ESI-HRMS	High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-High Resolution Mass Spectrometry
HPLC-HRMS	High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry
K	<i>A. flavus</i> és <i>P. paracarnis</i> közös tenyésztete
LB	Luria-Bertani broth
NMR	Nuclear magnetic resonance
MS	Mass Spectrometry
MS1	“full scan” spektrum, a molekulaionok detektálása
MS2	MS-MS spektrum, fragmensek detektálása
OD	optikai denzitás
PDB	Potato dextrose broth
PE	foszfatidil-etanolamin
PVDF	Polivinilidén-fluorid
QS	Quorum sensing
SZMC	Szeged Microbiology Collection
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography

1. Bevezetés

A mikroorganizmusok (beleértve a baktériumokat, gombákat, vírusokat) a bioszféra létfontosságú részét képezik, megtalálhatók a talajban, a vízben, a levegőben, sőt még a magasabb eukarióták szervezetében is.

A természetben a mikroorganizmusok összetett közösséget alkotnak, melynek tagjai komplex hálózatokat alkotva kölcsönhatást létesítenek nemcsak az azonos fajhoz tartozó egyedekkel hanem más mikrobiális fajok tagjaival is. Ezek a kölcsönhatások az antagonizmustól a mutualizmusig terjedhetnek, amelyek különböző mértékben befolyásolják az érintett partnerek növekedését, szaporodását, szállítását/mozgását, táplálkozását, stresszel szembeni ellenállását és patogenitását (Deveau és munkatársai, 2018). A penicillin felfedezése az egyik első dokumentált megfigyelés a baktériumok és gombák közötti, kis molekulák által közvetített kölcsönhatásról.

Az emberi szervezetben előforduló baktériumok és gombák közötti kölcsönhatások összefüggésbe hozhatók a betegségek kialakulásával, esetleg súlyosságával (Lapiere és munkatársai, 2022). Amennyiben növényi szervezetben fordulnak elő, befolyásolják a gazdaszervezet tápanyag-, ásványi anyag- és vitaminellátását, valamint a biotikus és abiotikus stressz elleni védekezését (Vandenkoornhuysen és munkatársai, 2015). A mezőgazdasági vonatkozású gomba-baktérium kölcsönhatásokra irányuló kutatások elsősorban a növénybetegségek biológiai védekezéséhez ideális biokontroll törzsek azonosítására, valamint a szintetikus közösségek megfelelő tagjainak kiválasztására, és a különböző mikroorganizmusok közötti kölcsönhatások mechanizmusának vizsgálatára összpontosítanak.

A kutatások szerint részben kis jelzőmolekuláknak köszönhetően a baktériumok és a gombák kölcsönösen felismerik egymást és reagálnak a partner organizmus jelenlétére (Chen és munkatársai, 2018). Ezen folyamatok tanulmányozásához a transzkriptomika és a metabolomika hatékony eszköznek bizonyul.

2. Irodalmi áttekintés

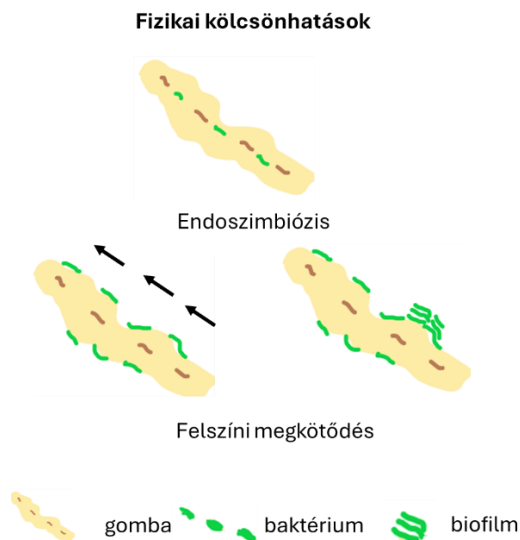
2.1. A kölcsönhatások jellemzése

A baktériumok és gombák közötti kölcsönhatások több szempontból is csoportosíthatók. A résztvevő partnerek közötti kapcsolat létrehozása alapján megkülönböztethetünk fizikai és kémiai kölcsönhatásokat. Mivel a legegyszerűbbnek tekinthető fizikai kölcsönhatások során a baktérium a gomba belsejében, illetve felszínén helyezkedhet el, ezek a kölcsönhatások elsősorban a gomba morfológiájától, a felszínén található molekuláktól, illetve a reakciópartnerek szekréciós faktoraitól függenek. A kémiai kölcsönhatások elsősorban másodlagos metabolitokon keresztül befolyásolják a partnereket és jóval szélesebb skálán jöhetnek létre.

2.1.1 Fizikai kölcsönhatások

2.1.1.1 Endoszimbiózis

Amikor a gomba és a baktérium közvetlen kapcsolatba kerül, bizonyos esetekben a baktériumok behatolhatnak a gomba belsejébe, endoszimbiózis történik (1. ábra). A táplálkozás módjától függetlenül mind bazídiumos, mind tömlős gombák esetén fellelhető endoszimbiózis.



1. ábra A fizikai kölcsönhatások típusai a gomba és baktérium között (Zhou és munkatársai, 2022 alapján).

Az ezidáig felfedezett endobaktériumok többsége elvesztette önálló életre való képességét, kiterjedt genomikai redukción ment keresztül és életciklusukat a gombák citoplazmáját használva fejezték be (Deveau és munkatársai, 2018).

2.1.1.2 A baktérium felszíni kötődése

A baktérium megkötődhet a gomba felszínén, amely folyamat a felület hidrofilitásától függ (1. ábra). Abban az esetben, ha nem biztosítottak a fizikai kémiai feltételek a biofilm képződéshez (pl.: a hifa felületének sav-bázis karaktere) akkor a kölcsönhatás csak rövid ideig, vagy egyáltalán nem jön létre (Ciolacu és munkatársai, 2022).

Egyes baktériumok a gomba hifákat, mint “gomba autópályákat” használják fel az elterjedéshez (Kohlmeier és munkatársai, 2005).

2.1.2 Kémiai kölcsönhatások

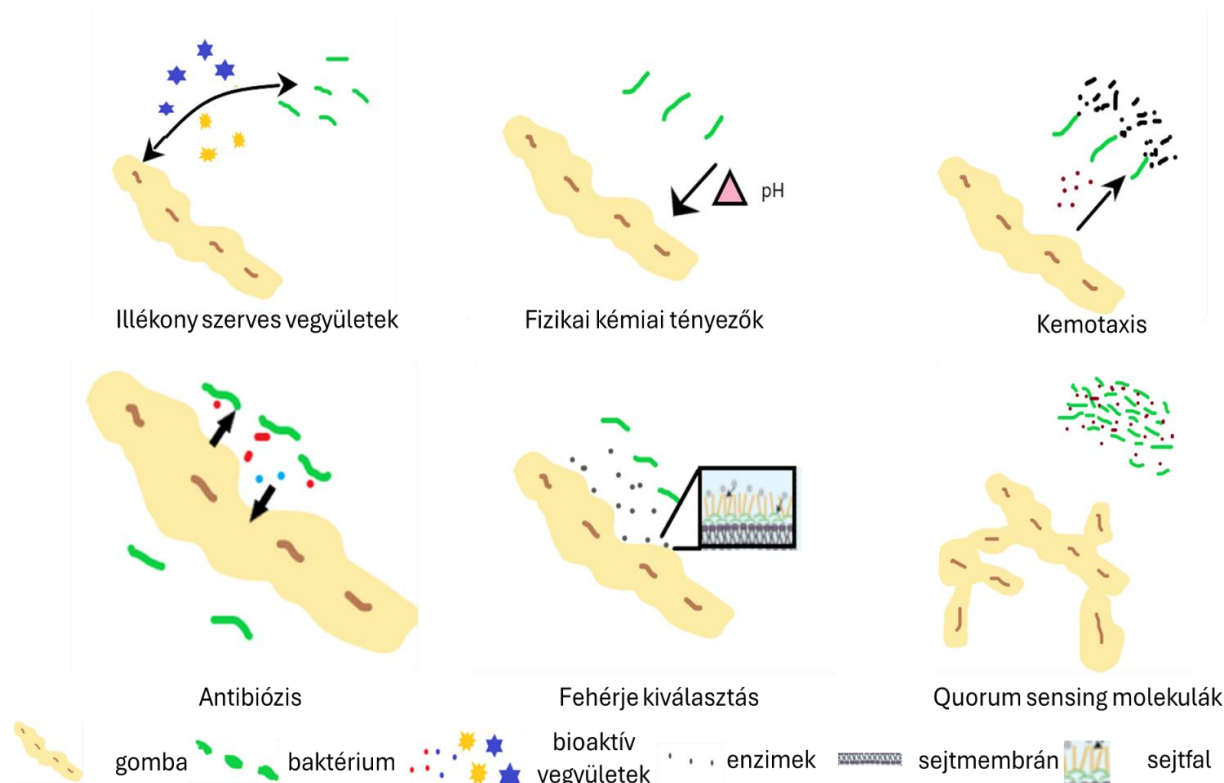
2.1.2.1 Antibiózis

Az antibiotikumok olyan másodlagos metabolitok, melyek főleg tápanyagszegény környezetben hatékonyak és igen változatos következményekkel járhatnak az elszennvedő fél számára. Ez megnyilvánulhat a sejtfalszintézis gátlásában (penicillin) (Ghooi és Thatte, 1995), vagy akár genetikai módosítás révén is (fenazin-1-karboxamid) (Chen és munkatársai, 2018) (2. ábra). A különböző antibiotikumok gyakran kettős hatással bírhatnak, mint pl. a *Pseudomonas* fajok által termelt fenazinok koncentrációtól függően gátolhatják, vagy elősegíthetik az *Aspergillus fumigatus* sporulálását (Zheng és munkatársai, 2015). Az antibiotikumok révén a kölcsönhatásban lévő mikroorganizmusok között oda-vissza reakciók is kialakulhatnak, pl. a növénypatogén *Ralstonia solanacearum* által termelt rasolamicin indukálja a növénypatogén *Fusarium fujikuroi* bikaverin termelését, ami antibakteriális hatású az indukáló baktériummal szemben (Spraker és munkatársai, 2018).

2.1.2.2 Illékony szerves vegyületek

A baktériumok és a gombák is képesek nagy számú, kis molekulatömegű illékony szerves vegyületeket termelni, melyek könnyen diffundálnak a vízzel és gázzal teli pórusokon vagy szöveteken keresztül, tehát nagy távolságokban is képesek hatást kifejteni (2. ábra). A molekulák funkciós csoport tekintetében gyakori egyezéseket mutatnak egymással mind a baktérium, mind a gomba esetében. Mindketten képesek alkéneket, alkoholokat, ketonokat és

észtereket termelni, de a baktériumok termelhetnek még terpéneket, benzenoidokat, valamint pirazinféléket és szerves savakat is (Piechulla és munkatársai, 2014).



