

**AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS**  
**TÉZISEK**

**MIKROBIÁLIS BIOTECHNOLÓGIAI KUTATÁSOK A MIKOTOXIN  
SZENNYEZETTSÉG CSÖKKENTÉSÉRE**

**Pusztahelyi Tünde**

**Debreceni Egyetem**

**2025**



## 1. BEVEZETÉS ÉS KUTATÁSI CÉL

Az Európai Unió *Farm to Fork* stratégiája a fenntartható, egészséges és környezetbarát élelmiszerrendszer megvalósítását tűzte ki célul (Weber és mtsai, 2025) — ide tartozik a kémiai növényvédőszer és egyéb beavatkozások csökkentése, valamint a megelőzés és a biológiai megoldások ösztönzése. Munkánk közvetlenül támogatja ezeket a célokat: alternatívát kínál a kémiai kezelések helyett, miközben csökkenti a mikotoxin-kockázatot.

Az EU szigorú, élelmiszerre és takarmányra vonatkozó maximumszinteket határoz meg a mikotoxinokra vonatkozóan, és ez folyamatosan bővül illetve szigorodik. Az olyan kutatások, amelyek hatékonyan csökkentik a mikotoxin-terhelést a szántóföldeken és az értékláncban (pl. tej mikotoxin-mentesítése), közvetlenül segítik a gazdákat és a feldolgozókat az EU-előírások betartásában és a megfelelés elérésében.

A klímaváltozás befolyásolja a mikotoxinok előfordulását, ezért egyre fontosabb a rezisztens gabonafajták bevezetése. A mikotoxin-termelő gombák (pld. *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) szaporodását és toxintermelését erősen befolyásolja a hőmérséklet, a nedvesség / páratartalom, a csapadék eloszlása, az aszály és hőstressz, a növényfiziológiai stressz. A klímaváltozás ezek szinte mindegyikét módosítja (Casu és mtsai., 2024).

Magyarország agroökológiai zónája egyre inkább „áthelyeződik” a mediterrán irányába. Sajnálatosan a klímaváltozás modellek mindegyike az átlaghőmérséklet emelkedésével következetesen a mikotoxinok szintjének emelkedésével számol Magyarország területén (Moretti és mtsai., 2019). A melegebb, szárazabb időjárás kedvez az *Aspergillus flavus* terjedésének, amely aflatoxint termel. Korábban ez főleg mediterrán régió problémája volt (Olaszország, Spanyolország). Azonban az elmúlt 10–15 évben Magyarországon is rendszeresen kimutatható a kukoricában az aflatoxin B1 szennyeződés. Az aszályos években (pld., 2012, 2022) a kukorica aflatoxin-szintje több helyen megközelítette vagy túl is lépte az EU határértéket. Az ismert *Fusarium* gabonatoxinok (DON, ZEA, T-2/HT-2) előfordulása ettől sokkal ingadozóbb. A *Fusarium* fajok (pl. *F. graminearum*) a hűvös, csapadékos virágzáskori időjárást kedvelik. Ha tavasszal sok az eső, akkor a búza és árpa gyakran mutat DON, ZEA, illetve a fumonizin B szennyezettséget. Ezt követően, ha hirtelen felmelegszik az idő, a toxinok mennyisége még tovább nőhet. A növénynemesítés és a rezisztens fajták kutatása ezért egyszerre élelmiszerbiztonsági, agrárgazdasági, és klímaadaptációs kérdés (Pinton és mtsai., 2025).

