

37. OTDK Biológia Szekció

Pseudomonas izolátumok metabolomikai vizsgálata

Készítette:

Tari Kitti

biológus hallgató

MSc I. évfolyam

Témavezető:

Dr. Varga Mónika

tudományos munkatárs

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
2	BEVEZTÉS.....	4
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
3.1	<i>Biokontroll mikroorganizmusok.....</i>	<i>5</i>
3.2	<i>Biokontroll mechanizmusok.....</i>	<i>5</i>
3.2.1	Közvetlen kölcsönhatás.....	5
3.2.2	Közvetett kölcsönhatás.....	6
3.3	<i>Pseudomonas</i> fajok általános jellemzői.....	6
3.4	<i>Pseudomonas</i> fajok által termelt bioaktív vegyületek.....	7
3.4.1	Sziderofórok.....	8
3.4.2	Antibiotikumok.....	9
3.4.3	Biosurfaktánsok.....	10
3.4.4	Homoszerin-laktonok.....	11
3.5	<i>Metabolomika.....</i>	<i>13</i>
3.5.1	Metabolomikai vizsgálatok típusai.....	13
3.5.2	Analitikai módszerek a metabolomikában.....	14
3.5.3	Adatelemzés.....	15
4	CÉLKITŰZÉSEK.....	16
5	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
5.1	<i>Felhasznált törzsek.....</i>	<i>17</i>
5.2	<i>Felhasznált anyagok.....</i>	<i>17</i>
5.2.1	Tápoldat.....	17
5.2.2	Metabolomikai vizsgálatok.....	17
5.3	<i>Tenyésztés körülményei.....</i>	<i>18</i>
5.4	<i>Extrakció.....</i>	<i>18</i>
5.5	<i>HPLC-HRMS-mérés körülményei.....</i>	<i>18</i>
5.6	<i>Alkalmazott szoftverek.....</i>	<i>19</i>
6	EREDMÉNYEK.....	21
6.1	<i>Adatbázis készítése.....</i>	<i>21</i>
6.2	<i>HPLC-HRMS vizsgálatok.....</i>	<i>21</i>
6.2.1	Előszűrés.....	21
6.2.2	Ismert <i>Pseudomonas</i> metabolitok azonosítása.....	24
6.2.3	Aktivitáshoz hozzájáruló metabolitok.....	26
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	31
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	33
9	IRODALOMJEGYZÉK.....	34

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACN	Acetonitril
AGC	Automatic Gain Control (Automatikus erősítésszabályozás)
AHL	N-acil homoszerin laktonok
ANOVA	ANalysis Of VAriance (Varianciaanalízis)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció)
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization (Atmoszférikus nyomású fotoionizáció)
BCA	Biocontrol agent (Biokontroll ágens)
CD	CompoundDiscoverer
CFM-ID	Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification (Versenyképes fragmentációs modellezés a metabolitok azonosításához)
CLP	Cyclic Lipopeptide (Ciklikus Lipopeptid)
DAPG	2,4-diacetil-floroglucinol
ESI	Electrospray Ionization (Elektroporlasztásos ionizáció)
FA	Formic Acid (Hangyasav)
FT-ICR	Fourier-Transform-Ion Cyclotron Resonance (Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia)
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Gázkromatográfia-tömegspektrometria)
GTDB	Genome Taxonomy Database
HCN	Hidrogén-cianid
HPLC-ESI-HRMS	High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-High Resolution Mass Spectrometry (Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia-Elektroporlasztásos ionizáció-Nagy felbontású tömegspektrometria)
HSL	Homoszerin lakton
ISR	Induced Systemic Resistance (Indukált szisztémás rezisztencia)
IT	Isolation Time (Izolációs idő)
MSMS/MS2	Tandem Mass Spectrometry (Tandem tömegspektrometria)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Mágneses Rezonancia)
OD	Optical Density (Optikai denzitás)
PCA	Fenazin-1-karbonsav
PCA	Principal Component Analysis (Főkomponens analízis)
PCH	Piocelin
PCN	Fenazin-2-karboxamid
QC	Quality control
QS	Quorum Sensing
RL	Ramnolipid
RT	Retention Time (Retenciós idő)
TOF	Time of Flight (Repülési idő)

2 BEVEZTÉS

A fitopatogén gombák szántóföldi kártétele jelentős termésveszteséghez vezet, illetve az általuk esetlegesen termelt másodlagos metabolitok révén az állatokra és az emberekre nézve egészségügyi kockázatot is jelenthetnek. A gombafertőzés megelőzésére/kezelésére különböző módszereket alkalmaznak, mint például a vetésforgó, a rezisztens növényfajta nemesítése és a szintetikus vegyszerek használata. A gombaölő szerek túlzott használata azonban toxicitást okozhat az élő szervezetekben, károsíthatja a természetes ökoszisztémát, és a rezisztens populációk megjelenését is kiválthatja. A növényvédelemben a gombaölőszerek alkalmazása helyett biokontroll mikroorganizmusokat is használnak (biocontrol agent, BCA). A rizoszférában található baktériumok, mint például a *Bacillus*, a *Streptomyces* és a *Pseudomonas* hatékony BCA organizmusoknak bizonyultak a gombás betegségek megelőzésében. A *Bacillus*, *Streptomyces* és *Pseudomonas* nemzetségekbe tartozó baktériumok között vannak olyanok, amelyeket már kereskedelmi termékként bejegyeztek és forgalmaznak biokontroll aktivitásuk miatt. Jelenleg az EU-ban 13 baktériumalapú antimikrobiális biológiai növényvédő szert tartanak nyilván. A biokontroll mikroorganizmusokat jelenleg csak korlátozottan használják a mezőgazdaságban, ugyanis hatékonyságukat tekintve különbözőek, a piaci elérhetőségük korlátozott, valamint a termelők is bizalmatlanok használatukat tekintve.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Biokontroll mikroorganizmusok

A növények, a talaj, az ott élő mikroorganizmusok és a talaj mikrofaunája között intenzív kölcsönhatások figyelhetők meg. A növények például számukra előnyös rizoszféramikroorganizmusokkal (baktériumokkal, gombákkal, algákkal) léphetnek kapcsolatba, amelyek segíthetnek ellenállóbbá tenni őket a különböző környezeti stresszfactorokkal és betegségekkel szemben (Nunes és mtsai, 2001; Bonaterra és mtsai, 2022). Ezeket a rizoszférában található, jellemzően antagonista gombákat (*Trichoderma* sp.), valamint baktériumokat (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Sreptomyces* spp.) használják a biológiai védekezésben (Calderón és mtsai., 2013; Bonaterra és mtsai, 2022). A biokontroll mikroorganizmusok sokféle mechanizmust alkalmazhatnak a fitopatogénekkal szemben, akár egyet, vagy többfélét kombinálva közvetlenül, vagy közvetve kölcsönhatva a kórokozóval (Rauscher és mtsai., 1997; Lahlali és mtsai., 2022).

3.2 Biokontroll mechanizmusok

3.2.1 Közvetlen kölcsönhatás

A BCA közvetlen kapcsolatba léphet a patogénekkal antimikrobiális vegyületek kiválasztása révén, melyek a kórokozók növekedését vagy metabolikus aktivitását csökkentik (antibiózis). Ilyen metabolitok a sejtfalbontó enzimek, az antibiotikumok, a mikrobiális illékony vegyületek, a lipopeptidek, és a biofelületaktív anyagok. Továbbá a BCA beavatkozhat a kórokozók quorum sensing (QS) rendszerébe is úgy, hogy a fertőzések iniciálásához szükséges jelzőmolekulák szintézisét gátolja vagy olyan enzimeket termel (laktonáz, pektináz, kitináz), melyekkel lebontja a QS-jelzőmolekulákat, így redukálva a kórokozók virulenciáját és csökkentve a növényi betegségek megjelenését (Usta és mtsai., 2013; Lahlali és mtsai., 2022).

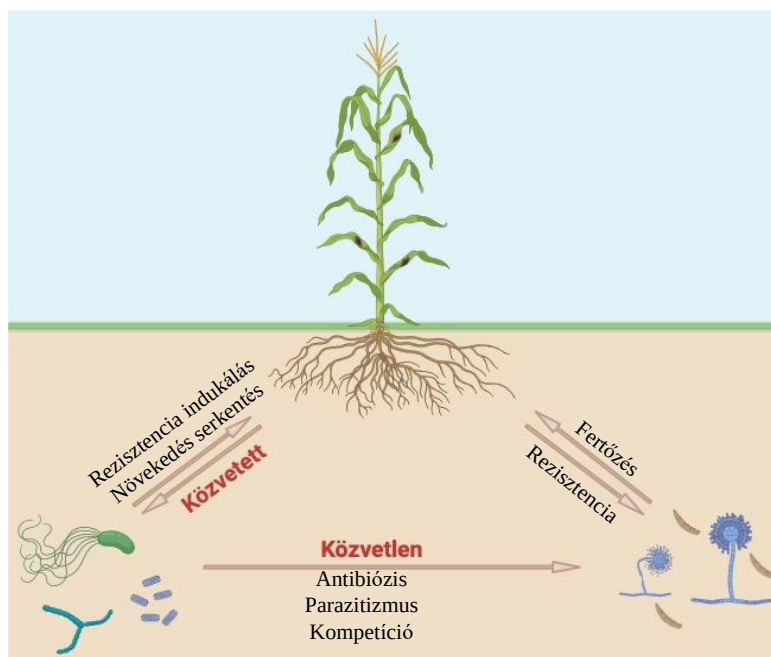
A BCA parazitaként is viselkedhet. Egyrészt a patogén infekciója előtt vagy közvetlenül utána elpusztíthatja annak gazdasejtjeit, majd a felszabaduló tápanyagokat felhasználja (nekrotróf parazitizmus) (Mendes és mtsai., 2011), vagy fejlődéséhez inkább az élő, mint a halott gazdaszervezetet létesíti előnyben (biotróf parazitizmus) (Berg és mtsai., 2014).

A BCA a patogénekkal versengve is csökkentheti azok növekedését és infekciós nyomását, mely során kompetitív kizárás érvényesül (Lahlali és mtsai., 2022). A kompetíció esetében

elsősorban a vashoz hasonló mikrotápanyagokért való versengés a jellemző (Bonaterra és mtsai., 2022).

3.2.2 Közvetett kölcsönhatás

A közvetlen kölcsönhatások mellett a BCA közvetett módon is védekezhet a fitopatogénekkal szemben, például egy védekezési válasz kiváltásával, vagy a növények növekedésének elősegítésével (Rauscher és mtsai., 1997; Lahlali és mtsai., 2022). A BCA szisztémás rezisztencia kiváltásával fokozhatja a gazdaszervezet (növény) védekező mechanizmusait, ami a strukturális barrierek felhalmozódását eredményezi, valamint számos biokémiai és molekuláris védekező válaszreakciót vált ki a gazdaszervezetben. Ez a kórokozók széles körével szemben védelmi rendszert biztosít. A növények növekedését elősegíthetik azáltal, hogy fokozzák az ásványi anyagok és a víz felszívódását, vagy olyan növekedést serkentő hormonokat termelnek, amelyek javítják a növények fitneszét (Lahlali és mtsai., 2022).

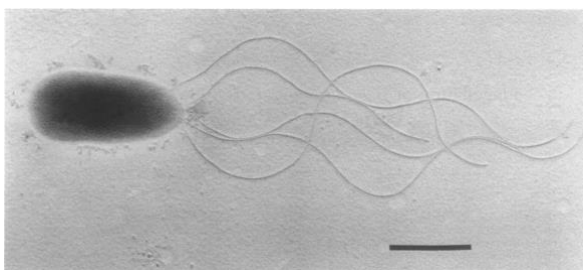


1. ábra BCA mikroorganizmusok közvetlen és közvetett kölcsönhatásai (BioRender.com segítségével készült).