2. ábra A kémiai kölcsönhatások típusai gomba és baktérium között (Zhou és munkatársai, 2022 alapján).

A vegyületek hatása legalább annyira változatos, mint ahányféle vegyületcsalád jelenik meg a metabolitok között. A baktérium által termelt illékony szerves vegyületek képesek gátolni a gombaspórák csírázását és a micélium növekedését (metil-vinil-ke-ton) (Herrington és munkatársai, 1987), enzimaktivitásukat, morfológiájukat (Chaurasia és munkatársai, 2005) és toxintermelésüket is (dimetil-diszulfid és metil-izovalerát) (Gong és munkatársai, 2019). A gombák olyan illékony szerves vegyületeket termelnek, melyek korlátozzák a baktériumok mozgását, illetve gátolják a biokontrollért felelős gének kifejeződését (Lutz és munkatársai, 2004; Schmidt és munkatársai, 2017). Az antibiotikumokhoz hasonlóan olyan illékony szerves vegyületek is termelődnek, melyek oda-vissza kölcsönhatást eredményeznek. A növénypatogén *R. solanacearum* által termelt illékony szerves vegyületek hatására az *A. flavus* konídium termelése visszaszorult, bár az aflatoxin termelődés növekedett. A gomba illékony szerves vegyületei viszont gátolták a *R. solanacearum* növekedését és melanin termelését, viszont indukálták poliszacharid termelését (Spraker és munkatársai, 2014).

2.1.2.3 Quorum sensing molekulák

Maga a jelenség az egy fajhoz tartozó sejtek közötti kommunikációt foglalja magában, melynek során a mikroorganizmusok kémiai jelek segítségével alakítanak ki egy kollektív viselkedést, hogy saját populációjukat szabályozzák a túlélés érdekében, vagy hogy összehangolt választ tudjanak adni más szervezetekkel szemben (Mukherjee és Bassler, 2019) (2. ábra). A mikrobák a QS molekulák felhalmozódásával érzékelik saját populációjuk sűrűségét. A QS felfedezésekor a jelenséget csak a baktériumokkal hozták összefüggésbe, azonban később egyértelművé vált, hogy gombaközösségekben is fontos szerepet játszik. A kutatások szerint a vegyületek a gombák morfogenezisében, a csírázásában, az apoptózisban, a patogenitásban és a biofilm kialakulásában vesznek részt (Wongsuk és munkatársai, 2016). Mivel a baktériumok és gombák együtt élnek, feltételezhető volt, hogy a QS jelek is részt vehetnek a közöttük fellépő kölcsönhatásokban. Bebizonyosodott, hogy a gombák képesek értelmezni a bakteriális QS jeleket, sőt le is bonthatják ezeket a molekulákat. A *Phialocephala fortinii* laktonázt termel a rizoszférában körülötte elhelyezkedő baktériumok kommunikációját biztosító N-acil-homoszerin laktonok lebontására (Uroz és Heinonsalo, 2008). A baktériumokra is hatással lehetnek a gomba QS-molekulák. Kutatások szerint a *Candida* fajok által termelt tirozol gátolja a *Pseudomonas aeruginosa* virulencia faktorok termelődését (Abdel-Rhman és munkatársai, 2015).

2.1.2.4 Kemotaxis

A baktérium-gomba kölcsönhatásokban a kemotaxis is szerepet játszhat. A baktériumok képesek valamilyen kémiai vegyület koncentráció gradienséhez közelíteni vagy távolodni. A *Pseudomonas* fajok hajlamosak a gomba hifák exudátumai felé vándorolni (Grewal és Rainey, 1991) (2. ábra). A *Fusarium oxysporum* például fuzária savat bocsát ki, ami vonzza a *Pseudomonas fluorescens* WCS365 izolátumot (de Weert és munkatársai, 2004). A talajban élő gombák oxálsavat választhatnak ki, ami szintén fontos szerepet tölt be a környezetben elhelyezkedő baktériumok toborzására (Rudnick és munkatársai, 2015).

2.1.2.5 Fehérje kiválasztás

Egyes baktériumok sejtfal bontó enzimek (kitinázok, β -1,3-glükonázok, proteázok és cellulázok) kiválasztására képesek, melyek másodlagos metabolitokkal társulva alkalmasak a gombák elpusztítására (2. ábra). Erre vezethető vissza a *Bacillus*, a *Serratia* és a *Trichoderma*

fajokhoz tartozó kitinázokat termelő mikroorganizmusok hatékony felhasználása biokontroll célból (Liu és munkatársai, 2007).

2.1.2.6 Fizikai kémiai tényezők

A baktériumok és gombák közötti kölcsönhatásokat befolyásolhatják a környezet fizikai-kémiai paraméterei (2. ábra). Az egyik leggyakoribb tényező a közeg kémhatása: a baktériumok eredendően a lúgos, míg a gombák a savas pH-t kedvelik (Fierer és Jackson, 2006).

2.2 Metabolomika

A metabolomika a négy „omika” (genomika, transzkriptomika, proteomika és metabolomika) közül a kismolekulákkal (1800 Da alatt) foglalkozik: az elsődleges és másodlagos anyagcseretermékek vizsgálatán keresztül jellemzi a biológiai rendszereket (Fiehn, 2002).

A metabolomikai vizsgálatok lehetnek célzottak és nem célzottak. A célzott metabolomika adott vegyület/ek, vagy vegyületcsaládok mennyiségi analízisét foglalja magába (pl. egy biokémiai útvonal résztvevői). Célzott metabolomika esetén tehát valamilyen feltételezés vagy sejtés alapján történik a vizsgálandó metabolitok kiválasztása. Ezzel szemben a nem célzott metabolomika egy ismeretlen, vagy részben ismeretlen metabolitkészletet kíván feltérképezni, melynek mennyiségi meghatározása a nagy számú metabolit miatt gyakorlatilag lehetetlen. A nem célzott metabolomikai vizsgálatok ezért elsősorban minőségi információt szolgáltatnak és csak relatív mennyiségi meghatározást tesznek lehetővé.

A metabolomikában használt két fő analitikai eljárás a nukleáris mágneses rezonancia (NMR) és a tömegspektrometria (MS). Ez utóbbit valamilyen elválasztástechnikai eljárással, általában gázkromatográfiával, vagy folyadékkromatográfiával kombinálva alkalmazzák. A gyakorlatban a nem célzott metabolomikai vizsgálatok komoly analitikai kihívást jelentenek, mivel a metabolitok egyrészt rendkívül széles skálán mozgó fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, másrészt változó koncentrációban fordulnak elő. Meghatározásuk ezért általában nem egyetlen analitikai platformmal történik. A nem célzott metabolomikai vizsgálatokhoz a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria terjedt el széles körben.

A metabolomikai vizsgálatok fő lépései a következők: a kísérlet tervezése, mintavétel, mintaelőkészítés (metabolitok extrakciója), minták analízise, adatok elemzése és értelmezése. A folyamat során az adatok elemzése a legidőigényesebb, a legnagyobb kihívást pedig kétségtelenül

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

3. Célkitűzések

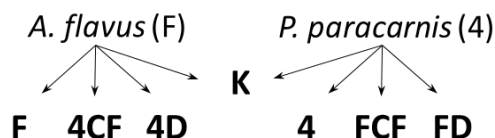
A gombák és baktériumok közötti kölcsönhatásokra számtalan példát találunk a természetben, melyek mikrobiális ökológiai jelenségek mozgatórugói és többek között hozzájárulnak a magasabb rendű növények és állatok normál fejlődéséhez is. Az interakciók során változó információtartalmú, kémiai alapú kommunikációs folyamat alakul ki, mely metabolomikai eszközökkel vizsgálható.

Célunk a mezőgazdaságban jelentős károkat okozó *Aspergillus flavus* törzs és a kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint (Papp és munkatársai, 2024) vele szemben antagonista hatást mutató *Pseudomonas paracarnis* (Ps-4) izolátum között létrejövő kölcsönhatás metabolomikai hátterének feltárása HPLC-ESI-HRMS módszerrel.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Minták

Az *Aspergillus flavus* törzs (SZMC 21417) és a *Pseudomonas paracarnis* izolátum (Ps-4) közötti kölcsönhatást folyadékfázisban vizsgáltuk. A konfrontációs kísérlet mellett a két mikroorganizmus önálló tenyésztését (F, 4), a partner sejtmentes felülúszójában (4CF, FCF), valamint a partner inaktivált micélium/sejt maradékainak jelenlétében (4D, FD) történő tenyésztését tanulmányoztuk, amit a 3. ábra foglal össze.



3. ábra A metabolomikai vizsgálatok alapjául szolgáló minták. F= *A. flavus* önálló tenyésztete; 4CF= *A. flavus* tenyésztete a baktérium sejtmentes közegében; 4D= *A. flavus* tenyésztete az inaktivált baktérium sejtek jelenlétében; K= konfrontáció; 4= baktérium önálló tenyésztete; FCF= baktérium tenyésztete a gomba sejtmentes közegében; FD= baktérium tenyésztete az inaktivált gomba micélium jelenlétében.

A tenyésztések kivitelezését Papp Dóra Anna végezte.

A gombát három napon keresztül tenyésztettük (28 °C, PDA) majd a konídiospórákat 0,01%-os Tween-80 oldattal mostuk. A konídiospóra szuszpenziót további felhasználásig 5 °C hőmérsékleten tároltuk. A baktériumot egy éjszakán át tenyésztettük Luria-Bertani (LB) tápoldatban, 130 rpm fordulatszámon és 28 °C hőmérsékleten, majd spektrofotométerrel (BMG Labtech) mértük az optikai denzitást és $OD_{600nm}=0,8$ értékre állítottuk be.

A gomba önálló tenyésztete a következőképpen készült. Az előzetesen előállított, 5 °C hőmérsékleten tárolt gomba konídiospóra szuszpenziót 100 ml PDB tápoldatba oltottuk úgy, hogy a koncentráció 10^5 spóra/100 ml legyen. Három napig inkubáltuk 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon.

A baktérium önálló tenyésztete a következőképpen készült. A beállított optikai denzitású baktériumból 60 μ l-t oltottunk 100 ml PDB tápoldatba, majd három napig inkubáltuk 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon.