Az utóbbi évek szakirodalma egyre több bizonyítékot ad arra, hogy tejsavbaktériumok (LAB) és bizonyos élesztők képesek antagonizmust kifejteni *Fusarium* és más mikotoxin-termelők ellen, valamint a toxinok inaktiválásában/redukálásában szerepet játszhatnak (pl. Nakashima és mtsai., 2025). Ez a tudományos háttér indokolja a biológiai módszerek európai bevezetését és szabályozott alkalmazását. A LAB gátolhatja a gombás és bakteriális növényi kórokozók szaporodását, védőbevonatként vagy permetként alkalmazható a gyümölcsök és zöldségek eltarthatóságának meghosszabbítására (Gajendran és Rajamani, 2024). A LAB stimulálhatja a növény immunrendszerét, növelve a kártevőkkel és betegségekkel való ellenállást (Oliveira és mtsai., 2014). A LAB képes illékony szerves vegyületeket (VOC) termelni, amelyek riasztanak vagy gátolnak bizonyos rovarkártevőket (De Simone és mtsai., 2024). A LAB használható a talaj egészségének javítására azáltal, hogy elősegíti a hasznos mikrobiális közösségeket és elnyomja a talajban a kórokozókat. Emellett lebontják a szerves anyagokat, tápanyagot szabadítva fel és támogatva a növények növekedését.

Jelen munka célja volt **(1)** az aflatoxinogén *Aspergillus* spp. előfordulási gyakoriságának feltárása, **(2)** az *A. flavus* detektálásra alkalmas gének jelentőségének vizsgálata, valamint az AFB1 termelési potenciáljának meghatározásával a gombaizolátumokban; **(3)** a kukorica makro- és mikroklímikus viszonyokra adott élettani válaszainak értékelése, azonosítva azokat a kulcsfontosságú stresszorokat, amelyek növelhetik az *A. flavus* fertőzésre való hajlamot. Ezenkívül annak meghatározása, hogy **(4)** az *A. flavus* fertőzés tartós változásokhoz vezet-e a kukorica fiziológiájában, ami hatással lehet a növények ellenálló képességére, a termésminőségre és az élelmiszerbiztonságra. **(5)** *In vitro* közeg modellezésével kukoricadara agarban különböző környezet (eltérő polifenol, zsírsav, glükóz, NaCl, SDS tartalom) hatásának vizsgálata a gomba növekedésére, az AFB1 termelésre és a szklerocium fejlődésre. A növényi fermentációkban azok a baktériumok, amelyek életképesek maradnak az erjedési folyamat során, magas mikotoxin-rezisztenciával rendelkezhetnek. Célunk volt **(6)** LAB különböző forrásokból történő izolálása és a LAB és a *Fusarium* közötti kölcsönhatások vizsgálata a *Fusarium* spp. növekedésének és mikotoxin termelésének szabályozása érdekében. **(7)** Vegyes tenyészetekben egyes LAB izolátumok teljesítményének vizsgálata, mivel antimikrobiális aktivitásuk hatással lehet a fermentáció során a hasznos baktériumokra, illetve a végtermék gombaszennyezettségére; illetve tejsav és nem-tejsav termelő baktériumok mikotoxin toleranciájának és redukciójának vizsgálata biokontoll kidolgozására.

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Mikroorganizmusok

A *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* R703, a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 és a *L. paracasei* ssp. *paracasei* (*Lactobacillus casei*) 431 ipari törzsek a Chr. Hansen A/S (Hoersholm, Dánia) termékei.

Egyéb baktériumokat különböző forrásokból izoláltuk, mint például kovász, savanyúság, káposzta, sajt, kecsketrágya, sárgarépa, túró, kenyér, tej, erjesztett kókuszvíz stb. (National Institute for Interdisciplinary Science and Technology, Trivandrum, Kerala, India) és erjesztett takarmányokból (Debreceni Egyetem, Debrecen). A mintákból decimális hígítási sort készítettünk és kioltottuk De Mann-Rogosa-Sharp (MRS) tápagar lemezekre, majd 37°C-on 24-48 órán át inkubáltuk.

*Aspergillus* fajokat különböző kukorica és gabonamintáról izoláltunk a minták őrlését követően. Az *A. minisclerotigenes* (korábban *A. flavus*) NRRL 11611 törzset (Frisvad és mtsai., 2019) a MATE Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye biztosította. A kloramfenikol-élesztő kivonat-glükóz (CGA) agart a különböző szemes őrlemények decimális hígításával oltottuk be, és 5 napig 30°C-on inkubáltuk. A gombatelepeket, amelyeket mikroszkóposan *Aspergillus*-ként azonosítottuk, izoláltuk és maláta agar (MA) táptalajra szélesztettük. Az *Aspergillus* törzseket MA táptalajon tartottuk fenn és öt napig 30°C -on sötétben inkubáltuk.