3.3 *Pseudomonas* fajok általános jellemzői

A GTDB (Genome Taxonomy Database) szerint jelenleg 7 nemzetség tartozik a Pseudomonadaceae családba (*Azomonas*, *Azotobacter*, *Entomomonas*, *Oblitimonas*, *Pseudomonas*, *Thiopseudomonas*, és *Ventosimonas*) (Girard és mtsai., 2021) (https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f__Pseudomonadaceae, accessed on 10 July 2021).

Diverzitását illetően a *Pseudomonas* nemzetség kiemelkedő, hiszen több mint 250 fajjal rendelkezik (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, Girard és mtsai., 2021) (<https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>, accessed on 10 August 2021), a fajok száma folyamatosan növekszik, ugyanis 2020 március és 2021 március között több mint 30 új *Pseudomonas* fajt írtak le (Girard és mtsai., 2021). A környezetben széles körben elterjedtek kiváló alkalmazkodóképességüknek köszönhetően, illetve a fenotípusos tulajdonságok széles skálája miatt, beleértve a másodlagos metabolitokat is, vonzó kutatási fókuszot jelentenek (Saati-Santamaría és mtsai., 2021; Tchagang és mtsai., 2018). A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó fajok nem spóráképző aerob Gram-negatív baktériumok. Morfológiájukat tekintve pálca alakúak, polárisan elhelyezkedő flagellumokkal.



2. ábra *Pseudomonas putida* elektronmikroszkópos képe (Harwood és mtsai., 1989).

A nemzetség jelentősebb csoportjai a *P. fluorescens*, a *P. aeruginosa*, a *P. putida* és a *P. syringae*. A legtöbb faj szaprofita, melyek általában vizekben és talajokban találhatók meg. Egyes fajok, mint például a *P. aeruginosa*, mindenütt jelen vannak, és mind a növényekkel, mind az állatokkal társíthatók. Néhány szaprofita faj érdekes tulajdonságokkal rendelkezik, így olyan biotechnológiai alkalmazásokban használják, mint például a növények növekedésének és egészségének javítása, fejlesztése, de a víz és talaj bioremediációja során is alkalmazhatóak (Höfte és Altier, 2010). A *P. aeruginosa* csoport fajai növények, állatok és emberek kórokozói. Opportunista humán kórokozóként fontos megemlíteni, hogy multirezisztens tulajdonságokkal rendelkeznek. A *P. fluorescens* csoport egyes fajai fitopatogének (Höfte és Altier, 2010).

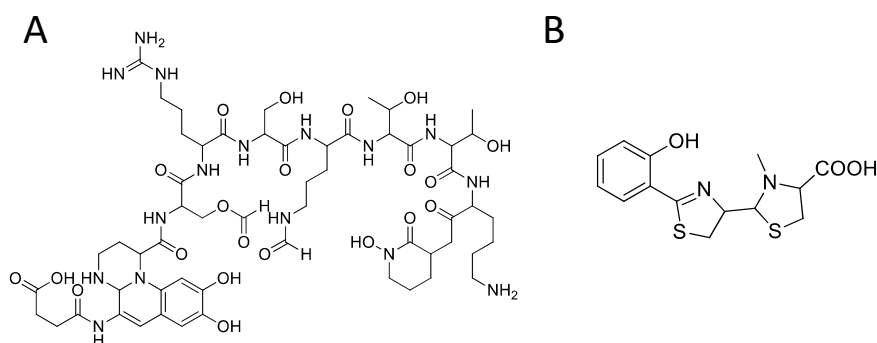
3.4 *Pseudomonas* fajok által termelt bioaktív vegyületek

A *Pseudomonas* nemzetség tagjai kiemelkedő bioaktív tulajdonságokkal rendelkező másodlagos metabolitok termelői, amelyek gyakran támogatják változatos életmódjukat, valamint fontosak a rizoszférában zajló kooperatív és kompetitív kölcsönhatások szempontjából. Ilyen bioaktív vegyületek például a sziderofórok (magas vaskötőképességű anyagok), az antibiotikumok (Tchagang és mtsai., 2018), a hidrogén-cianid, lítikus

exoenzimek (Thomashow és Weller, 1996) a ciklikus lipopeptidek és a homoszerin laktonok (Raaijmakers és mtsai, 2006).

3.4.1 Sziderofórok

A ritka kivételektől eltekintve a vas csak háromértékű formában áll a mikroorganizmusok rendelkezésére. Különböző oxid-hidrátjainak alacsony disszociációs állandója miatt a szabad Fe^{3+} koncentrációja pH=7 mellett legjobb esetben is csak 10^{-17} mol/L lehet, míg az élő sejteknek 10^{-6} mol/L koncentrációra lenne szükségük (Schalk és mtsai., 2020). A talajbaktériumok által termelt sziderofórok, mint komplexképző anyagok képesek a szervesen Fe^{3+} -t hozzáférhetővé tenni (Schalk és mtsai., 2020). A *Pseudomonas* fajok a sziderofórok segítségével könnyebben hozzájutnak a vashoz, ezáltal gátolják a talajban megjelenő egyéb mikroorganizmusok számára a vASFelvételt, de csak bizonyos pH körülmények esetén tudnak érvényesülni (Schalk és mtsai., 2020).



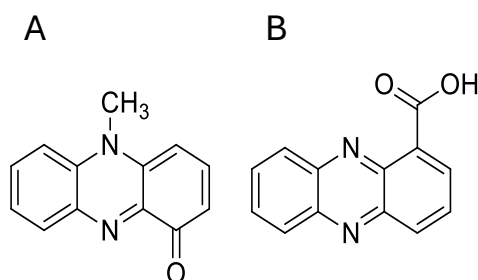
3. ábra Pioverdin (A) és piceilin (B) szerkezeti képlete.

A fluorescens pioverdinek (3.ábra, A) az egyik legfontosabb sziderofórok. A pioverdinek 3 részből tevődnek össze: a kromofór kinolinból, egy peptidláncból és egy dikarbonsavból (Schalk és mtsai., 2020; Kloepper és mtsai., 1980).

A pioverdinen kívül a *Pseudomonas* fajok különféle másodlagos sziderofórokat is termelnek, amelyek a Fe^{3+} -hoz alacsonyabb affinitással kötődnek, mint például a piceilin (PCH), a pszeudomonin, a korrugatinok, az ornikorrugatinok, a yersiniabaktin és a tiokinolobaktin (Haas és mtsai., 2005; Schalk és mtsai., 2020). A PCH (3. ábra, B) bár gyengén kötődik a vashoz, de Cu^{2+} , Zn^{2+} kelátor is, így feltételezhetően réz és cink hiányt is okozhat a kompetitív mikroorganizmusban (Cuppels és mtsai., 1987; Haas és Défago, 2005).

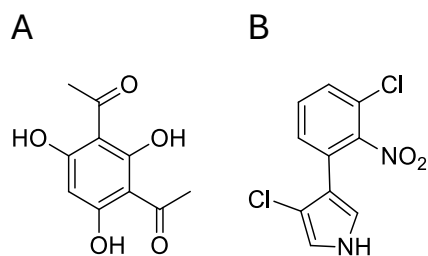
3.4.2 Antibiotikumok

A *Pseudomonas* fajok különféle antibiotikumokat állítanak elő, hogy megvédjék élőhelyeiket a mikrobiális vetélytársakkal szemben. Az antibiotikumok hőskorában körülbelül 50 különböző *Pseudomonas* fajból származó antibiotikumot fedeztek fel, viszont ezek közül csak kettő ipari gyártása valósult meg, a piocianin és a pirrolnitrin. Az *Actinomycetales* és a gombák által termelt antibiotikumok sokféleségéhez képest a *Pseudomonas* fajok által termelt antibiotikumok kémiai szempontból egységesebbek: hidroxifenazinokat, hidroxifenazin-karbonsavakat, N-metil-fenazinokat, pirrolnitrin-típusú antibiotikumokat, piovegyületeket, változatos szerkezetű alkil-kinolinokat, N-hidroxi (di-, trihidroxi) kinolinokat és indolszármazékokat tartalmaznak. Ezek az antibiotikumok az aromás aminosavak bioszintézisének közbelső termékeiből vagy végtermékeiből származnak (Leisinger és mtsai, 1979).



4. ábra Piocianin (A) és fenazin-1-karbonsav (B) szerkezeti képlete.

A *Pseudomonas* nemzetség képviselőinek antimikrobiális hatásait elsősorban a fenazinok termelődésének tulajdonítják. A fenazinok nitrogén-heterociklikus gyűrűket tartalmaznak, illetve élénk színükről is ismertek. A növényi rizoszférában aktívan résztvevő fluoreszkáló *Pseudomonas*-ok csak néhány törzse ismert arról, hogy egyidejűleg több különböző fenazinszármazékot termel (Kumar és mtsai. 2005; Shahid és mtsai., 2021). A piocianin (4. ábra, A), a fenazin-1-karbonsav (PCA) (4. ábra, B), a fenazin-1-karboxamid (PCN), és a 2-hidroxi-fenazin a leggyakrabban előfordulók (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). Érdekes 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).



5. ábra 2,4-diacetil-floroglucinol (A) és pirrolnitrin (B) szerkezeti képlete.

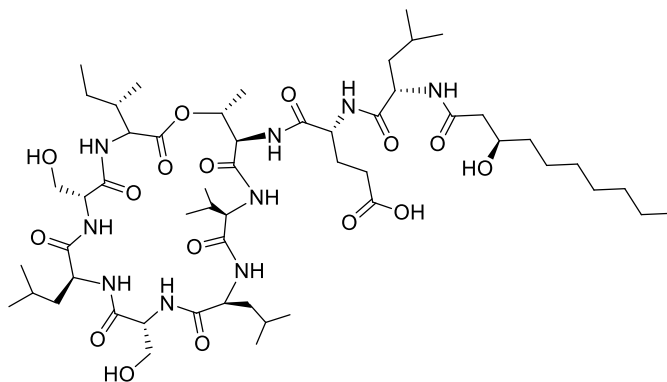
A floroglucinolok a *P. fluorescens* által termelt metabolitok egy fontos csoportja, melyek képesek szisztémás rezisztenciát (ISR) indukálni a növényekben, és a fitoalexinek és más hasonló védelmi molekulák specifikus aktivátoraként szolgálnak (Dwivedi és Johri, 2003, Jayakumar és mtsai., 2011) A legismertebb a floroglucinolok közül a 2,4-diacetil-floroglucinol (DAPG) (5. ábra, A), amely a gombák membránját képes károsítani. A pirrolnitrin (5. ábra, B) 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.

3.4.3 Bioszurfaktánsok

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

3.4.3.1 Ciklikus lipopeptidek

A *Pseudomonas* CLP vegyületek egyik meghatározó tulajdonsága a zsírsavfarok jelenléte (Geudens és Martins, 2018; Raaijmakers és mtsai., 2010), ami egy 7-25 aminosavból álló gyűrűhöz kapcsolódik.

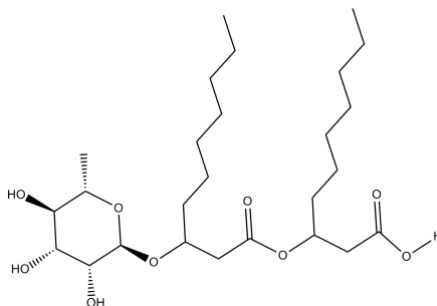


6. ábra A viskocin szerkezeti képlete.