A folyadékfázisú konfrontációs kísérleteket úgy állítottuk össze, hogy a 100 ml PDB tápoldatban az *A. flavus* konídiospóra koncentrációja 10^5 spóra/ 100 ml legyen és 60 μ l $OD_{600nm}=0,8$ optikai

denzitású *Pseudomonas* törzzsel oltottuk le. A tenyésztések három napig inkubáltak 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon. A konfrontációs mintákat az inkubációs idő leteltét követően steril gézen szűrtük, majd az így nyert micéliumot fagyasztva szárítottuk és szárazanyag-tartalmat számoltunk. A fermentlevet centrifugálással (7500 g, 10 perc, 25 °C) sejtméntesítettük és a mintaelőkészítésig -80°C hőmérsékleten tároltuk.

Az inaktivált gomba micéliumokat és a gomba sejtméntes felülúszóját tartalmazó tenyészetek összeállítása a következőképpen történt. Az önálló tenyésztésből származó gombamicéliumot steril gézen szűrtük, majd háromszori steril desztillált vizes mosást követően a gomba inaktiválásának érdekében 100 °C hőmérsékleten, 1 órán át forraltuk. Hűtést követően az inaktivált micéliumokat friss PDB tápoldatba (100 ml) helyeztük és a beállított optikai denzitású baktériummal oltottuk le. A gomba fermentlevét centrifugáltuk (10000 g, 25 °C, 20 perc), majd 0,45 µm pórusátmérőjű PVDF membránon szűrtük. A sejtméntes fermentlevet ezt követően 5 ml 10x töménységű PDB tápoldattal egészítettük ki, majd a beállított optikai denzitású baktériummal oltottuk le.

Az inaktivált baktérium sejteket és a baktérium sejtméntes felülúszóját tartalmazó tenyészetek összeállítása a következőképpen történt. Az önálló tenyésztésből származó baktériumtenyészetet centrifugáltuk (10000 g, 25 °C, 20 perc), majd a baktériumpelletet háromszori desztillált vizes mosást követően, hővel inaktiváltuk (100 °C, 1 óra). A szobahőmérsékletű inaktivált pelletet friss PDB tápoldatba (100 ml) helyeztük és a beállított gomba-spóraszuszpenzióval oltottuk le. A baktérium sejtméntes felülúszóját 0,22 µm pórusátmérőjű PVDF membránon szűrtük és 5 ml 10x töménységű PDB tápoldattal egészítettük ki, majd a beállított gomba-spóraszuszpenzióval oltottuk le.

Mind a sejtméntes, mind az inaktivált partner jelenlétében történő baktérium- és gomba tenyészeteket további három napon keresztül inkubáltak 28 °C hőmérsékleten és 130 rpm fordulatszámon. 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 mintaelőkészítésig -80°C hőmérsékleten tároltuk.

4.2 Felhasznált anyagok

A minták extrakciójához és a HPLC-HRMS mérésekhez LC-MS minőségű vizet, metanolt, acetonitrilt, hangyasavat és ammónium-formiátot használtunk, melyek VWR Kft. termékek

voltak. Belső standardként buszpiront és homovaníliásavat alkalmaztunk, melyek a Merck Kft.-től kerültek beszerzésre. A PD tápközegek előállításához burgonya-dextrózt az VWR Kft.-től, a PDA táptalajhoz az agart a Biolab Zrt.-től vásároltuk. Az LB tápoldatösszetevők a Molar Chemicals Kft.-től kerültek beszerzésre.

4.3 Mintaelőkészítés

Valamennyi minta fermentlevének 2 ml térfogatát liofilizáltunk. A metabolitok extrakciójához a fagyasztva szárított mintákhoz 500 µl, 0,5 µg/ml koncentrációjú buszpiront és homovaníliásavat, mint belső standardot tartalmazó metanol/víz elegyet (8/2, V/V) adtunk. Az extrakciót ultrahang 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 (10 000 g, 20 perc, 20 °C), majd a felülúszókat HPLC-fiolába pipettáztuk és a HPLC-HRMS vizsgálatig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

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

4.4 Metabolomikai vizsgálatok

Az HPLC-HRMS mérésekhez Dionex UltiMate 3000 UHPLC készülékhez kapcsolt ESI-ionforrással ellátott Thermo QExactive Plus tömegspektrométert használtunk.

A kromatográfiás elválasztást Phenomenex Gemini NX-C18 110 Å, 150 x 2 mm, 3 µm oszlopon valósítottuk meg. Az előtétoszlop Gemini-NX-C18, 4 x 2 mm volt.

A gradiens alapú elválasztáshoz az “A” oldószer víz:acetonitril:metanol 95:2,5:2,5 (V/V) elegy volt, amely 5 mM ammónium-formiátot és 0,1% hangyasavat tartalmazott, a “B” oldószer víz:acetonitril:metanol 5:47,5:47,5 (V/V) elegy volt, ami 5 mM ammónium-formiátot és 0,1% hangyasavat tartalmazott. Az alkalmazott gradiens az 1. táblázatban látható.

1. táblázat Az alkalmazott gradiens

Idő (perc)	B (%)
0	5
2	5
13	95
19	95
19,5	5
24	5

Minden mintából 3 µl térfogatot injektáltunk. Az elválasztást 25 °C hőmérsékleten valósítottuk meg.

A metabolitokat pásztázó-adatfüggő msms módban (fullscan-ddms2) vizsgáltuk pozitív és negatív ionizációs módban. A pásztázó adatgyűjtéshez a 200-2000 m/z tömegtartományt alkalmaztuk 70 000 felbontás, 1×10^6 AGC (Automatic Gain Control), és 100 ms IT (isolation time) mellett. Az adatfüggő msms mérések esetén a felbontást 17 500 értéknek választottuk, a kvadrupól izolációs ablaka 0,4 m/z , a normalizált ütközési energia 35 a készülékre jellemző tetszőleges egység volt.

4.5 Alkalmazott programok

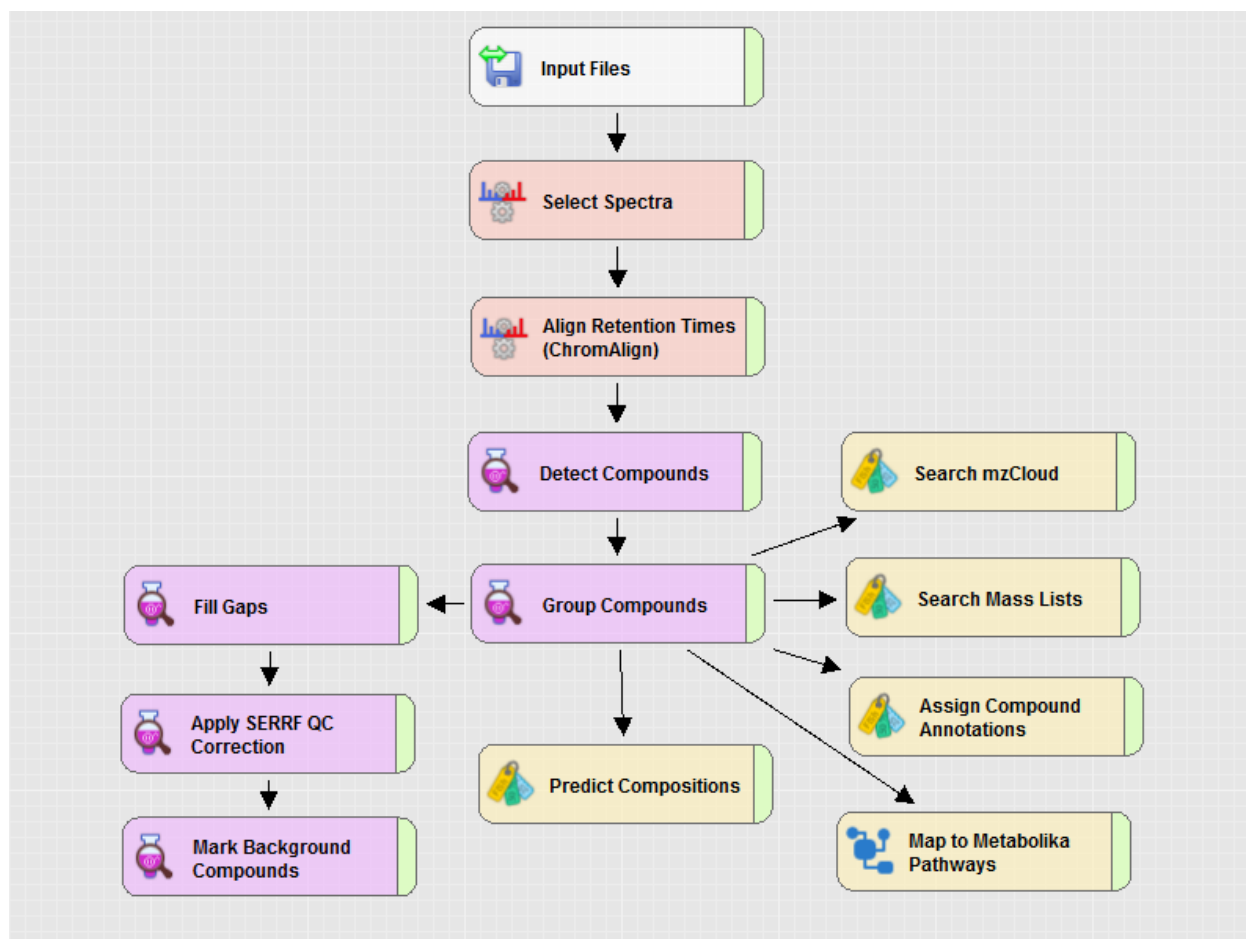
Az HPLC-HRMS adatok gyűjtéséhez Thermo Xcalibur 3.1 szoftvert használtunk.

A nyers mérési eredményeket a CompoundDiscoverer 3.3 (CD) program segítségével dolgoztuk fel az 4. ábrán látható munkamenet szerint. 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.



4. ábra A nyers mérési adatok feldolgozásának munkamenete a CD program szerint.

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 a CD program segítségével szűrt metabolitkészletből. A hő térképet (Heatmap) a program alapbeállításával hoztuk létre.