Négy *Fusarium* tenyészetet, nevezetesen a *Fusarium verticillioides* NCIM 1100 (ATCC 14164), *F. verticillioides* NCIM 1099 (ATCC 12616), *F. graminearum* MTCC 2089 és *Fusarium oxysporum* MTCC 284 törzseket használtunk a tejsavbaktériumokkal végzett antagonizmus vizsgálatokhoz. A *Fusarium verticillioides* FGSC 7600 törzset a kukoricamag-csírázási vizsgálatokhoz használtuk. A burgonya-dextrózlevesben tenyésztett *Fusarium* gombakultúrákat a burgonya-dextróz agar (PDA) lemezekre oltottuk, és 30 °C-on 5-7 napig inkubáltuk.

### 2.2. Kukorica termékek

A kukorica növényi anyag a Debreceni Egyetem MÉK Bemutatókertben termesztett kukorica volt (SY Orpheus), a termesztését a DE MÉK Precíziós Növénytermesztési Kutatás-fejlesztési Szolgáltató Központ végezte. A tejes érésnél a teljes növény begyűjtésre került, a növény anyag aprítását követően a száraztömeg meghatározásra került és silótakarmányt készítettünk.

Kukorica agar készítéséhez az eltérő zsirtartalommal bíró kukorica készítményeket az Agri-Corn Kft. (Monostorpályi) biztosította.

### *2.3. Ipari silótakarmány és nyerstej minták*

Az erjedés utolsó szakaszában lévő 22 erjesztett takarmányt (14 kukorica, 4 lucerna, 2 rozs és 2 tritikálé) gyűjtöttek be különböző magyarországi tejelő szarvasmarhatelepekről, ahol a termelők telephelyenként 10 párhuzamos mintát gyűjtöttek a frissen megnyitott silókból. A mintákat (legalább 5 kg) egyesítették, és tiszta Velcro zsákokban adták át az analitikai vizsgálatokra. Ugyanezen telepekről származó nyerstej mintákból választottunk ki aflatoxin M1 (AFM1) tartalmú tejet a mikotoxin eliminációs vizsgálatokhoz.

Az erjesztett takarmánymintákat (100 g) steril homogenizáló Stomacher zsákokban 1:9 arányban szuszpendáltuk pufferolt peptonvízben (BPW) (Scharlab, Barcelona, Spanyolország), és homogenizáltuk Stomacher homogenizátorral (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, Spanyolország). A szuszpenziókból decimális hígításokat végeztünk, és oltóanyagként alkalmaztuk specifikus agar táptalajokon.

### *2.4. Mikrobiológiai elemzések*

Az összmikrobaszámot csíraszám agar táptalajon határoztuk meg mélyöntéses módszer alkalmazásával, és a szilárd táptalajt 30°C-on inkubáltuk 3 napig anaerob és aerob körülmények között (ISO 4833-1:2013). A mezofil tejsavbaktériumok számát MRS agar lemezekon mélyöntéses módszer alkalmazásával határoztuk meg, majd a lemezeket 30°C-on, anaerob körülmények között 3 napig inkubáltuk (ISO 15214:2005). A penészszámot felületi oltással határoztuk meg CGA lemezekon, amelyet 5 napig 25°C-on inkubáltunk (ISO 7954:1987).