A kémiaiailag hasonló CLP-ket csoportokba sorolták, melyeket egy adott CLP prototípusról neveztek el, ezek a viszkozin (6. ábra) (Groupé et al., 1951), az orfamid (Gross és mtsai., 2007), az amfizin (Sorensen és mtsai., 2001), a sziringomicin (Segre és mtsai., 1989), a sziringopeptin (Ballio és mtsai., 1991) és a tolaasin csoportok (Rainey és mtsai., 1991; Bassarello és mtsai., 2004). A CLP vegyületek gátolják a baktérium növekedését azáltal, hogy befolyásolják a sejtfal bioszintézisét vagy a sejtmembrán integritását (Zhou és mtsai., 2021). Beépülhetnek a plazmamembránba és a mikrodoméneken keresztül megváltoztathatják a membrán fluiditását (Zhou és mtsai., 2021). A plazmamembrán átrendeződésének következtében depolarizációváltozás történhet, ionszivargást vagy ionbeáramlást okozva. Mindkettő sejthalált vagy károsodott proliferációt indukálhat (Zhou és mtsai., 2021).

3.4.3.2 Ramnolipidek

A ramnolipidek (RL), olyan bioszurfaktáns anyagok osztályába tartoznak, amelyek cukorrészként egy vagy két L-ramnózt tartalmaznak 1,3- β -hidroxilezett zsírsavláncokhoz kapcsolódva. A *P. chlororaphis* és a *P. putida* termel ramnolipideket (Soberón-Chávez és mtsai., 2021).

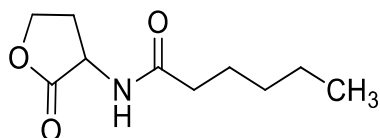


7. ábra Egy monoramnolipid szerkezeti képlete.

3.4.4 Homoszerin–laktonok

A QS egy jól tanulmányozott kommunikációs folyamat, amelyet számos baktérium használ a különböző sejtfunkciók szabályozására (antibiotikumtermelés, biofilmképzés, génexpresszió, felszíni kötődés és virulencia), ugyanis számos biológiai folyamat denzitásfüggő (Li és Nair, 2012, Kerényi Ádám, 2014). A Gram-negatív baktériumok N-acilezett homoszerin laktonokat (AHL) használnak a sejtsűrűség érzékelésére, amely egy homoszerin laktongyűrűből (HSL) és ahhoz kapcsolódó változó hosszúságú (3-18 C-atom) alkil-láncból áll (Li és Nair, 2012).

A homoszerin laktonok nemcsak az oldalláncok hosszában különbözhetnek, hanem telítettségben, valamint a C3 pozícióban lévő oxo, ill. hidroxil-csoportok alapján is változatosságot mutatnak. Az AHL-ok fajspecifikusak. A baktériumok képesek figyelemmel kísérni a sejtsűrűséget az AHL-ok, mint jelzőmolekulák koncentrációjának érzékelésével (Haas és mtsai, 2005).



8. ábra N-hexanoil-homoszerinlakton szerkezeti képlete.

Több bioaktív metabolit szerepét igazolták már különböző mikroorganizmusokkal szemben (1. táblázat).

1. táblázat *Pseudomonas* eredetű biokontroll vegyületek és hatásuk.

Termelő organizmus	Vegyület	Hatás	Célszervezet	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-floroglucinol	biológiai védekezés		Bonaterre és mtsai., 2022
<i>P. chlororaphis</i> PCL 1606	2-hexil-5-propil- rezorcinol	gombaellenes és antibakteriális hatás	<i>Rosellinia</i> . <i>necatrix</i>	Calderón és mtsai. 2013
<i>P. chlororaphis</i> G05	pirrolnitrin	kalászfuzariózis (FHB)	<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, a
<i>Pseudomonas</i> sp.	hidrolitikus enzimek	gombaellenes aktivitás	<i>Pythium</i> <i>aphanidermatum</i> <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	Sindhu és Dadarwal, 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>	masszetolid A	rezisztencia növelés	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	Tran és mtsai., 2007
<i>Pseudomonas</i> sp	fenazinok	ISR		Ma és mtsai., 2016, b

3.5 Metabolomika

Amíg a genomika a gének, a transzkriptomika az mRNS, a proteomika a fehérjék szerkezeti és funkcionális vizsgálatával foglalkozó biológiai tudományterület, a metabolomika a kis molekulatömegű (<2000 Da) bioaktív vegyületeket és azok koncentrációváltozásait tanulmányozza és ezzel közvetlen képet ad az adott organizmusban lejátszódó biokémiai folyamatokról. Az egy organizmusban jelen lévő metabolitok összessége alkotja az úgynevezett metabolomot.

A metabolomikai vizsgálatok az elsődleges és másodlagos metabolitok analízisére irányulnak, melyek kémiai tulajdonságaikat tekintve lehetnek vízben oldódó (poláris), vízben nem oldódó (apoláris) és illékony vegyületek, amelyek egyaránt megtalálhatóak intracellulárisan és extracellulárisan is (Horak és mtsai., 2019). Az elsődleges metabolitok elengedhetetlenek a túléléshez, és olyan fontos sejt folyamatokhoz szükségesek, mint a növekedés, a fejlődés és a szaporodás. Mivel gyorsan cserélődnek, a sejtben általában kis mennyiségben fordulnak elő. Ennek következtében a sejtben belül az elsődleges metabolitok szintje általában alacsonyabb, mint a másodlagos metabolitok szintje (Horak és mtsai., 2019). A másodlagos metabolitok megjelenése a stresszre adott válasszal és a növekedési sebességgel kapcsolatos (Pinu és mtsai. 2017).

Bár az elsődleges és a másodlagos anyagcsere jelentősen különbözik, mégis szorosan kapcsolódnak egymáshoz, ugyanis az elsődleges anyagcsere biztosítja a másodlagos metabolizmushoz az energiát és a prekursor molekulákat (Horak és mtsai., 2019). A mikrobiális másodlagos metabolizmus a bioaktív molekulák gazdag forrása (Barkal és mtsai., 2016).

3.5.1 Metabolomikai vizsgálatok típusai

A metabolomikai vizsgálatok alapvetően két csoportba sorolhatók a vizsgálat céljától függően. A metabolomikai profilvizsgálat (metabolite profiling) egy előre meghatározott metabolitcsoport (pl.: aminosavak), vagy egy meghatározott metabolikus útvonalhoz kapcsolódó metabolitok minőségi és mennyiségi analízise.

A metabolikus ujjlenyomat készítés (metabolite fingerprinting) célja különböző biológiai állapotú vagy eredetű minták különbségeinek feltárása, így nem az összes, hanem csak a megkülönböztető metabolitok meghatározása.

3.5.2 Analitikai módszerek a metabolomikában

A metabolitok fizikai-kémiai sokféleségéből adódóan a jelenleg rendelkezésre álló analitikai mérés technikák egyike sem képes önállóan átfogó képet adni a teljes metabolomról. Különböző analitikai módszerek kombinációjával azonban lehetséges a metabolom teljeskörű elemzése (Jeyarajah és mtsai, 2006, Wishart, 2008).

A metabolomikai vizsgálatokban két spektroszkópai módszer terjedt el, az NMR spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance, Magmágneses Rezonancia) és a gázkromatográfiával vagy folyadékkromatográfiával kombinált tömegspektrometria (Wishart, 2008). A nagyfokú ismételhetőség, a metabolitok könnyű azonosítása és a roncsolásmentes analízis azok a jellemzők, amelyek alkalmassá teszik az NMR spektroszkópiát a metabolomikai vizsgálatokra (Wishart, 2008). A tömegspektrometria viszont kiemelkedő szelektivitásának és érzékenységének köszönhetően terjedt el. Az illékony, illetve származékképzés segítségével illékonná tehető vegyületek gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával vizsgálhatók (Gas-Chromatography - Mass Spectrometry, GC-MS). Ezek elsősorban az elsődleges metabolizmusban részt vevő metabolitok (Gao és Xu, 2015, Peng és mtsai., 2015). A termikusan labilis, de nem illékony vegyületek elemzését teszi lehetővé a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS), ami a leggyakrabban alkalmazott eljárás a metabolomikai vizsgálatokban. A különböző, egymást kiegészítő ionizációs technikák, úgymint az elektroporlasztásos, (Electrospray, ESI), az atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) és az atmoszférikus nyomású fotoionizációs (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI) ionforrások alkalmazásával a metabolitok széles polaritástartományban vizsgálhatók HPLC-MS módszerrel. A vegyületek változatos kémiai tulajdonsága miatt a mintákat pozitív és negatív ionizációs módban is szükséges elemezni a metabolom minél teljesebb lefedéséhez. A metabolomikai profilvizsgálatban elsősorban a hármass kvadrupól tömegspektrométerek használata terjedt el, a metabolikus ujjlenyomat készítéshez viszont elengedhetetlen a nagyfelbontás és nagy tömegpontosság, amit pl. a repülési idő (Time of Flight, TOF), Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia (FT-ICR) és az orbitális ioncsapda (Orbitrap) analizátorokkal ellátott készülékek biztosítanak. Fontos megjegyezni, hogy a különböző ionforrás-kialakításoknak, analizátoroknak köszönhetően a különböző készülékekkel kapott tömegspektrumok eltérnek, így a spektrumegyezésen alapuló metabolitazonosítás nehézkes.

3.5.3 Adatelemzés

A metabolomikai profilvizsgálathoz szükségszerű nagyfelbontású tömegspektrometriás vizsgálatok esetén nagy mennyiségű adat keletkezik. A nyers HPLC-MS adatok kiértékelése és értelmezése egy hosszadalmas, többlépcsős folyamat, amely vagy a műszergyártók által készített, vagy készülékfüggetlen, szabad hozzáférésű programok segítségével végezhető el.

Az adatelemzés első lépése a szűrés, ami eltávolítja a zajt és a szennyeződések. Ezt követően az alapvonal-eltolódást kell korrigálni, mivel a mérés során a retenciós idő növekedésével az alapvonal emelkedése figyelhető meg. A következő lépés a metabolitokat reprezentáló prekursor (elő) ionokhoz és az azonosítást lehetővé tevő fragmentáció (MS/MS mérés) során keletkező ionokhoz rendelhető csúcsok azonosítása. Végül a retenciós idő eltolódásának korrigálása és az ugyanazon metabolithoz tartozó prekursor ionok csoportosítása szükséges annak biztosítására, hogy több minta vizsgálata esetén mindig ugyanazt az iont hasonlítsák össze. Ezután következik a statisztikai elemzés, melynek célja azon metabolitok kimutatása, amelyek intenzitásszintje szignifikánsan változik a különböző biológiai csoportok között (Zhou és mtsai., 2012).

4 CÉLKITŰZÉSEK

Az *A. flavus* a termésminőség romlásával, és a magok aflatoxinnal történő szennyezésével jelentős gazdasági károkat okoz, melynek mérséklésére alternatívát jelenthetnek a *Pseudomonas* fajok által termelt bioaktív vegyületek.

Célunk az volt, hogy azonosítsuk a kutatócsoportunk korábbi kísérletei során *A. flavus* növénypatogén gombával szemben antagonista hatást mutató *Pseudomonas* izolátumok biokontroll hatásában szerepet játszó metabolitokat.