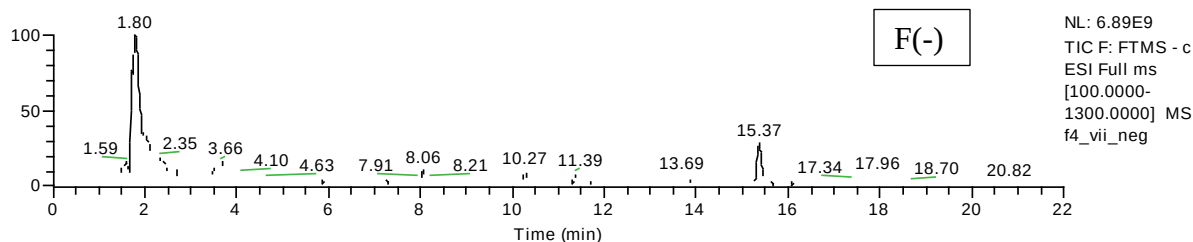
5. Eredmények

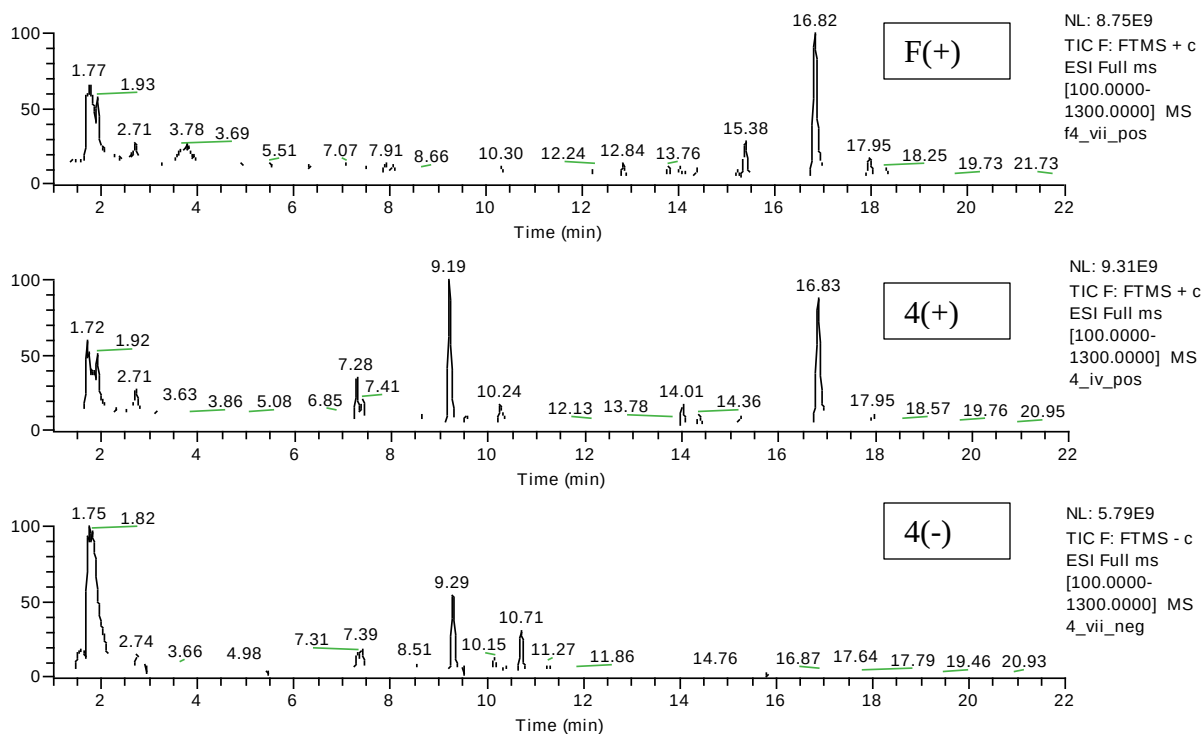
Munkánk során célunk az volt, hogy megvizsgáljuk egy baktérium-gomba kölcsönhatás metabolomikai hátterét. A részvevő mikroorganizmusokat kutatócsoportunk korábbi eredményeire támaszkodva választottuk ki: egy *Aspergillus flavus* törzs (SZMC 21417) és egy *Pseudomonas paracarnis* (Ps-4) izolátum közötti antagonista kölcsönhatást vizsgáltunk folyadék tenyészetben. A kísérletsorozat összeállításakor figyelembe vettük azt az irodalmi áttekintésben már említett megállapítást, miszerint a mikroorganizmusok érzékelik egymás jelenlétét, ami vonatkozhat a partner organizmus metabolikészletére, illetve fizikai jelenlétére is. Ennek megfelelően nem csak a két mikroba önálló és konfrontációs tenyészetét vizsgáltuk, hanem az egyes mikroorganizmusoknak a partner sejtmentes felülúszójában, illetve az inaktivált micélium/sejt jelenlétében történő tenyészetét is.

A baktérium és a gomba közötti kölcsönhatás metabolomikai hátterét a fermentlevek HPLC-HRMS módszerrel történő analízisén keresztül tanulmányoztuk.

5.1 HPLC-HRMS analízis és a metabolitok szűrése

A fermentlevek metabolitösszetételét HPLC-HRMS módszerrel, elektroporlasztásos ionizáció segítségével vizsgáltuk. Célunk a lehető legtöbb metabolit detektálása volt, ezért pozitív és negatív ionizációs módban is analizáltunk valamennyi mintát, mivel egyes vegyületek csak pozitív, mások csak negatív ionokat képeznek, bár számos olyan vegyületet is ismerünk, amelyek mindkét ionizációs módban detektálhatók. Az 5. ábrán látható a gomba fermentlevének, illetve a baktérium fermentlevének teljes ion kromatogramja.

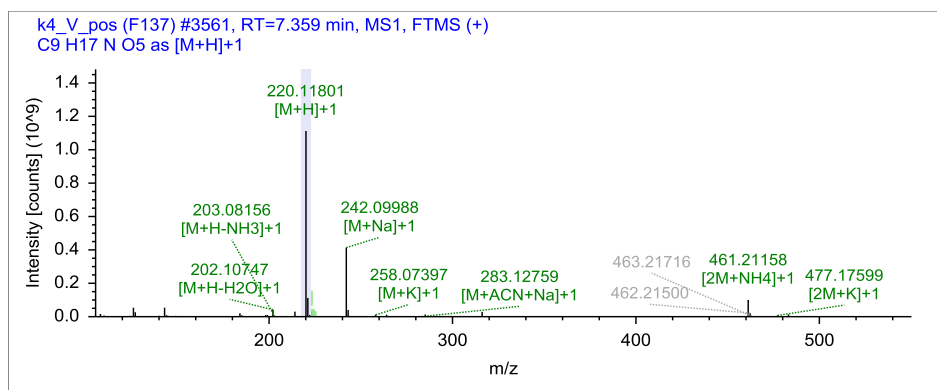




5. ábra A gomba (F(-), F(+)) és a baktérium (4(-), 4(+)) önálló tenyészetének teljes ion kromatogramja mindkét ionizációs módban.

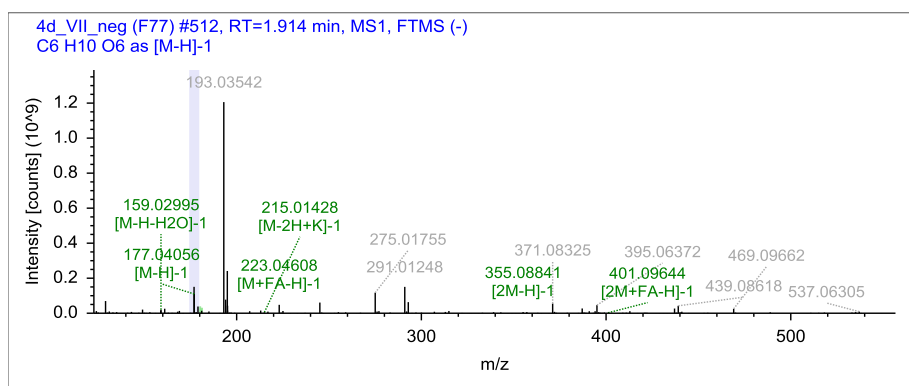
A nyers mérési adatokat a CD program segítségével dolgoztuk fel a 4. ábrán bemutatott és az alábbiakban részletezett munkamenet szerint:

1. A mérések során esetlegesen fellépő retenciós idő ingadozás korrigálása.
 2. A molekulaionok detektálása és az egy vegyületre jellemző molekulaionok csoportosítása.
- Mivel az elválasztás során különböző oldószereket, valamint sót és savat is alkalmaztunk, a rendszerben egy vegyület több molekulaiont (adduktot) is képezhetett. A 6. ábrán egy pozitív ionizációs módban mért MS1 spektrum látható, melyen az adott molekula nyolc különböző adduktját lehet azonosítani. A protonált molekulaion a sav, az alkálifémes adduktok megjelenése a metanol, az ammónium addukt pedig a só jelenlétére vezethető vissza. Természetesen a többféle molekulaion képződése nem csak pozitív ionizációs módban lehetséges.



6. ábra Egy metabolit pozitív ionizációs módban képzett molekulaionjai.

A 7. ábrán egy másik vegyület negatív ionizációs módban felvett MS1 spektruma látható. A vegyület 6 adduktot hozott létre a mérési körülmények között.



7. ábra Egy metabolit negatív ionizáció során képzett molekulaionjai.

3. A pontos tömeg és az izotópelosztás alapján az összegképlet meghatározása.
4. A metabolitok pontos tömegének és összegképletének összehasonlítása a kiválasztott online könyvtárakban, adatbázisokban, illetve az általunk készített adatbázisokban szereplő hasonló adatokkal.

Az értékelés eredményeképpen pozitív ionizációs módban 11193, negatív ionizáció mellett 8299 metabolitot különített el a program (2. táblázat). A metabolitok számát tovább szűkítettük. Először azokat a vegyületeket szűrtük ki, amelyek nem rendelkeztek izotópeloszlással, tehát jóslott összegképletük nem megbízható. Majd azokat a vegyületeket hagytuk el, melyek nem rendelkeztek MS2 spektrummal. A vegyületek megbízható azonosításához ugyanis a pontos tömegén kívül az MS2 spektrum, ami a metabolitok fragmentációs spektruma, mindenképpen

szükséges. Végül meghatároztunk egy általános detektálási határt, egy olyan minimális csúcsterület értéket, ami szükséges ahhoz, hogy egy vegyület létezése bizonyítható legyen. A szűrések eredményeképpen a továbbiakban 5020 pozitív ionizációs módban, valamint 4768 negatív ionizációs módban detektált metabolittal dolgoztunk tovább. Mivel az adatok feldolgozásakor valamennyi mintát egyszerre értékeltük, következő lépésként el kellett különítenünk, hogy mely vegyületek rendelkeznek a gombához, illetve a baktériumhoz, melyek vesznek részt a konfrontációban, a sejtmentes kísérletekben, valamint az inaktivált partnert tartalmazó kísérletekben. Továbbá ki kellett szűrni azokat a metabolitokat is (ezek elsősorban elsődleges metabolitok), melyek mennyisége állandó volt valamennyi mintában.

2. táblázat A metabolitok szűrése.

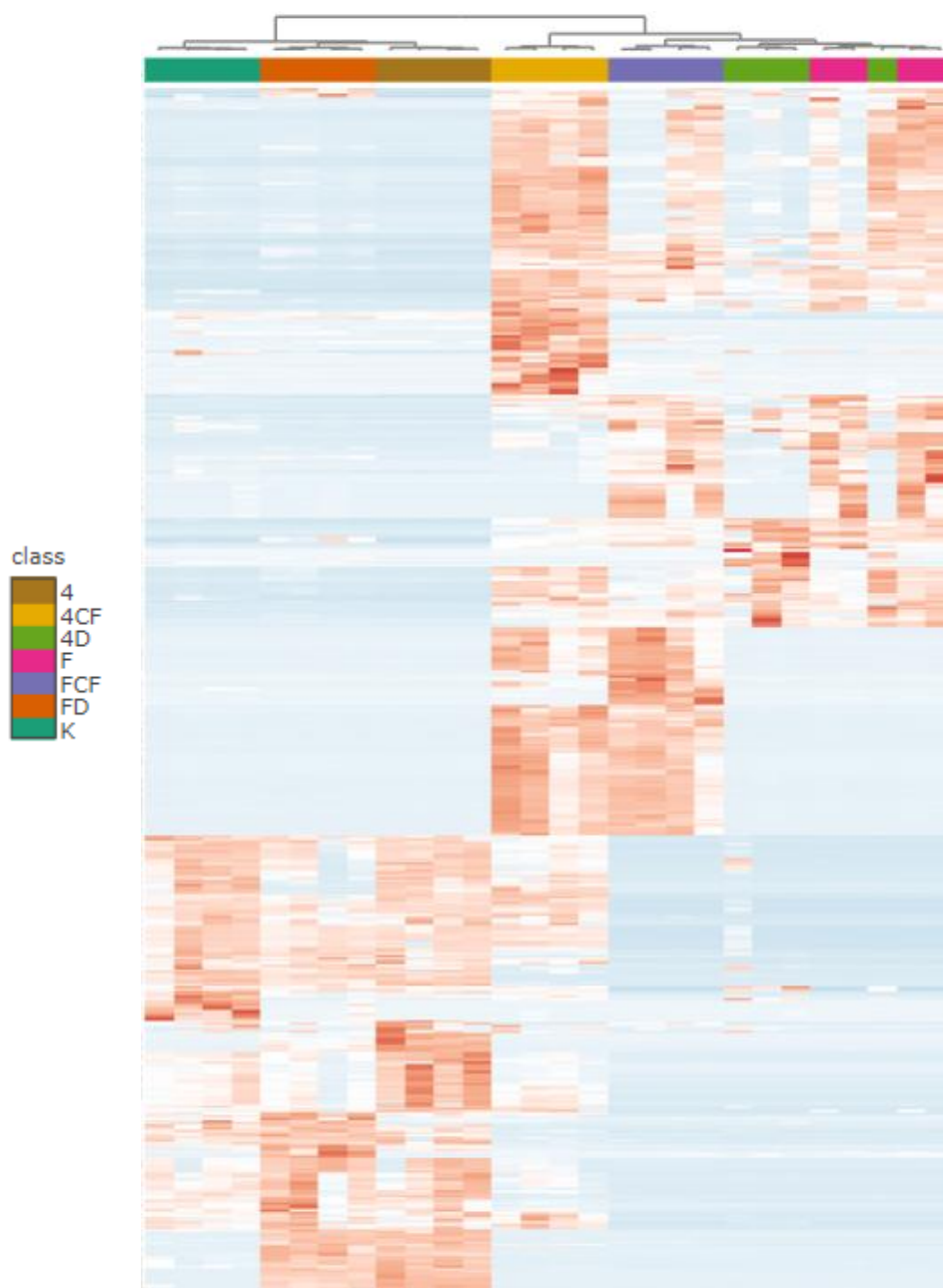
Szűrési faktor	Pozitív ionizáció	Negatív ionizáció
Összes detektált metabolit	11193	8299
Izotópeloszlással rendelkezik	8571	7030
Van MS2 spektruma	5058	4810
Küszöbérték feletti csúcsterülettel rendelkezik	5020	4768
Az általános metabolitok elhagyásával kapott specifikus vegyületek	267	282
Szignifikáns metabolitok a mindkét ionizációs módban detektált metabolitok elhagyásával	263	229

Ennek eredményeképpen összesen 549 metabolitra csökkent az értékelésben részt vevő metabolitok száma. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy melyek azok a metabolitok, melyeket mindkét ionizációs módban detektáltunk. A továbbiakban ezeket a metabolitokat úgy vettük figyelembe, mintha csak pozitív ionizációs módban detektáltuk volna őket. Következő lépésként kiszűrtük a nem szignifikáns metabolitokat is. Végeredményként 492 vegyületet kaptunk és ezek képezték az értékelés alapját.

5.2 A kísérletek összehasonlító elemzése

A 492 szignifikáns vegyület mennyiségi eloszlását valamennyi mintában hőtérképen ábrázolva kaptuk a 8. ábrát. A hőtérkép alapján megállapítható, hogy a minták alapvetően két

csoportba oszthatók. A konfrontációs kísérletet (K), az előlt gomba mellett tenyésztett baktériumot (FD) és a baktérium önálló tenyészetét (4) reprezentáló minták egy csoportot képeznek és elkülönülnek a többi mintától, tehát a három kísérlet metabolitösszetétele hasonló. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy a konfrontációs kísérlet metabolit összetételét a baktérium metabolitjai határozták meg, ami arra utal, hogy a gomba nem tudott megfelelően fejlődni a baktérium mellett.

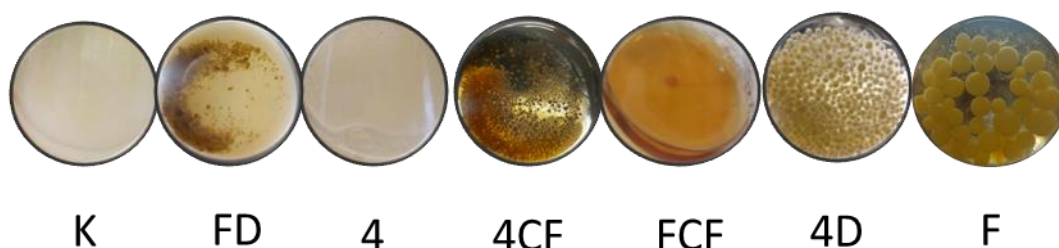


8. ábra A szignifikáns metabolitok eloszlása valamennyi mintában.

Ezt a feltételezést támasztják alá a tenyésztésekről készült fényképek (9. ábra) és a tenyésztések OD_{600nm} értékeiből számított sejtszámok és micélium tömegek is (3. táblázat).

Külön csoportot képeznek a baktérium (4CF), illetve a gomba sejtmentes közegében történt tenyésztéseket (FCF), valamint az elölt baktérium mellett tenyésztett gomba (4D) és az *A. flavus* önálló tenyészetét (F) reprezentáló minták.

Az *A. flavus* sejtmentes közegében felnevelt baktérium tenyészetek (FCF) összetételükben hasonlítanak az *A. flavus* önálló tenyészetére (F), illetve az elölt baktérium mellett felnevelt *A. flavus* (4D) tenyészetére.



9. ábra A tenyésztésekről készült fényképek. K= konfrontáció; FD= inaktivált gomba micéliumokat tartalmazó baktérium tenyészet; 4= baktérium önálló tenyészet; 4CF= *A. flavus* tenyészet a baktérium sejtmentes közegében; FCF= baktérium tenyészet a gomba sejtmentes közegében; 4D= inaktivált baktérium sejteket tartalmazó *A. flavus* tenyészet; F= *A. flavus* önálló tenyészet.

A fentiek arra utalnak, hogy a baktérium nem tudott szaporodni az *A. flavus* sejtmentes közegében. Ezzel összhangban vannak a tenyésztések OD_{600nm} értékeiből számított sejtszám értékek (3. táblázat).

3. táblázat A tenyésztések sejtszáma és micélium tömeg adatai.

	K*	FD	4	4CF	FCF	4D	F
Sejtszám	9,3E8 ±2E8	8,3E8 ±5,1E7	8,6E8 ±2,3E8	- -	3,4E5 ±6,1E4	- -	- -
$m_{micélium}(g)$	0,011 ±0,004	- -	- -	0,188 ±0,031	- -	0,378 ±0,025	0,299 ±0,036

*A rövidítések megfelelnek a 9. ábra rövidítéseinek.

Ezen a csoporton belül kissé elkülönülnek a baktérium sejtmentes közegében felnevelt *A. flavus* minták (4CF), melyek összetételükben egyértelműen eltérnek a konfrontáció metabolitösszetételétől és a baktérium önálló tenyésztésétől. A konfrontációs kísérletben, ahol együtt fejlődik a két mikroorganizmus, az *A. flavus* nem tudott megfelelően növekedni, viszont a baktérium sejtmentes felülúszójában és az inaktivált baktérium sejtek mellett is képes volt a fejlődésre (3. táblázat).

Összegezve: a hőtérekp adatai alapján megállapíthatjuk, hogy a gomba és a baktérium kölcsönhatása antagonista kölcsönhatásnak tekinthető, mivel a baktérium gátolja a gomba fejlődését. Érdekes módon a gomba önmagában képes olyan metabolitokat termelni, melyek gátolják a baktérium fejlődését, viszont a baktérium önálló tenyésztésekor keletkező metabolitok csak kis mértékben gátolják a gomba fejlődését. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a közös tenyésztéskor a mikroorganizmusok érzékelik egymás jelenlétét és reagálnak arra.

5.3 A kísérletek önálló elemzése

5.3.1 A gomba és a baktérium másodlagos metabolitkészlete

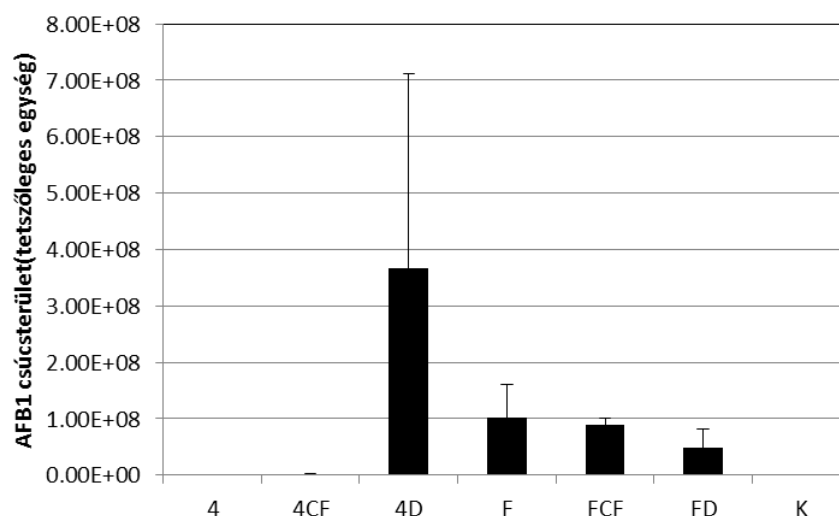
Első lépésként megvizsgáltuk, hogy a kísérletben résztvevő mikroorganizmusok termelnek-e az irodalomban leírt másodlagos metabolitokat. Ennek megállapításához egyrészt felhasználtuk azt a kutatócsoportban már korábban összeállított *Pseudomonas*-tömeglistát, ami olyan *Pseudomonas* metabolitokat tartalmaz, amelyek bioaktív hatással rendelkeznek. Emellett létrehoztunk egy olyan tömeglistát, ami az *Aspergillus* másodlagos metabolitokat (Vadlapudi és munkatársai, 2017) gyűjti össze. A tömeglistákban csak a metabolitok neve, elemösszetétele és pontos tömege található meg, ami csak egy kiindulópont lehet a metabolitok azonosításához. A pontos azonosításhoz ugyanis ismernünk kell az adott molekula fragmentációs mintázatát is.