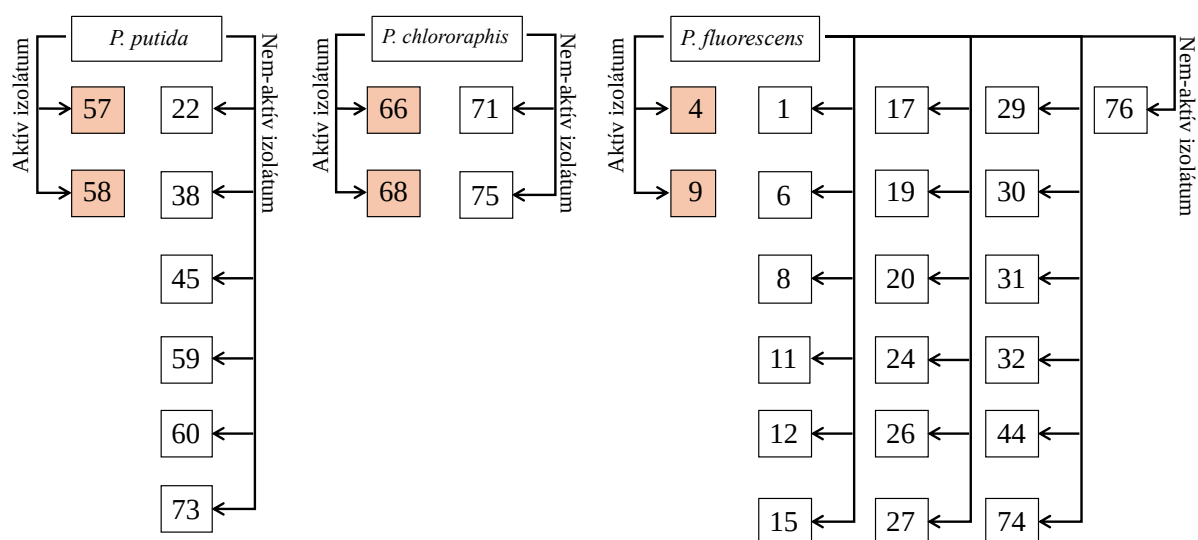
A kitűzött cél eléréséhez a következő feladatok megvalósítását terveztük:

1. Adatbázis létrehozása az irodalomban leírt *Pseudomonas* bioaktív vegyületek alapján.
2. *Pseudomonas* izolátumok metabolitprofiljának meghatározása HPLC-ESI-HRMS módszerrel.
3. A már ismert bioaktív vegyületek azonosítása az adatbázis és a metabolitprofil felhasználásával.
4. A biokontroll hatás szempontjából aktív és nem aktív *Pseudomonas* izolátumok metabolitprofiljának összehasonlításával az eltérő viselkedést esetlegesen okozó metabolitok kiszűrése.

5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Felhasznált törzsek

A metabolomikai vizsgálatokat kutatócsoportunk korábbi kísérletei során *A. flavus* növénypatogén gombával szemben antagonista hatást mutató (aktív) és antagonista hatást nem mutató (nem-aktív) 32 *Pseudomonas* izolátum felhasználásával végeztük. A *Pseudomonas* izolátumokat 3 csoportba soroltuk Girard és munkatársai (2021) munkája nyomán: *P. putida*, *P. chlororaphis* és *P. fluorescens* (9. ábra).



9. ábra Aktív és nem-aktív *Pseudomonas* izolátumok.

5.2 Felhasznált anyagok

5.2.1 Tápoldat

PD (Potato Dextrose), VWR International, USA

5.2.2 Metabolomikai vizsgálatok

A metabolitokat HPLC tisztaságú etil-acetáttal extraháltuk a tápközegből (VWR International, USA). Belső standardként buszpiront és homovaníliásavat alkalmaztunk (Merck). A HPLC-HRMS vizsgálatokhoz LC-MS tisztaságú metanolt, acetonitrilt, vizet és hangyasavat használtunk (VWR International, USA).

5.3 Tenyésztés körülményei

Burgonya-dextróz tápoldatban (24 g/L), 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokban tenyésztjük sötétben, 25°C-os inkubátorban egy éjszakán át 130 rpm fordulatszámon a felszaporított baktériumokat. A tenyészetek OD értékét SPECTROstar Nano spektrofotométerrel (BMG Labtech) 0,6-ra értékre állítottuk be.

5.4 Extrakció

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

5.5 HPLC-HRMS-mérés körülményei

A *Pseudomonas* izolátumok másodlagos metabolitjait Dionex UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific) készülékhez csatlakoztatott Q-Exactive Plus (Thermo Scientific) típusú elektronporlasztásos ionforrással (Heated electrospray ionisation, HESI) ellátott tömegspektrométerrel vizsgáltuk.

A metabolitok elválasztását Gemini NX, 150×2mm, 3µm C18 oszlopon hajtottuk végre, víz +0,1% hangyasav (A) és acetonitril/metanol (1/1, V/V) + 0,1% hangyasav (B) mozgófázisok alkalmazásával 0,2 ml/min áramlási sebességgel. Az oszlop hőmérsékletét 25 °C-ra állítottuk. Az elválasztás gradiens elúcióval történt, ami 5% „B” összetétellel indult, 2 perc izokratikus szakasz után 11 perc alatt az összetételt 95% „B” -re változtattuk, majd 6 perces izokratikus szakasz után fél perc alatt visszaállítottuk a kiindulási összetételt és a rendszert 4,5 percen keresztül hagytuk stabilizálódni. Minden mintából 3 µl térfogatot injektáltunk.

A metabolitokat pozitív és negatív ionizációs módban vizsgáltuk pásztázó-adatfüggő MS/MS módban (fullscan-ddms2). A pásztázó adatgyűjtéshez a 100-1500 m/z tömegtartományt alkalmazzuk 70 000 felbontás, 1×10^6 AGC (Automatic Gain Control), és 100 ms IT (isolation time) mellett. Az adatfüggő MS/MS mérések esetén a felbontás 17 500 volt, a kvadrupól izolációs ablaka 0,4 m/z , a normalizált ütközési energia pedig 35 tetszőleges egység volt.

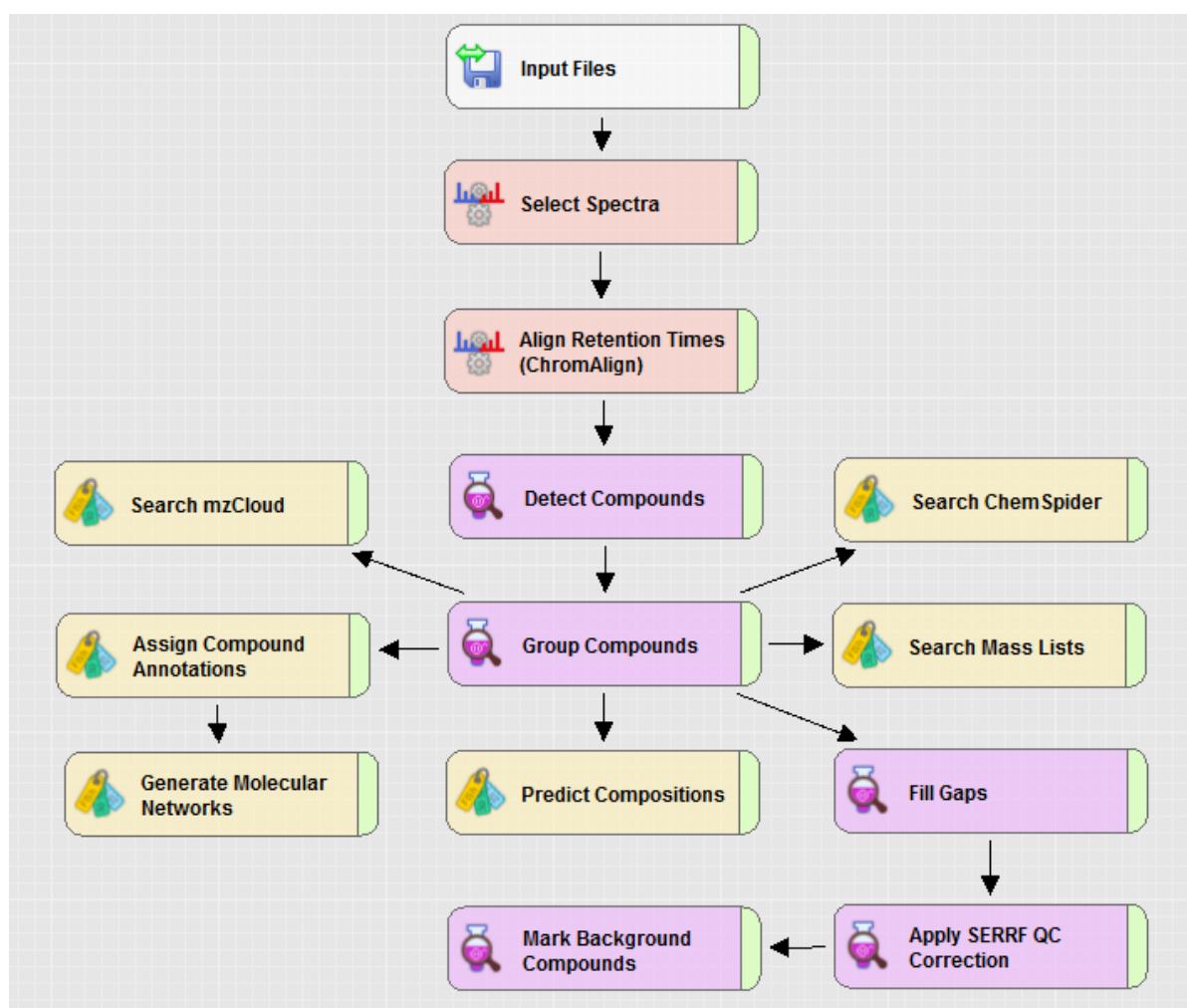
Az aktív izolátumokra jellemző metabolitok kiválasztását követően, azonosításukhoz párhuzamos reakció monitorozás (parallel reaction monitoring, prm) és pásztázó-minden iont fragmentáló, semleges vesztesén alapuló adatfüggő MS/MS (full scan-AIF, NL-ddms2)

módokat alkalmaztunk. Mindkét esetben az MS paraméterek megegyeztek a fullscan-ddms2 módban használt paraméterekkel.

5.6 Alkalmazott szoftverek

Az HPLC-HRMS alapadatok gyűjtéséhez Xcalibur 3.1 (Thermo Scientific) szoftvert használtunk.

A nyers mérési eredményeket a CompoundDiscoverer 3.3 (CD, Thermo Scientific) program segítségével dolgoztuk fel az 10. ábrán látható munkamenet szerint. A főkomponens-analízist (PCA) a CD PCA programcsomagjával hoztuk létre.



10. ábra A metabolomikai elemzés munkafolyamata.

A szimulált fragmentációkat a MassFrontier 8.1 (Thermo Scientific) és az online CFM-ID 3.0 programokkal végeztük el.

A vegyületek szerkezeti képletét a ChemSketch (ACD/Labs) programmal rajzoltuk meg.

A MetaboAnalyst 6.0 (Wishart Research Group) online program segítségével határoztuk meg a szignifikáns metabolitokat. Első lépésként a CD programból az adott feltételek szerint szűrt metabolitokat feltöltöttük 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 hő térképet (Heatmap) a program alapbeállításaival hoztuk létre.

6 EREDMÉNYEK

Nem-célzott metabolomikai vizsgálatok segítségével terveztük azonosítani azokat a vegyületeket, amelyek az előkísérletek során az *A. flavus* gombával szemben antagonista viselkedést mutató *Pseudomonas* izolátumok biokontroll hatását okozhatták.

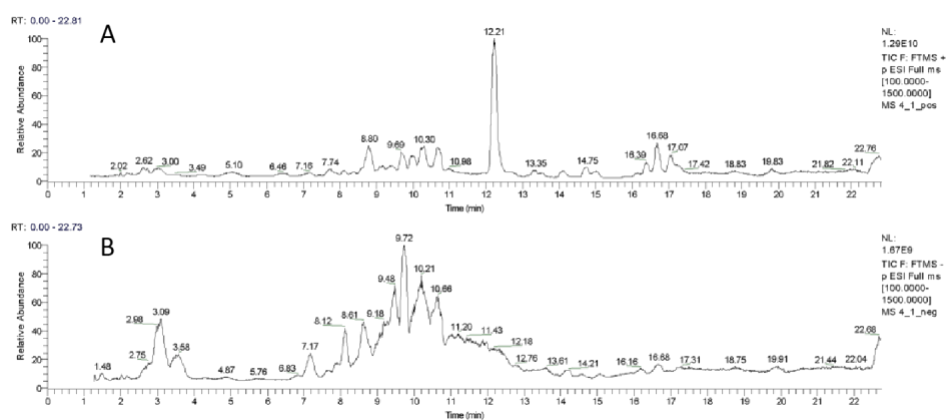
6.1 Adatbázis készítése

A saját *Pseudomonas* adatbázisunk létrehozásához első lépésként összegyűjtöttük azokat a publikációkat, amelyek *Pseudomonas* fajok bioaktív másodlagos metabolitjait írják le. Ezt követően molekularajzoló program segítségével megrajzoltuk a PubChem adatbázisban nem szereplő vegyületek szerkezeti képletét, hogy az összegképletet és a monoizotópos tömeget kiszámíthassuk. A kész (bár a későbbiekben folyamatosan bővítendő) adatbázis 263 darab metabolit nevét, összegképletét és monoizotópos tömegét tartalmazza. A továbbiakban ezt az adatbázist használtuk fel a vizsgált *Pseudomonas* izolátumok bioaktív metabolitjainak azonosításához.