A 492 szignifikáns vegyületből adott szűrőfaktorok alkalmazásával 186 metabolitról állapítottuk meg, hogy az *A. flavus* termeli. Megvizsgálva a spektrumkönyvtárakban található, valamint az *in silico* létrehozott fragmentációs mintázatokat 12, az irodalomban megtalálható *A. flavus* metabolitot tudtunk azonosítani (4. táblázat). A táblázatban felsorolt a metabolitok közül gyakorlati szempontból kiemelten fontos az aflatoxin B1 (AFB1).

4. 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
aszteloid F	C ₂₄ H ₂₈ O ₈	12,6	-	443,1713

Az *Aspergillus* fajok négyféle aflatoxint termelhetnek, a kísérletekben részt vevő izolátum esetén csak AFB1 toxint detektáltunk. A 10. ábrán tüntettük fel, hogyan változott a toxin mennyisége az egyes mintákban.



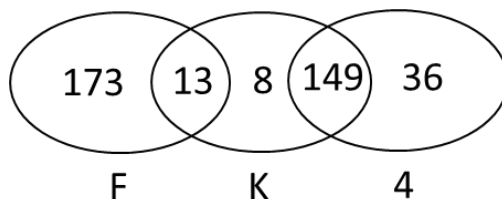
10. ábra Az aflatoxin B1 mennyiségének alakulása valamennyi vizsgált mintában. 4= baktérium önálló tenyészet; 4CF= *A. flavus* tenyészet a baktérium sejtmentes közegében; 4D= inaktivált baktérium sejteket tartalmazó *A. flavus* tenyészet; F= *A. flavus* önálló tenyészet; FCF= baktérium tenyészet a gomba sejtmentes közegében; FD= inaktivált gomba micéliumokat tartalmazó baktérium tenyészet; K= konfrontáció.

A 10. ábra adatai szerint az *A. flavus* sem a konfrontáció során, sem a baktérium sejtmentes felülúszójában nem termelt AFB1-et, tehát a toxintermelés gátlására a baktérium már önmagában is képes.

Adott szűrőfaktorok felhasználásával a 492 szignifikáns vegyületből 185 metabolitról állapítottuk meg, hogy a baktérium termeli. A metabolitok pontos tömegét és összetételét összehasonlítva a *Pseudomonas* bioaktív metabolitokat felsorakoztató tömeglistával azt tapasztaltuk, hogy a kísérletekben alkalmazott *P. paracarnis* izolátum egyetlen olyan metabolitot sem termel, ami a tömeglistában megtalálható.

5.3.2 A konfrontáció metabolitkészlete

A konfrontáció metabolomikai hátterének vizsgálatához a konfrontáció metabolitkészletét összehasonlítottuk a résztvevő mikroorganizmusok önálló tenyészetének metabolitkészletével. Számításaink eredményét foglaltuk össze a 11. ábrán.



11. ábra A konfrontációban detektált metabolitok származás szerinti eloszlása.
F=*A. flavus* metabolit; K=konfrontáció metabolit; 4=*Pseudomonas* metabolit.

Az ábra adatai szerint az *A. flavus*ra jellemző 186 metabolitból 173-at nem tudtunk detektálni a konfrontációs mintákban, a gomba csak 13 vegyületet termelt a baktériummal kölcsönhatva. Ebből a 13 vegyületből csupán egyetlen vegyületet detektáltunk közel négyszeres mennyiségben, egy további vegyületet ugyanabban a mennyiségben, mint az önálló gomba tenyészetben. Ezzel ellentétben a baktériumra jellemző 185 metabolitból 149 jelent meg a konfrontációs mintákban és csak 36 baktériumra jellemző metabolit nem termelődött a kölcsönhatás során.

A 11. ábra adatai szerint nyolc olyan metabolit jelent meg a konfrontációban, amelyeket sem a gomba, sem a baktérium önmagában nem képes termelni. Sőt, ezeket a vegyületeket a gomba és a baktérium sem a partner organizmus sejtmentes felülúszójában, sem az inaktivált partner micélium/sejt jelenlétében nem termelte. Ebből négy vegyület a foszfogliceridek csoportjába tartozó foszfatidil-etanolaminok (PE) képviselője, melyek az eukarióták második legfontosabb

sejtmembrán alkotói. Azonosításuk a pontos tömeg és a jellemző fragmentációs mintázat alapján történt.

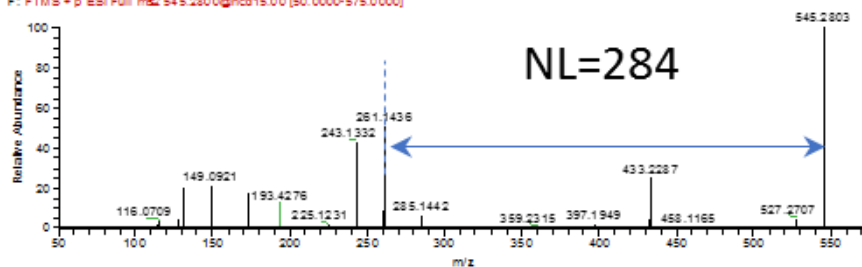
5. táblázat Kizárólag a konfrontációban detektált nyolc vegyület.

Vegyület	Összegképlet	RT (min)	Detektált ion [M+H] ⁺ m/z
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
		9,1	545,2819
Triacetil-fuzarinin	C ₃₉ H ₆₀ N ₆ O ₁₅	11,4	853,4136
		10,3	877,3718
		10,7	906,3255

Mivel a sejtmembrán alkotó PE vegyületek nem jelzőmolekulák, megjelenésük a mikroorganizmusok együtt tenyésztésekor azt sejteti, hogy a kölcsönhatás során az egyik résztvevő membránja sérül. Mivel az *A. flavus* növekedése gátolt a konfrontáció alkalmával, feltételezzük, hogy ezen vegyületek gomba eredetűek.

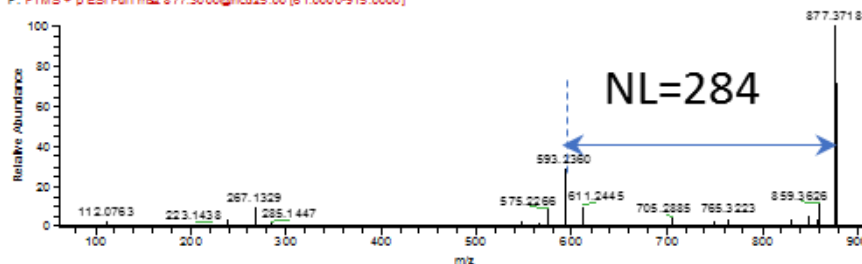
A konfrontációban megjelenő további négy vegyület is egy vegyületcsoportot képvisel, mivel MS2 spektrumuk nagy hasonlóságot mutat: mindegyik vegyület protonált molekulaionjának fragmentációja 284 tömegű semleges veszteséget eredményezett (12. ábra). A négy metabolit közül a 12/C vegyület pontos tömege és MS2 spektruma egyezést mutat egy gomba sziderofór, az N,N',N''-triacetil-fuzarinin (13. ábra) tömegével és MS2 spektrumával (Walsh és munkatársai, 2021). A 284 tömegű semleges veszteség az N-acetil-fuzarinin (13. ábra). Mivel a másik 3 vegyület MS2 spektrumában is megjelenik a 284 tömegű semleges veszteség, elképzelhető, hogy azok a metabolitok is sziderofórok, de nem kizárólag N-acetil-fuzarinint tartalmaznak. Pontos összetételük megállapítása folyamatban van.

k4_S_pos_orm_Na_H_15NCE #872 RT: 8.92 AV: 1 NL: 2.99E5
F: FTMS + p ESI Full ms2 545.2300@hcd15.00 [50.0000-575.0000]



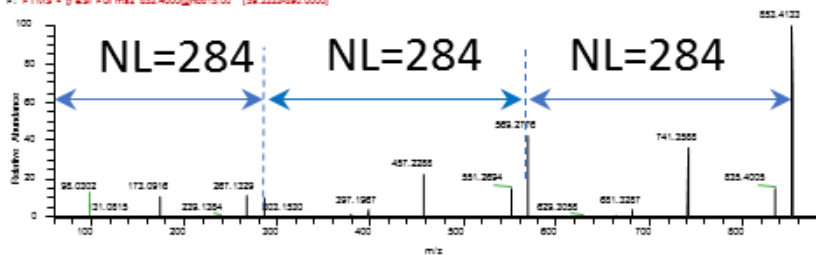
A

k4_S_pos_orm_Na_H_15NCE #1560 RT: 10.45 AV: 1 NL: 4.78E5
F: FTMS + p ESI Full ms2 877.3718@hcd25.00 [51.0000-915.0000]



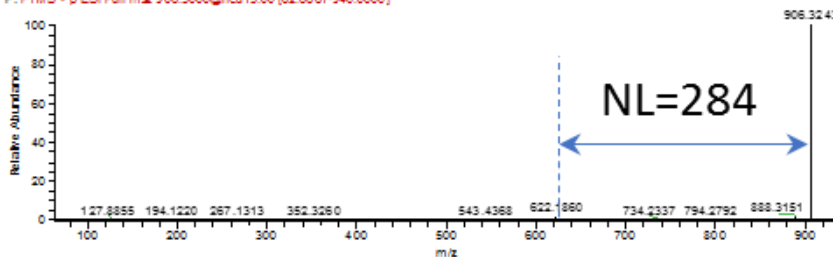
B

k4_S_pos_orm_Na_H_15NCE #2025 RT: 11.41 AV: 1 NL: 1.23E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 852.4132@hcd15.00 [52.3333-590.0000]



C

k4_S_pos_orm_Na_H_15NCE #1729 RT: 10.77 AV: 1 NL: 4.95E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 908.3243@hcd15.00 [62.6667-940.0000]

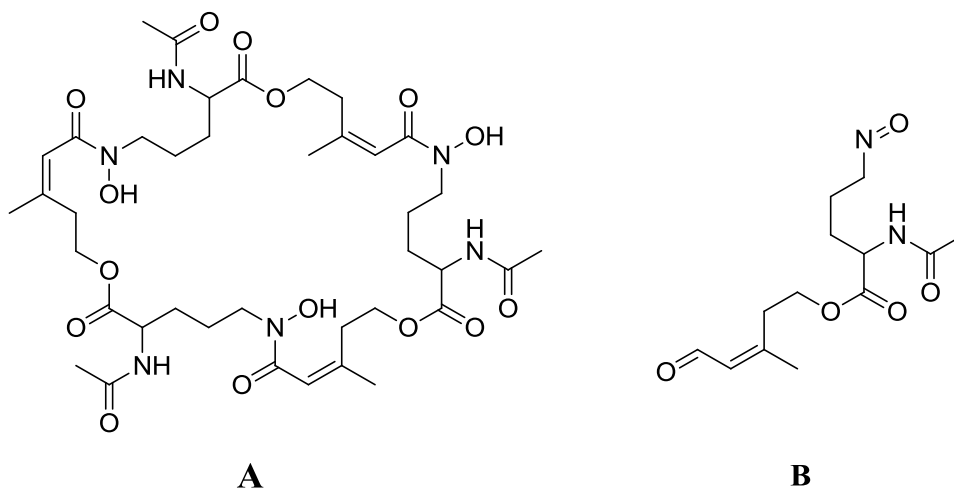


D

12. ábra Az $[M+H]^+$ molekulaion fragmentációjaker 284 tömegű semleges veszteséget mutató metabolitok.

A sziderofórok mikroorganizmusok által termelt, 500-1000 Da molekulatömegű vas-kelátképző ligandumok, amelyek lehetővé teszik a mikrobák számára az aerob körülmények között

oldhatatlan Fe-hidroxidokból és Fe-oxihidroxidokból a Fe(III) felvételét. A baktériumok változatos összetételű, míg a gombák elsősorban hidroxamát típusú sziderofórokat termelnek (Renshaw és munkatársai, 2002). Az N,N',N''-triacetil-fuzarinin gomba eredetű sziderofór vegyület, ezért nagyon valószínű, hogy a konfrontációban az *A. flavus* termeli, azonban nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a többi vegyület a *Pseudomonastól* származik. *Penicillium* fajokkal végzett vizsgálatai során Moore és Emery a tenyészet felülúszójában N-acetil-fuzarinin tartalmú vegyületeket azonosítottak (Moore és Emery, 1976). A sziderofórok megjelenése a baktérium-gomba kölcsönhatásokban Pierce és munkatársa szerint a kölcsönhatások konzervált mozgatórugói (Pierce és munkatársai, 2021).

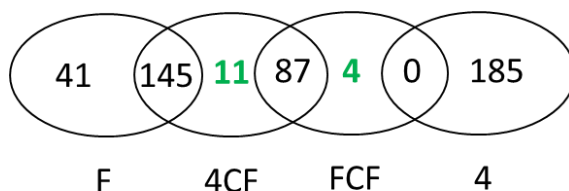


13. ábra Az N,N',N''-triacetil-fuzarinin (A) és a monomeregység (B) szerkezeti képlete.

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a *P. paracarnis* és az *A. flavus* konfrontációja során 8 olyan, a többi tenyésztés esetén nem detektált vegyület jelenik meg, melyek két vegyületcsoportot képviselnek és feltételezésünk szerint bármelyik mikroorganizmustól származhatnak. A foszfatidil-etanolaminok feltehetően a gomba membránjának felbomlásával váltak szabaddá. A sziderofórok közül az N,N',N''-triacetil-fuzarinin az *A. flavushoz* köthető, míg a többi eredete kérdéses.

5.3.3. A sejtmentes felülúszókban tenyésztett mikrobák metabolitkészlete

A 14. ábrán a kétféle sejtmentes felülúszóban történő tenyésztések során detektált jellemző metabolitok és a résztvevő mikroorganizmusok által termelt metabolitok eloszlását tüntettük fel.



14. ábra A sejtmentes felülúszókban történő tenyésztésekben detektált metabolitok származás szerinti eloszlása. F=*A. flavus* metabolit; 4CF= baktérium sejtmentes közegében termelődött metabolit; FCF= gomba sejtmentes közegében termelődött metabolit; 4=*Pseudomonas* metabolit;

A 14. ábra adatai szerint a két mikroorganizmus sejtmentes felülúszójában tenyésztett partnerek 87 olyan vegyületet termeltek, melyeket csak a sejtmentes felülúszókban detektáltunk. Fontos kiemelni, hogy ugyanazokat a vegyületeket termelte a baktérium és a gomba is.

5.3.3.1. A gomba növekedése a baktérium sejtmentes felülúszójában

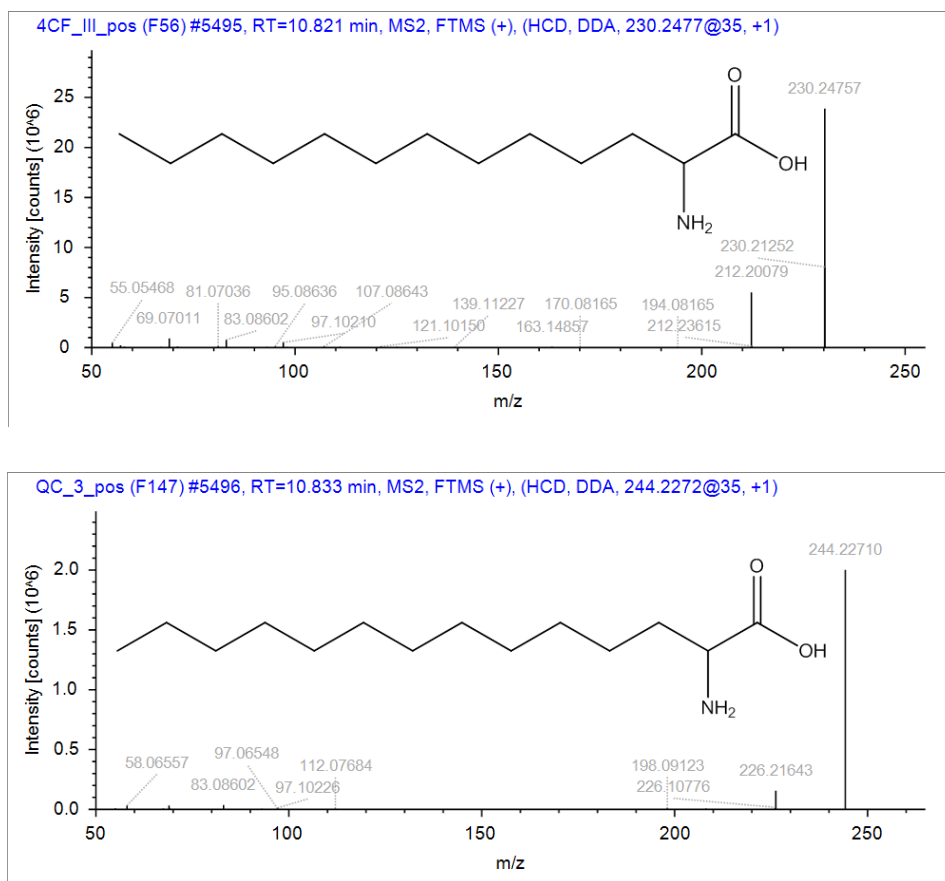
Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a gomba fel tudott nőni a baktérium sejtmentes fermentlevében, ellentétben a konfrontációban tapasztaltakkal.

6. táblázat A *P. paracarnis* izolátum fermentlevében tenyésztett egyedi *A. flavus* metabolitok.

Vegyület	RT (min)	Detektált ion [M+H] ⁺ m/z	Detektált ion [M-H] ⁻ m/z
1.	10,8	230,2116	-
2.	10,8	244,2273	-
3.	10,6	290,2696	-
4.	10,6	304,2496	-
5.	10,7	334,2971	-
6.	14,7	474,3068	-
7.	7,3	492,2095	-
8.	14,7	504,3538	-
9.	14,8	-	363,1462
10.	15,7	-	383,2111
11.	6,8	-	641,1816

Ezzel összhangban áll az a tény, hogy a baktérium sejtmentes felülúszójában a 186 *A. flavus* metabolitból 145 vegyületet detektáltunk.

Megjelent azonban 11 olyan metabolit, melyeket semmilyen más mintában nem észleltünk (6. táblázat). Fragmentációs mintázatuk alapján négy típust tudtunk elkülöníteni. A 6. táblázatban szereplő első két vegyület összegképlete és fragmentációs mintázata alapján aminosav.



15. ábra A $C_{13}H_{27}NO_2$ összegképletű és 10,8 perc retenciós idejű, valamint a $C_{14}H_{29}NO_2$ összegképletű és 10,8 perc retenciós idejű vegyületek MS2 spektrumai és feltételezett szerkezetük.

Egy másik vegyületcsoportot képviselnek a táblázat 3.-5. sorában feltüntetett metabolitok, melyek szintén nitrogén-tartalmúak, azonban a kis molekulatömegű jellemző fragmensek alapján feltételezzük, hogy dietilamin-származékok. A csak negatív ionizációs módban detektált 3 vegyületet, illetve a 474,3068 m/z , 492,2095 m/z , valamint a 504,3538 m/z értékhez tartozó vegyületet még nem sikerült azonosítanunk.

5.3.3.2. A baktérium növekedése a gomba sejtmentes felülúszójában

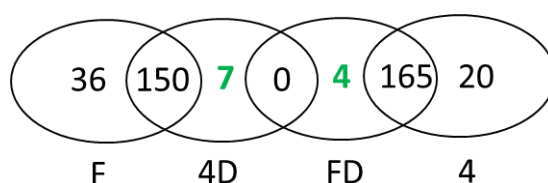
Metabolomikai adataink is alátámasztják azt a kísérletekben tapasztalt jelenséget, hogy a baktérium nem tud az *A. flavus* fermentlevében szaporodni. Ennek megfelelően egyetlen olyan metabolitot sem tudtunk kimutatni a gomba sejtmentes felülúszójában történő tenyésztés végén, ami a baktériumra jellemző. Azonban megjelent 4, korábban egyik rendszerben sem detektált metabolit, melyeket a 7. táblázatban foglalunk össze. Azonosításuk folyamatban van.