6.2 HPLC-HRMS vizsgálatok

6.2.1 Előszűrés

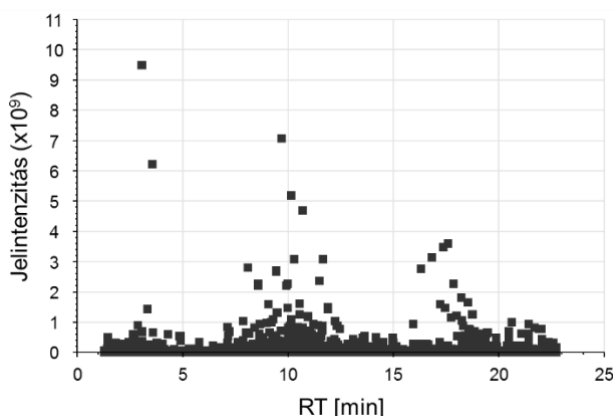
A nem célzott metabolomikai vizsgálatok kivitelezésére HPLC-HRMS módszert választottunk, mivel a bakteriális eredetű másodlagos metabolitok nem illékonyak és származékképzéssel sem tehetők illékonyá. Az irodalmi adatok szerint a *Pseudomonas* metabolitok leginkább poláros vegyületek, ezért elektroporlasztásos ionizációt alkalmaztunk.



11. ábra A 4. izolátum fermentlevének teljes ionkromatogramja pozitív (A) és negatív (B) ionizációs módban.

Egyes vegyületek csak negatív, vagy csak pozitív ionokat képeznek (esetleg mindkettő) HPLC-ESI-MS mérési körülmények között, ezért valamennyi extraktumot pozitív és negatív ionizációs módban is vizsgáltuk. Az 11. ábrán a 4. izolátum fermentlevének pozitív (A) és negatív (B) ionizációs módban mért teljes ionkromatogramja látható.

Ha megvizsgáljuk a komponensek eloszlását a futtatás teljes időtartama alatt (12. ábra) megállapíthatjuk, hogy a komponensek eloszlása egyenletesnek tekinthető.



12. ábra A komponensek eloszlása a futtatás teljes időtartama alatt.

Baktériumok és gombák nem-célzott metabolomikai vizsgálatai során több 1000 komponens megjelenése várható, melyek alapvonalig történő elválasztása az általánosan használt kromatográfiás oszlopokon 15-30 perc időtartam alatt lehetetlen. Az egy időpontban eluálódó és együtt ionizálódó komponensek befolyásolják egymás ionizációját és így detektálásukat is. Az egyenletes eloszlással minimalizáljuk annak a veszélyét, hogy komponenseket veszítsünk. Megállapíthatjuk tehát, hogy az alkalmazott gradiens módszer megfelelő rendszereink vizsgálatára. A HPLC-MS alapú metabolomikában a vegyületek tömegspektrometriás detektálásához ionokat kell létrehozni. Egy metabolit akár több molekulaiont is képezhet az alkalmazott elválasztási körülményektől függően. Metabolomikai vizsgálatainkhoz víz-, metanol-, acetonitril- és hangyasav tartalmú mozgó fázisokat alkalmaztunk, melyek jelenlétében többféle molekulaion is képződött. Az Orbitrap analizátor által biztosított felbontás és pontos tömegnek köszönhetően a CD program segítségével az alábbiakban felsorolt molekulaionokat/ adduktokat (features) azonosítottunk. Pozitív ionizációs módban: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+K]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M+ACN+Na]^+$, $[M+ACN+H]^+$, negatív ionizációs módban pedig: $[M-H]^-$, $[M-H-H_2O]^-$, $[M+FA-H]^-$, $[2M-H]^-$, $[2M+FA-H]^-$, $[M-2H+Na]^-$. A Na^+ és K^+ ionok az üvegeszőzökből és oldószerekből származnak.

A nyers mérési eredményeket CD program segítségével dolgoztuk fel (10. ábra). A program a kromatogramok alapvonal-eltolódásának korrigálása után elvégezte az ionok annotációját az általunk előre megadott ionlista alapján, majd csoportosította a vegyületeket a legjellemzőbb ionok figyelembevételével (pozitív ionizációs módban a $[M+H]^+$, negatív ionizációs módban pedig $[M-H]^-$), majd meghatározta a vegyületek összetételét és spektrumkönyvtárak, adatbázisok segítségével azonosította őket. A metabolitok azonosításához az mzCloud spektrumkönyvtárat, és a ChemSpider, EFS HRAM, Extractables and Leachables HRAM, Natural Products Atlas 2021, Endogenous Metabolites, online adatbázisokat, valamint az általunk összeállított *Pseudomonas* bioaktív vegyületeket tartalmazó adatbázist használtuk fel.

2. táblázat Aktív metabolitok szűrése.

		Pozitív ionizáció	Negatív ionizáció	
Compound Discoverer	Összes elkülönített metabolit	21028	17379	
	Izotópeloszlással rendelkezik	16746	14547	
	Van MS2 spektruma	11333	10113	
	Küszöbérték feletti csúcsterülete	9874*	8400**	
MetaboAnalyst	Szignifikáns metabolitok	4900	4593	P.p. ⁺
		1638	412	P.c. ⁺⁺
		7395	7319	P.f. ⁺⁺⁺

*A küszöbérték: $4 \cdot 10^6$ csúcsterület.

**A küszöbérték: $3 \cdot 10^6$ csúcsterület.

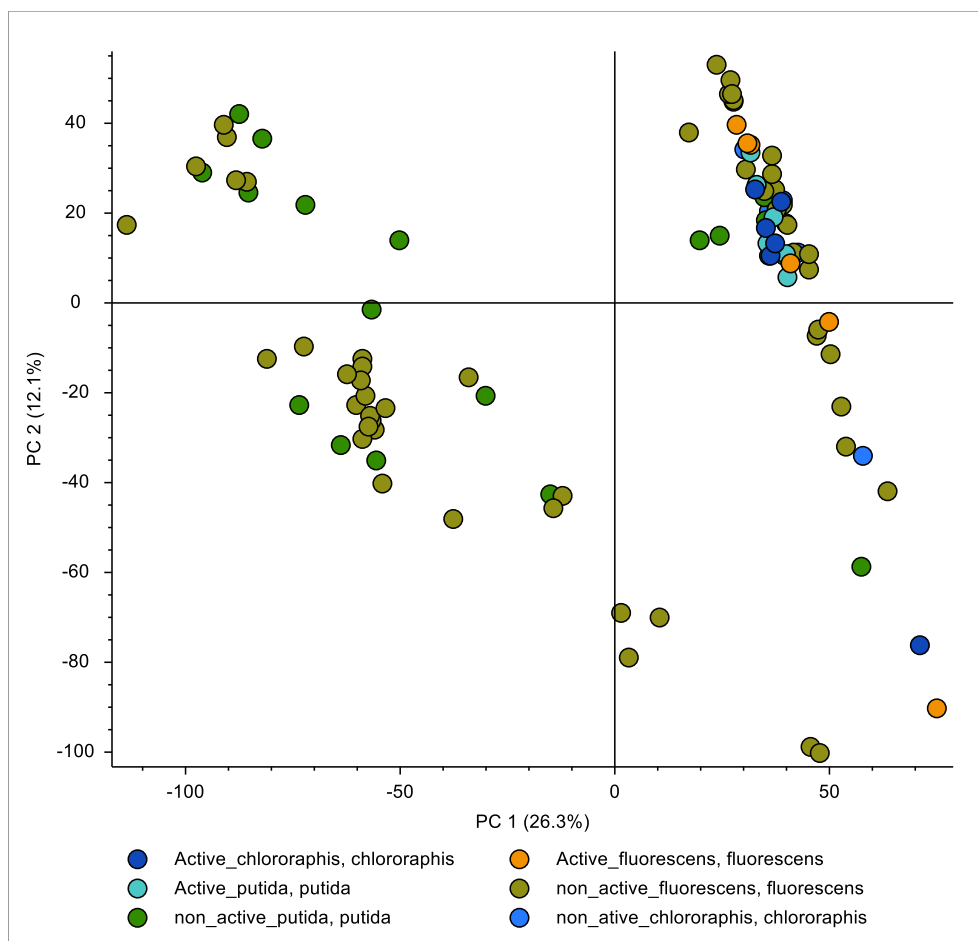
⁺*P. putida*

⁺⁺*P. chlororaphis*

⁺⁺⁺*P. fluorescens*

A program pozitív ionizációs módban 21028, negatív ionizációs módban 17379 db vegyületet különített el (2. táblázat). Ahhoz, hogy megtaláljuk az aktív vegyületeket, különböző szempontok szerint szűkítettük a találatok számát. Első lépésként csak azokat a vegyületeket vettük figyelembe, amelyek izotópeloszlással rendelkeztek, mivel a program által meghatározott összegképlet csak ebben az esetben tekinthető megbízhatónak (2. táblázat). A vegyületek azonosításához elengedhetetlen, hogy MS/MS spektrumuk (fragmentációs mintázatuk) megegyezzen az online spektrumkönyvtárakban, publikációkban megtalálható MS/MS spektrumokkal, illetve azokkal a fragmensekkel, melyeket különböző online programok becsülnek meg a fragmentációs szabályok felhasználásával. Tehát a vegyületek körét szűkítettük azokra a metabolitokra, melyekről MS/MS spektrumok készültek a vizsgálatok során (2. táblázat). A nem megfelelő intenzitású csúcsok kiszűréséhez a kromatogramok tanulmányozásával meghatároztunk egy küszöbértéket, és csak a küszöbérték feletti területű csúcsokat vettük figyelembe (2. táblázat).

A CD program segítségével a teljes metabolitprofil figyelembe véve főkomponens-analízist végeztünk el. A 13. ábra alapján megállapítható, hogy nem különíthetők el egymástól az aktív és nem aktív izolátumok, továbbá a *P. putida*, a *P. chlororaphis* és a *P. fluorescens* csoportok sem szeparálódnak.



13. ábra Főkomponens-analízis (PCA) a teljes metabolitprofil alapján.