7. táblázat Az *A. flavus* sejtmentes fermentlevében tenyésztett egyedi baktérium metabolitok.

Vegyület	RT (min)	Detektált ion [M+H] ⁺ m/z	Detektált ion [M-H] ⁻ m/z
1	2,9	-	506,1567
2	3,0	-	607,2702
3	3,1	-	536,2099
4	15,8	447,1925	-

5.3.3.3 Az inaktivált partner jelenlétében tenyésztett mikrobák metabolitkészlete

Az inaktivált partner jelenlétében történő tenyésztések során detektált jellemző metabolitok és a résztvevő mikroorganizmusok által termelt metabolitok eloszlását tüntettük fel a 16. ábrán.



16. ábra Az inaktivált partner jelenlétében történő tenyésztésekben detektált metabolitok származás szerinti eloszlása. F=*A. flavus* metabolit; 4D= inaktivált baktérium jelenlétében termelődött metabolit; FD= inaktivált gomba jelenlétében termelődött metabolit; 4=*Pseudomonas* metabolit;

A sejtmentes felülúszókban történő tenyésztésekkel ellentétben az inaktivált partner jelenlétében mindkét mikroorganizmus fel tudott nőni, bár metabolitkészletüknek csak 80-90%-át detektáltuk. Nem észleltünk egyetlen közös metabolitot sem. Megjelentek viszont olyan vegyületek, melyek

kizárólag vagy csak az inaktivált gomba mellett termelt a *P. paracarnis*, vagy csak az inaktivált baktérium mellett termelt az *A. flavus* (8. táblázat).

8. táblázat Az inaktivált partner jelenlétében történő tenyésztések során detektált jellemző metabolitok.

Vegyület	Tenyésztés	RT (min)	Detektált ion [M+H] ⁺ m/z	Detektált ion [M-H] ⁻ m/z
1.	4D [*]	1,4	-	295,1512
2.	4D	8,8	-	314,1726
3.	4D	15,8	-	240,1728
4.	4D	16,2	319,2265	-
5.	FD ^{**}	4,9	-	867,3479
6.	FD	6,2	-	940,3912
7.	FD	6,9	-	940,3912
8.	FD	7,1	-	555,1360
9.	FD	7,8	-	540,1325
10.	FD	9,4	678,2173	-
11.	FD	9,8	516,1691	-

^{*}4D= inaktivált baktérium sejteket tartalmazó *A. flavus* tenyészet; ^{**}FD= inaktivált gomba micéliumokat tartalmazó baktérium tenyészet;

Ezidáig ezeket a metabolitokat nem sikerült azonosítanunk.

6. Összefoglalás

Munkánk során az *A. flavus* és a *P. paracarnis* között fellépő antagonista kölcsönhatás metabolomikai hátterét kívántuk felderíteni. Mivel az irodalmi adatok szerint a kölcsönható mikroorganizmusok érzékeli egymás jelenlétét, a konfrontáció mellett megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a baktérium és a gomba viselkedését a partner organizmus metabolitkészlete, illetve inaktivált micéliumának/sejtjeinek jelenléte.

A folyadékfázisban végrehajtott tenyészetek liofilizálását és megfelelő oldószerben történő visszaoldását követően, a metabolitösszetételt pozitív és negatív ionizációs módban HPLC-ESI-HRMS módszer alkalmazásával határoztuk meg. A nyers adatok értékelése során a kiértékelő program által megállapított nagyszámú metabolitot több szűrőfaktor segítségével 492 olyan metabolitra szűkítettük, melyek mennyisége szignifikáns változást mutatott a tenyésztések során. Első lépésként megvizsgáltuk a baktérium és a gomba metabolitkészletét azzal a céllal, hogy felderítsük termelnek-e az adott fajra jellemző másodlagos metabolitokat. Az *A. flavus* esetén 12, az irodalomban megtalálható metabolitot azonosítottunk, viszont a *P. paracarnis* egyetlen ismert bioaktív metabolitot sem termelt.

Eredményeink szerint az *A. flavus* és a *P. paracarnis* közötti antagonista kölcsönhatásban 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 felülúszójában, sem az inaktivált partner micélium/sejt jelenlétében nem termelt. Feltételezésünk szerint a nyolc metabolit, amely két vegyületcsoportot képvisel, bármelyik mikroorganizmustól származhat. Négy foszfatidil-etanolamin – mely vegyületcsoport az eukarióták második legfontosabb sejtmembrán alkotója - feltehetően a gomba membránjának felbomlásával vált szabaddá. A másik 4 metabolit közül az egyik egyértelműen beazonosítható gomba sziderofór, az N,N',N''-triacetil-fuzarinin, ezért valószínű, hogy a konfrontációban az *A. flavus* termeli. A másik három vegyület is tartalmaz N-acetil-fuzarinin egységet, ezért feltételezzük, hogy szintén sziderofórok, azonban nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a *Pseudomonastól* származnak.

Mindkét sejtmentes felülúszóban és az inaktivált partner micéliumának/sejtjeinek jelenlétében mindkét mikroorganizmus termelt új, a többi tenyésztésben nem észlelt metabolitot. Ezek egy részét azonosítani is tudtuk.

A sejtmentes felülúszókban és a partner inaktivált micéliuma/sejtjei jelenlétében történő tenyésztések metabolitösszetételét vizsgálva és összehasonlítva a konfrontáció metabolitkészletével arra a megállapításra jutottunk, hogy a baktérium és a gomba a konfrontáció során érzékelt és válaszolt a partner jelenlétére. A baktérium sejtmentes felülúszójában ugyanis az *A. flavus* szinte teljes metabolitkészletét, a gomba sejtmentes felülúszójában viszont egyetlen baktérium metabolitot sem detektáltunk ellentétben a konfrontációban tapasztaltakkal. Tehát a partner organizmusok válaszreakciója egyértelműen meghatározta az *A. flavus* és a *P. paracarnis* közötti antagonista kölcsönhatás kimenetelét.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Papp Tamás tanszékvezető úrnak, hogy lehetővé tette, hogy a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai KarBiotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén készíthessem el az OTDK dolgozatomat.

Köszönetemet szeretném kifejezni Papp Dóra Anna doktorjelöltnek a tenyésztések kivitelezéséért és rendíthetlen jókedvéért, mely nagyban hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez.

Hálával tartozom továbbá témavezetőmnek Dr. Varga Mónikának, amiért szakmai tapasztalataival, tanácsaival mind elméleti és mind gyakorlati úton segítette a dolgozatom elkészítését.

8. Tételes szerzői hozzájárulás

A 37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK 2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

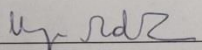
Alulírott **Schwartz Balázs** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **Baktérium-gomba kölcsönhatás metabolomikai hátterének vizsgálata** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt¹:

Részfeladat ²	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán ³ jellemezve)
<i>Aspergillus</i> adatbázis készítése	5
<i>A</i> tenyésztések extrakciója	5
HPLC-ESI-HRMS mérések kivitelezése	5
Adatok kiértékelése	4

Kelt: Szeged, 2024.11.11.


Schwartz Balázs

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:


Dr. Varga Mónika

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

9. Felhasznált irodalom

- 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;2015.
- 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. et al. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. *Nat Commun* 9, 3429 (2018).
- Ciolacu, L.; Zand, E.; Negrau, C.; Jaeger, H. Bacterial Attachment and Biofilm Formation on Antimicrobial Sealants and Stainless Steel Surfaces. *Foods* 2022, 11, 3096.
- 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. doi: 10.1038/nbt0208-162. PMID: 18259166.
- de Weert S., Kuiper I., Lagendijk E.L., Lamers G.E., Lugtenberg B.J. Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe Interact*. 2004;17(11):1185-91.
- 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.
- 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.
- Ghooi R.B., Thattai S.M. Inhibition of cell wall synthesis--is this the mechanism of action of penicillins? *Med Hypotheses*. 1995;44(2):127-31.

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.

Grewal SI, Rainey PB Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudate. *J Gen Microbiol* , 1991 137(12):2761–2768.

Herrington P.R., Craig J.T., Sheridan J.E., Methyl vinyl ketone: A volatile fungistatic inhibitor from *Streptomyces griseoruber*, *Soil Biology and Biochemistry*,19:5, 1987, 509-512.

Kohlmeier S., Smits T.H., Ford R.M., Keel C., Harms H., Wick L.Y. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ Sci Technol*. 2005; 39(12):4640-6.

Lapiere A., Richard M.L. Bacterial-fungal metabolic interactions within the microbiota and their potential relevance in human health and disease: a short review. *Gut Microbes*. 2022;14(1):2105610.

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.

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.

Moore R.E., Emery T. Nalpha-acetylfulvarinines: 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.

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.

Papp, D.A.; Kocsubé, S.; Farkas, Z.; Szekeres, A.; Vágvolgyi, C.; Hamari, Z.; Varga, M. Aflatoxin B1 Control by Various *Pseudomonas* Isolates. *Toxins* 2024, 16, 367.

Piechulla B., Degenhardt J. The emerging importance of microbial volatile organic compounds. *Plant Cell Environ*. 2014 Apr;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.

Renshaw J.C., Robson G.D., Trinci A.P.J., et al. Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycological Research.* 2002;106(10):1123-1142.

Rudnick M.B., van Veen J.A., de Boer W. Oxalic acid: a signal molecule for fungus-feeding bacteria of the genus *Collimonas*? *Environ Microbiol Rep.* 2015;7(5):709-14.

Schmidt R., Jager V., Zuhlke D. et al (2017) Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite Sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C. *Sci Rep* 7(1):862.

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., et al. (2018) Conserved responses in a war of small molecules between a plant-pathogenic bacterium and fungi. *MBio* 9: e00820–e00818

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.

Vadlapudi V., Borah N., Yellusani K.R., Gade S., Reddy P., Rajamanikyam M., Vempati L.N.S., Gubbala S.P., Chopra P., Upadhyayula S.M., Amanchy R. *Aspergillus* Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of *Aspergillus* genus. *Sci Rep.* 2017 Aug 4;7(1):7325.

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.

Walsh J.P., DesRochers N., Renaud J.B., Seifert K.A., Yeung K.K., Sumarah M.W. Identification of N,N',N''-triacetylfusarinine C as a key metabolite for root rot disease virulence in American ginseng. *J Ginseng Res.* 2021; 45(1):156-162.

Wongsuk T., Pumeesat P., Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol* , 2016, 56(5):440– 447.

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 Feb;8(2):470-81.

Zhou Y., Wang H., Xu S. et al. Bacterial-fungal interactions under agricultural settings: from physical to chemical interactions. *Stress Biology* 2, 22 (2022).