6.2.2 Ismert *Pseudomonas* metabolitok azonosítása

Az irodalomban leírt *Pseudomonas*ok fajokra jellemző vegyületekből készített adatbázis alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy az izolátumok termelik-e ezeket az ismert vegyületeket. Mivel az azonosításkor a többi adatbázist is figyelembe vettük, találtunk olyan vegyületeket, amelyek a *Pseudomonas* fajokra jellemző metabolitokhoz hasonló szerkezetűek. Irodalmi adatokra támaszkodva megvizsgáltuk, hogy rendelkeznek-e bioaktív tulajdonságokkal. A vegyületek azonosításához a pontos tömeg (és az az alapján számított összegképlet) kívül felhasználtuk az irodalomban publikált fragmentációs mintázatokat (MS/MS spektrumok), vagy ha ez nem állt rendelkezésünkre, akkor a MassFontier programmal szimulált frgmentéseket. Egy metabolitot akkor tekintettünk azonosítottnak, ha a pontos tömege,

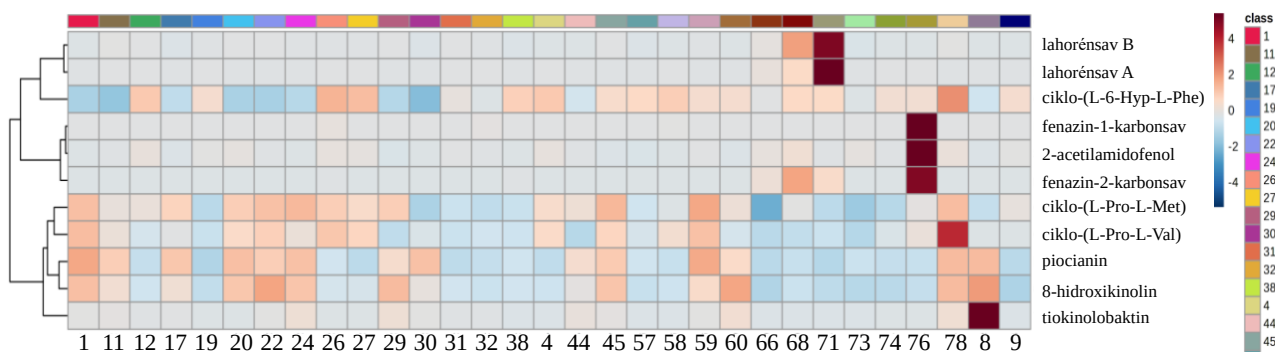
összegképlete és fragmentációs mintázata, illetve az elméletileg számított fragmensek pontos tömege megegyezett az irodalmi, vagy szimulált értékekkel. A 3. táblázatban összefoglalt 19 ismert bioaktív *Pseudomonas* metabolitot tudtuk azonosítani az izolátumok fermentlevéből.

3. táblázat *Pseudomonas* adatbázis alapján azonosított bioaktív metabolitok.

Bioaktivitás	Metabolit	Összegképlet	RT (min)	Detektált ion <i>m/z</i>
Biokontroll	2-acetamidofenol	C ₈ H ₉ NO ₂	9,39	152,0711
	piocianin	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O	14,47	211,0867
	fenazin-2-karbonsav	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂	13,34	225,0659
	fenazin-1-karbonsav	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂	12,60	225,0659
	ciklo-(L-Pro-L-Met)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	9,35	229,1007
	ciklo-(L-Phe-L-Val)	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	10,79	247,1443
	ciklo-(L-6-Hyp-L-Phe)	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	9,72	261,1234
	lahorénsav C	C ₁₆ H ₂₀ O ₂	14,12	245,1537
	lahorénsav B	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	14,19	275,1642
Sziderofór	8-hidroxikinolin	C ₉ H ₇ NO	8,45	146,0606
	tiokinolobaktin	C ₁₁ H ₉ NO ₃ S	11,24	236,0378
Homoszerin-lakton származék (QS)	N-butiril-L-homoszerin lakton	C ₈ H ₁₃ NO ₃	7,49	172,0972
	N-dekanoil-L-homoszerin lakton	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	14,98	256,1907
	N-(3-oxodekanoil) -L-homoszerin lakton	C ₁₄ H ₂₃ NO ₄	13,80	270,1701
	N-(3-hidroxidekanoil) -DL-homoszerin lakton	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄	13,60	272,1857
	N-(3-hidroxidodekanoil) -homoszerin lakton	C ₁₆ H ₂₉ NO ₄	15,09	300,2182
QS	2-aminoacetofenon	C ₈ H ₉ NO	8,70	136,0758
Ciklikus lipopeptid	masszetolid H/B	C ₅₆ H ₉₉ N ₉ O ₁₆	18,556	1154,7287
	viszkozoin/ masszetolid F	C ₅₄ H ₉₅ N ₉ O ₁₆	17,769	1126,6972

Az azonosított vegyületek fele biokontroll hatású vegyület. A legismertebb fenazin-1-karbonsav és piocianin mellett a kevésbé ismert lahorénsavat, 2-acetamidofenolt és a különböző összetételű dipeptideket termelték az izolátumok. Két sziderofórt detektáltunk, a tiokinolobaktint és a 8-hidroxikinolint. A metabolitok közel fele homoszerin lakton származék, illetve a 2-aminoacetofenon egy QS molekula. Az irodalmi adatok szerint a táblázatban bemutatott biokontroll hatású vegyületeket a *P. chlororaphis* és a *P. fluorescens* törzsek termelik (Shahid és mtsai, 2021), a mi esetünkben is az ezekbe a csoportokba

sorolható izolátumok termelték. Megfigyeléseink szerint azonban a *P. putida* csoportba tartozó törzsek is képesek előállítani a piocianint. Továbbá detektáltunk kis mennyiségben fenazin-2-karbonsavat, melynek biokontroll hatásáról és *Pseudomonas* általi termelődéséről nem találtunk információt. Eredményeinkkel összhangban, a táblázatban szereplő sziderofórok termelődését *P. fluorescens* törzsek esetében írták le (3. táblázat) (Szasz et al., 2019), ugyanakkor vizsgálataink szerint mind a három *Pseudomonas* csoport (*P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*) termelte. A detektált homoszerin laktonok nem a QS folyamatokért felelős acil-homoszerin laktonok családjába/csoportjába tartoznak. Az oxo- és hidroxihomoszerin laktonokat *P. chlororaphis* törzsekre jellemzően írták el (Shahid et al., 2021), azonban mi a *P. putida* csoportba tartozó izolátumainkban is detektáltuk. A 2-aminoacetofenont mind a három csoportban detektáltuk, bár irodalmi adatok szerint jellemzően a *P. chlororaphis* és a *P. aeruginosa* termeli.



14. ábra Biokontroll-hatású, ismert *Pseudomonas* metabolitok előfordulása a vizsgált izolátumokban.

A 14. ábrán mutatjuk be az azonosított bioaktív vegyületek közül a biokontroll-hatású metabolitok előfordulását az izolátumokban. Megállapítható, hogy nincs olyan metabolit, amelyet csak az aktív izolátumok (4, 57, 58, 66, 68, 9) termeltek, tehát az *A. flavus* növénypatogén gombával szemben tapasztalt antagonista hatás nem magyarázható ezekkel a vegyületekkel.

6.2.3 Aktivitáshoz hozzájáruló metabolitok

A CD program által elkülönített, küszöbérték feletti csúcsterülettel rendelkező vegyületeket (2. táblázat) fajonként (*P. putida*, *P. chlororaphis* és *P. fluorescens* (Girard et al., 2021)), szignifikanciavizsgálatnak vetettük alá a MetaboAnalyst online szoftver segítségével. A további számításoknál csak a szignifikáns metabolitokat vettük alapul. A biokontroll hatásban szerepet játszó metabolitok kiszűréséhez egy adott csoporton belül a

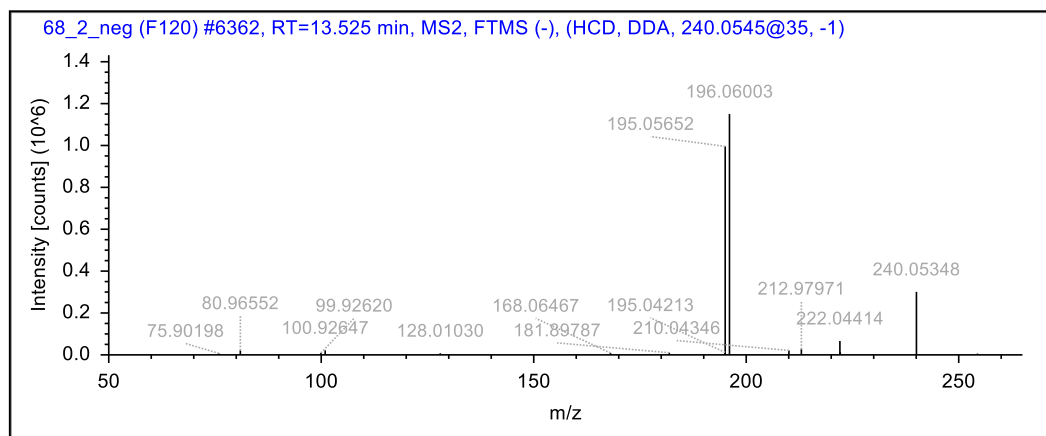
biokontroll szempontból aktív és nem aktív izolátumokkal (9. ábra) valamennyi vegyületből aránypárokat hoztunk létre, majd kiválasztottuk azokat a vegyületeket, amelyek legalább tízszeres mennyiségben fordultak elő a csoportra jellemző valamennyi aktív izolátumban. Ezt követően leellenőriztük, hogy ezek a metabolitok nagy mennyiségben termelődtek-e a másik két csoport nem-aktív izolátumaiban. Pozitív és negatív ionizációs módban összesen 7 olyan metabolitot találtunk, amelyek csak az aktív izolátumokban termelődtek (4. táblázat). Érdeemes megjegyezni, hogy mind a 7 vegyület nitrogéntartalmú, ami jellemző a *Pseudomonas* bioaktív vegyületekre. A *P. putida* csoportban 3, kizárólag pozitív ionizációs módban detektált vegyületet találtunk. Ugyanennyi, de elsősorban negatív ionizációs módban detektálható vegyület keletkezett az aktív *P. chlororaphis* izolátumokban. A *P. fluorescens* izolátumokban kizárólag pozitív ionizációs módban találtunk egy, az aktív izolátumokra jellemző vegyületet.

4. táblázat Kizárólag az aktív izolátumok által termelt metabolitok

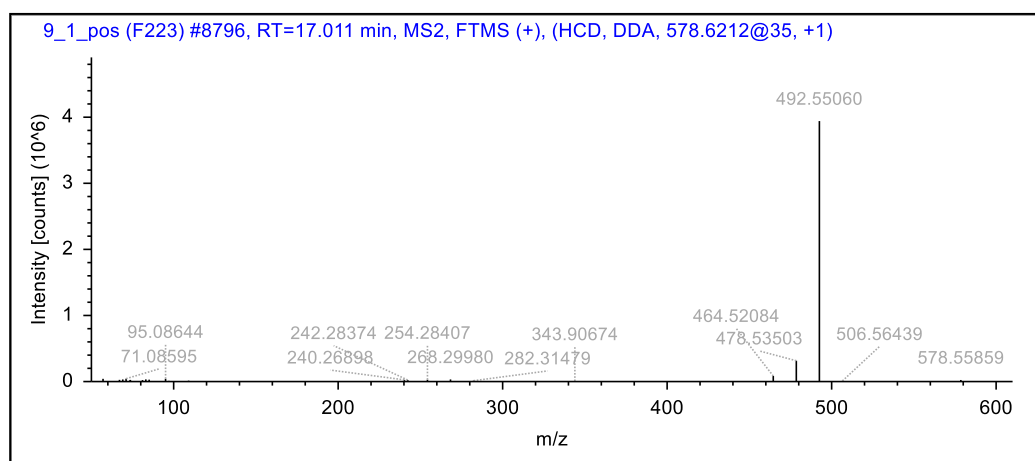
<i>Pseudomonas</i> csoport	Ionizációs mód	Molekula pontos tömege (g)	Összegképlet	Retenciós idő (min)
<i>P. putida</i>	+	293,2731	C ₁₉ H ₃₅ NO	17,648
		331,2529	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂ S	17,151
		343,2891	C ₂₃ H ₃₇ NO	19,012
<i>P. chlororaphis</i>	-	241,0618	C ₇ H ₁₅ NO ₆ S	13,549
		428,2049	C ₂₂ H ₂₈ N ₄ O ₅	14,240
	+	1153,6844	C ₅₅ H ₉₅ N ₉ O ₁₇	17,705
<i>P. fluorescens</i>	+	577,6137	C ₃₉ H ₇₉ NO	17,111

Egyik vegyület sem mutatott egyezést az általunk összeállított, *Pseudomonas* fajokra jellemző metabolitokat tartalmazó adatbázisban található vegyületekkel. Azonban két metabolit pontos tömege megegyezett az alkalmazott adatbázisokban szereplő két vegyület pontos tömegével. Ezek alapján első lépésként megvizsgáltuk, hogy a 293,2731 pontos tömeggel jellemezhető metabolit lehet-e a ChemSpider adatbázis szerinti 4-[(1S)-1-Ciklohexil-2-(2-piperidinil)etil]ciklohexanol, illetve a 428,2049 tömegű pedig a Natural Product Atlas szerinti cianociklin C. Egyik vegyületről sem található a publikációkban MS/MS spektrum, így a CFM-ID online program segítségével szimuláltuk a fragmentációt. A szimulált fragmensek (és így az MS/MS spektrumok) nem egyeztek az általunk tapasztaltakkal, tehát a metabolitok nem az adatbázisok által javasolt vegyületek.

A 241,0618 és az 577,6137 pontos tömegű vegyületekről nem található az online adatbázisokban adat és sem az összetételük, sem a fragmentációs mintázatuk alapján nem tudjuk azonosítani őket (15. ábra, 16. ábra).

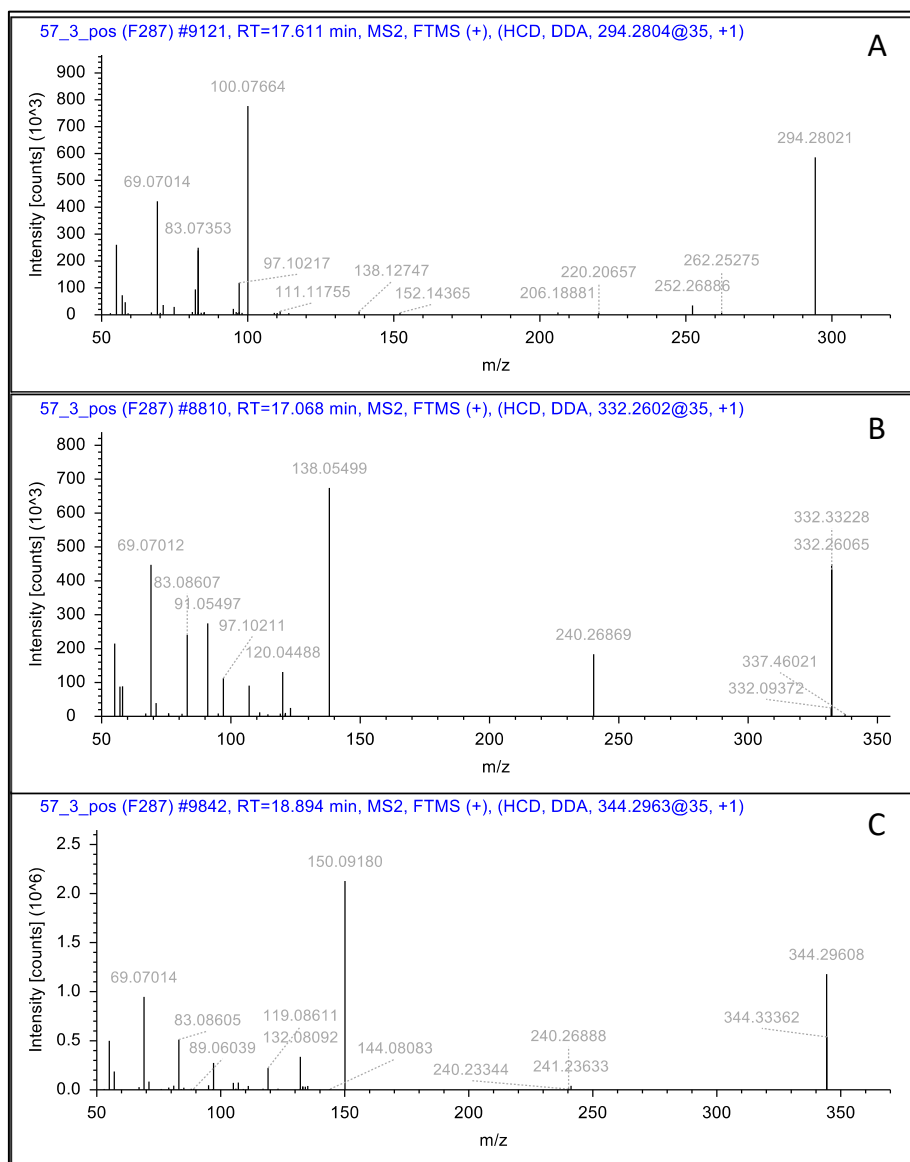


15. ábra A 241,0618 pontos tömegű vegyületek MS/MS spektruma.



16. ábra A 577,6137 pontos tömegű vegyületek MS/MS spektruma.

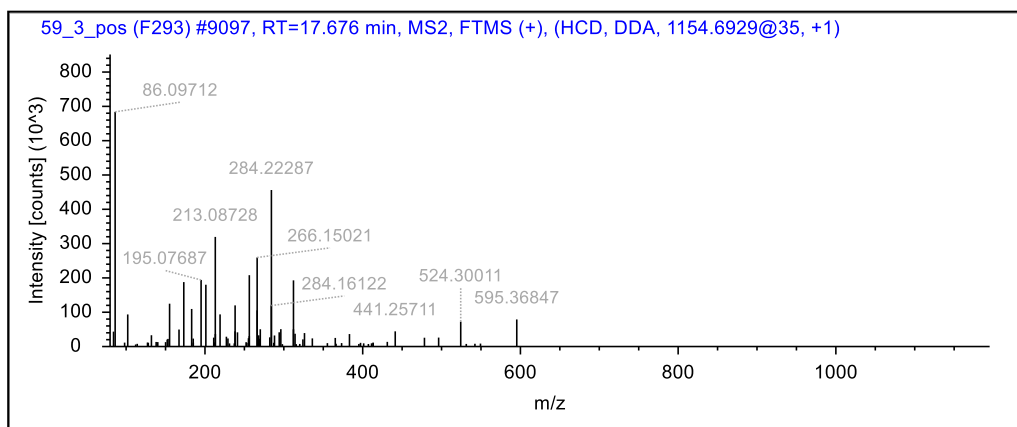
A 331,2529; a 343,2891 és a 293,2731 pontos tömegű metabolitok MS/MS spektrumát megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy ezek a metabolitok ugyanazt a molekula részletet tartalmazzák, ami a tömegspektrumokon a 194,205 semleges veszteséssel jellemezhető. Ez a tömeg a $C_{14}H_{26}$ összetételnek felel meg, ami egy telítetlen alkénlánc. Fragmensei (m/z 67,0546; 69,0701; 83,0861; 97,1021) valamennyi metabolit MS/MS spektrumának kis tömegű tartományában megjelennek. A visszamaradt molekula részletek (m/z 138,0550; 150,0918; 100,0766) tartalmaznak egy hidroxilcsoportot (15. ábra) is.



17. ábra A 293.2731 (A); a 331.2529 (B) és a 343.2891 (C) pontos tömegű vegyületek MS/MS spektruma.

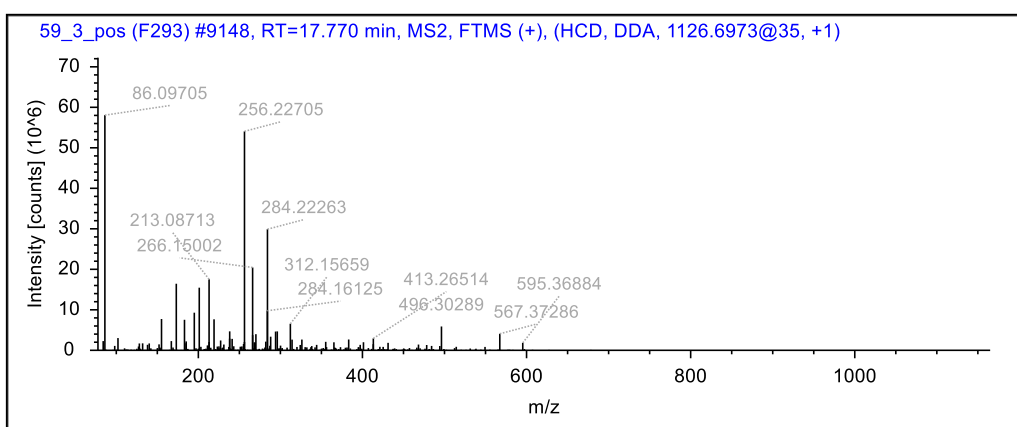
Feltételezzük, hogy ez a három vegyület szerkezetileg rokon vegyület. Felmerül a kérdés, vajon nem termelnek-e több, hasonló szerkezetű vegyületet az aktív izolátumok. Ennek eldöntése érdekében az extraktumokat újra analizáltuk, de csak a 194,205 tömegű semleges vesztéssel jellemzhető vegyületeket kerestük. Azt tapasztaltuk, hogy az aktív izolátumok extraktumai több, hasonló szerkezetű vegyületet tartalmaznak (336,2543; 338,1698; 343,2671; 348,2750), melyek valamennyien a kromatogramok 17 - 19 perces szakaszában jelennek meg.

Az 1153,6844 pontos tömegű vegyület nagy tömegéből és fragmentációs mintázatából következően feltételezzük, hogy ciklikus lipopeptid (bioszurfaktáns) (18. ábra).



18. ábra m/z 1153.6851 vegyület MS/MS spektruma.

A metabolit protonált molekulaionjának fragmensei (18. ábra) az irodalomban leírt és az általunk is detektált masszetolid vegyületekre (masszetolid H/B 18. ábra, viszkozin (19. ábra)) jellemzőek (m/z 284,22; 266,15), azonban a CD program által meghatározott összetétele eltér a masszetolidokra jellemző összetételtől (N_9O_{16} helyett N_9O_{17}).



19. ábra m/z 1125.6899 vegyület MS/MS spektruma.

Ciurko és mtsai munkája alapján, melyben a viszkozin (masszetolid F) Na^+ -adduktjának fragmentációs mintázata és az egyes fragmensek összetétele megtalálható, tervezzük ennek a masszetolid származéknak az azonosítását. Az azonosítást segíti, hogy az izolátumok tartalmaztak egy másik masszetolid származékot (masszetolid H/B) is. Az azonosítás első lépéseként a ciklikus lipopeptideket nagy mennyiségben tartalmazó extraktumokat újraanalizáltuk, de az eddig alkalmazott módszertől eltérően kizárólag a masszetolidok protonált molekulainojait és Na^+ -adduktjait fragmentáltuk. Az MS/MS spektrumok értékelése folyamatban van.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatócsoportunkban kukorica rizoszférából izolált *Pseudomonas* törzsek antagonista hatását vizsgálták a mezőgazdaságban világszerte hatalmas károkat okozó, karcinogén mikotoxinokat termelő *A. flavus* növénypatogén gombával szemben. Az 50 vizsgált izolátumból *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* csoporthoz tartozó 6 törzs gátolta a gomba növekedését és toxintermelő képességét.

Célunk az volt, hogy metabolomikai vizsgálatokkal azonosítsuk az antagonista hatásért felelős metabolitokat.

Az izolátumok PDB tenyészetből etil-acetáttal extrahált metabolitjait HPLC-ESI-HRMS módszerrel pozitív és negatív ionizációs módban analizáltuk. A nyers adatokat Compound Discoverer program segítségével dolgoztuk fel, majd a program által elkülönített nagyszámú vegyületet megfelelő szempontok szerint szűrtük. Megállapítottuk, hogy a teljes metabolitprofil alapul véve nem különíthetők el egymástól a biokontroll szempontból aktív és nem aktív izolátumok, továbbá a *P. putida*, a *P. chlororaphis* és a *P. fluorescens* csoportok sem szeparálódtak.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az izolátumok termelik-e az irodalomban leírt *Pseudomonas* fajokra jellemző bioaktív vegyületeket. A metabolitok pontos tömegét és MS/MS spektrumát figyelembe véve biokontroll (9 db), sziderofór (2 db), ciklikus lipopeptid (2 db), quorum sensing (1 db) és azzal rokon szerkezetű (5 db) vegyületeket azonosítottunk (4. táblázat). Ezen vegyületek bizonyos részét azok a *Pseudomonas* fajokhoz tartozó izolátumok termelték, melyeket az irodalomban is leírtak. Detektáltunk olyan metabolitokat is, melyről nem találtunk *Pseudomonas* fajokhoz köthető információkat, de szerkezetük rokonságot mutatott egyes bioaktív vegyületekkel. Nem azonosítottunk olyan biokontroll hatású, ismert *Pseudomonas* metabolitot, amelyet csak az aktív izolátumok (57, 58, 66, 68, 4, 9) termeltek, tehát eredményeink szerint az *A. flavus* növénypatogén gombával szemben tapasztalt antagonista hatás nem magyarázható ezekkel a vegyületekkel.

A biokontroll hatásban szerepet játszó metabolitok kiszűréséhez, adott feltételek mellett megvizsgáltuk mind a három csoporton (*P. putida*, *P. chlororaphis* és *P. fluorescens*) belül az egyes vegyületek előfordulását az aktív és a nem aktív izolátumokban. Hét olyan metabolitot találtunk, amelyeket csak az aktív izolátumok termeltek. A metabolitok azonosításához a rendelkezésünkre álló pontos tömeg, az MS/MS spektrumok és a különböző adatbázisok nem voltak elegendőek. Fontos kiemelni, hogy a *P. putida* izolátumoknál találtunk olyan vegyületeket, melyek fragmentációs mintázata alapján kijelenthető, hogy tartalmazzak

hasonló molekuláriszövetet, ami valószínűleg egy telítetlen alkén lánc. Pontos tömege (és az ez alapján számított összegképlete) és fragmentációs mintázata alapján az egyik metabolitról megállapítottuk, hogy bioszurfaktáns, egy masszetolid származék. Azonosítása a fragmentációs mintázat alapján folyamatban van. Érdekes megjegyezni, hogy mind a 7 metabolit tartalmaz nitrogénatomot, ami jellemző a *Pseudomonas* bioaktív vegyületekre. Összegzésként megállapíthatjuk, hogy bár az adatbázisok segítségével találtunk olyan metabolitokat, amelyek ismert biokontroll-hatású *Pseudomonas* vegyületek, az izolátumok *A. flavus* növénypatogén gombával szemben tapasztalt antagonista hatása nem magyarázható ezek jelenlétével. Azonban detektáltunk 7, kizárólag az aktív izolátumokra jellemző metabolitot, mely közül egyet sikerült részlegesen azonosítani.

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékén készíthessem el a TDK dolgozatomat.

Köszönetemet szeretném kifejezni a témavezetőmnek Dr. Varga Mónikának, amiért szakmai tapasztalataival, tanácsaival és kiemelkedő lelkiismerettséggel mind elméleti és mind gyakorlati úton segítette a dolgozatom elkészítését.

Végül Papp Dórának is szeretném megköszönni, hogy minden segítséget megadott a munkám sikeres elvégzéséhez.

- Agustí, L., Bonaterra, A., Moragrega, C., Camps, J., Montesinos, E. (2011). Biocontrol of root rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum* with a combination of two *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Pathol.*, 93, 363–372.
- Ballio, A., Barsyngaera, D., Bossa, F., Collina, A., Grgurina, I., Marino, G., és mtsai. (1991). Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett.*, 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. (2016). Microbial metabolomics in open microscale platforms. *Nat. Commun.*, 7, 10610.
- Bassarello, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., Riccio, R., és mtsai. (2004) Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J. Nat. Prod.*, 67(5), 811–6.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., Smalla, K. (2014) Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives, *Front Microbiol.*, 5, 148.
- Bonaterra, A.; Badosa, E.; Daranas, N.; Francés, J.; Roselló, G.; Montesinos, E. (2022) Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10, 1759.
- Calderón, C. E., Pérez-García, A., de Vicente, A., Cazorla, F. M. (2013). 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.* MPMI, 26(5), 554–565.
- Ciurko, D., Chebbi, A., Kruszelnicki, M., Czapor-Irzabek, H., Urbanek, A., Polowczyk, I., Franzetti, A., Janek, T. (2023). Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from a new strain of *Pseudomonas antarctica* 28E using crude glycerol as a carbon source. *RSC Advances*. 13. 24129–24139.
- Cuppels, D. A., Stipanovic, R. D., Stoessl, A. Stothers, J. B. (1987). The constitution and properties of a pyochelin-zinc complex. *Can. J. Chem.*, 65, 2126–2130.
- Dwivedi, D., Johri, B.N. (2003). Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Curr. Sci.*, 85, 1693–1703.
- Gao, P., Xu, G. (2015). Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: recent developments and applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(3), 669–680.
- Geudens, N., Martins, J. C. (2018). Cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp. - Biological swiss-army knives. *Front Microbiol.*, 9, 1867.
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., De Mot, R. (2021). The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. *Microorganisms*, 9(8), 1766.
- Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., Gerwick, W. H. (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem. Biol.*, 14(1), 53–63.
- Groupé, V., Pugh, L. H., Weiss, D., and Kochi, M. (1951). Observations on antiviral activity of viscosin. *Exp. Biol. Med.*, 78(1), 354–358.
- Haas, D., Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 307–319.
- Harwood, C. S., Fosnaugh, K., Dispensa, M. (1989). Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *J. Bacteriol.*, 171(7), 4063–4066.
- Horak, I., Engelbrecht, G., van Rensburg, P.J.J., Claassens, S. (2019). Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *J. Appl. Microbiol.*, 127(2), 326–342.

- Höfte, M., Altier, N. (2010). Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.*, 161(6), 464-471.
- Hu, W., Gao, Q., Hamada, M. S., Dawood, D. H., Zheng, J., Chen, Y., Ma, Z. (2014). Potential of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pcho10 as a Biocontrol Agent Against *Fusarium graminearum*, *Phytopathology*, 104(12), 1289–1297.
- Huang, R., Feng, Z., Chi, X., Sun, X., Lu, Y., Zhang, B., Lu, R., Luo, W., Wang, Y., Miao, J., Ge, Y. (2018). Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum*, *Microbiol Res.*, 215, 55–64.
- Jayakumar, P. Rahul, G.R. Kennedy, R. Subashri, R. Sakthivel, N. (2011). Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *J. Biol. Control*. 25. 165-181.
- Jeyarajah, E. J., Cromwell, W. C., Otvos, J. D. (2006). Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin. Lab. Med.*, 26(4), 847–870.
- Kerényi Ádám. (2014) A bakteriális kommunikáció vizsgálata ágens alapú modellel, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék, Ph.D. értekezés.
- Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 286, 885-886.
- Kumar, R. S., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A. V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O., Sakthivel, N. (2005). Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J. Appl. Microbiol.*, 98(1), 145–154.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective, *Microorganisms*, 10(3), 596.
- Lakkis, S., Trotel-Aziz, P., Rabenoelina, F., Schwarzenberg, A., Nguema-Ona, E., Clément, C., Aziz, A. (2019). 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.*, 10, 1112.
- Leisinger, T., Margraff, R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.*, 43(3), 422–442.
- Li, Z., & Nair, S. K. (2012). Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein. Sci.*, 21(10), 1403–1417.
- Ma, Z., Geudens, N., Kieu, N. P., Sinnave, D., Ongena, M., Martins, J. C., Höfte, M. (2016) a. Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species, *Front. Microbiol.*, 7, 382.
- Ma, Z., Hua, G. K. H., Ongena, M., Höfte, M. (2016) b Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean, *Environ. Microbiol. Rep.*, 8(5), 896–904.
- 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. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria, *Science*, 332(6033), 1097–1100.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. (2001). Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Int. J. Food. Microbiol.*, 70(1-2), 53–61.
- Peng, B., Li, H., Peng, X. X. (2015). Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein Cell*, 6(9), 628–637.
- Pinu, F. R., Villas-Boas, S. G., Aggio, R. (2017). Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: Quenching and extraction protocols. *Metabolites*, 7(4), 53.

- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., De Kock, M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 19(7), 699–710.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34(6), 1037–1062.
- Rainey, P. B., Brodey, C. L., Johnstone, K. (1991). Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 39, 57-70.
- Rauscher, M. (1997). *International Trade, Factor Movements, and the Environment*; Clarendon Press: Oxford, UK.
- Saati-Santamaría, Z., Peral-Aranega, E., Velázquez, E., Rivas, R., García-Fraile, P. (2021). Phylogenomic analyses of the genus *Pseudomonas* lead to the rearrangement of several species and the definition of new genera. *Biology*, 10(8), 782.
- Sazinas, P., Hansen, M. L., Aune, M. I., Fischer, M. H., Jelsbak, L. (2019). A rare thioquinolobactin siderophore present in a bioactive *Pseudomonas* sp. DTU12.1. *Genome Biol. Evol.*, 11(12), 3529–3533.
- Schalk, I.J., Rigouin, C., Godet, J. (2020). An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environ. Microbiol.*, 22, 1447-1466.
- Segre, A., Bachmann, R. C., Ballio, A., Bossa, F., Grgurina, I., Iacobellis, N. S., és mtsai. (1989). The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett.* 255.
- Shahid, I., Han, J., Hardie, D., Baig, D. N., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. (2021). Profiling of antimicrobial metabolites of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. isolated from different plant hosts. *3 Biotech*, 11(2), 48.
- Sindhu, S. S., Dadarwal, K. R. (2001) Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea, *Microbiol. Res.*, 156(4), 353–358.
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. *Microb. Biotechnol.*, 14(1), 136–146.
- Sorensen, D., Nielsen, T. H., Christophersen, C., Sørensen, J., Gajhede, M. (2001). Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Acta crystallogr. C.*, 57(Pt 9), 1123–1124.
- Tchagang, C. F., Xu, R., Overy, D., Blackwell, B., Chabot, D., Hubbard, K., Doumbou, C. L., Bromfield, E., Tambong, J. T. (2018). Diversity of bacteria associated with corn roots inoculated with *Canadian woodland* soils, and description of *Pseudomonas aylmerense* sp. nov. *Heliyon*, 4(8), e0076.
- Thomashow LS, Weller DM. (1996). *Plant-microbe interactions*. US: Springer; Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites, *Plant-Microbe Interact.*, 1, 187–235.
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., Raaijmakers, J. M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*, *New Phytol.*, 175(4), 731–742.
- Tripathi, R. K., Gottlieb, D. (1969). Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *J. bacteriol.*, 100(1), 310–318.
- Usta, C. (2013). *Microorganisms in Biological Pest Control - A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors)*. *InTech.*, 32, 137–144.
- Wishart D.S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 27(3), 228-237.

- Yu, J. M., Wang, D., Pierson, L. S., 3rd, Pierson, E. A. (2018). Effect of producing different phenazines on bacterial fitness and biological control in *Pseudomonas chlororaphis*. *Plant Pathol. journal.*, 34(1), 44–58.
- Zhou, B. Xiao, J. Tuli, L. Ransom, H. (2012). LC-MS-based metabolomics. *Mol. Biosyst.*, 8, 470-81.
- Zhou, L., de Jong, A., Yi, Y., Kuipers, O. P. (2021). Identification, isolation, and characterization of medipeptins, antimicrobial peptides from *Pseudomonas mediterranea* EDOX. *Front. Microbiol.*, 12, 732771.