### *2.5. Kukoricadara agar (CMA) táptalaj és jellemzése*

Különböző kémiai összetételű, durvára hántolt kukoricatermékeket (15 g/L) adtunk desztillált vízhez, és 30 percig forraltuk. A szuszpenziókat mikroszálas szöveten szűrtük, a szűrleteket 20 g/L agarral kevertük, és az elkészített kukoricadara agar táptalajokat (CMA) autoklávban sterilizáltuk ( $\text{pH} 6,8 \pm 0,2$ ). A sterilizált agar táptalaj antioxidáns polifenol tartalmát Folin-Ciocalteu módszerrel határoztuk meg, és galluszsav ekvivalensként adtuk meg (Kaur és Kapoor, 2002). A flavonoid (flavon/flavonol) tartalmát Chang és mtsai. (2002) szerint katechin-ekvivalensként határoztuk meg. A táptalaj nyerszsírtartalmát petroléteres extrakcióval nyertük a módosított Randall-módszerrel Soxtec extrahálóban (Soxtec System 1043, TECATOR, Hoganas, Svédország). A nitrogéntartalmát Kjeldahl-módszerrel határoztuk meg. A táptalaj D-

glükóz tartalmát spektrofotometriásan detektáltuk a Megazyme Glucose kit-jével (Megazyme, Wicklow, Írország). A CMA táptalajokat a táptalajok nyerszsírtartalmával jelöltük: 1,7 m/m% (CMA1,7), 2,6 m/m% (CMA2,6), 4,05 m/m% (CMA4,05), 7,2 m/m% (CMA7,2). A CMA2,6 táptalajt 3 g/L NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L NaCl, 0,01 g/L FeCl<sub>3</sub>×7H<sub>2</sub>O sókkal (CMA2,6+S) illetve 20 g/L glükózzal (CMA2,6+G) egészítettük ki.

## 2.6. *Aspergillus* törzsekkel végzett munka

A CGA lemezeket különböző őrölt szemestermény (kukorica és búza) decimális hígításával oltottuk be, és 5 napig 30°C-on tenyésztettük. A gombatelepeket, amelyeket mikroszkóppal *Aspergillus*-ként azonosítottuk, összegyűjtöttük és MA táptalajra oltottuk. Hét nap után az izolátumok spóráit -76°C-on tároltuk maláta kivonat tápleves -20% glicerol oldatban.

MagNA Lyser Green gyöngyök (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) segítségével tártuk fel a gombasejteket. A DNS izolálást a Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel) kit segítségével végeztük el, a Genomic DNA from Plant kit gyártói utasítása szerint.

Az izolátumok faji meghatározásához PCR segítségével az ITS1-ITS2 és cmd5-cmd6 (kalmodulin) DNS szakaszt szaporítottunk fel (White és mtsai., 1990; Hong és mtsai., 2006). Felhasznált primerek: ITS1: 5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3; ITS4: 5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3; cmd5: 5-GTC TCC GAG TAC AAG GAG GC-3; cmd6: 5-TCG CCG ATA GAG GTC ATA ACG TG-3 voltak. A PCR reakcióhoz Phusion High-Fidelity Kit-et (Thermo Scientific) használtunk. A PCR reakcióhoz szükséges anyagokat jégen mértük össze: 12,4 µL ultratiszta H<sub>2</sub>O-t, 4 µl 5x Phusion HF puffert, 0,4 µL 10mM d NTP-s-t, 1 µL 10µM/µL forward primert, 1 µL 10µM/µL reverz primert, 1 µL templát DNS-t és 0,2 µL Phusion enzimet. Rövid centrifugálás után PCR készülékbe helyeztük (BioRad): 98°C 30 sec, majd 98°C 10 sec, 56°C 30 sec 72°C, 30 sec harmincszoros ismétlés, 72°C 10 perc, majd a végterméket 4°C-ra lehűtöttük. A kalmodulin primerek esetében a PCR reakciónál a következő hőmérséklet gradienst alkalmaztuk: 98°C 30 sec, majd 98°C 10 sec, 58°C, 30 sec 72°C 30 sec harmincszoros ismétlés, 72°C 10 perc, majd a végterméket szintén 4°C-ra hűtöttük. A termékeket NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) kit segítségével 1%-os agarózzgélből történő tisztítás után szekvenáltattuk (Biomi Kft., Gödöllő, Magyarország). A DNS-szekvenciákat a MEGA 7 szoftver 7.0.14. verziójával elemeztük, és az NCBI adatbázisával vetettük össze (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; 2016-os verzió. 03. 01.).

Az aflatoxin génklaszter gének kimutatásához multiplex PCR-t végeztünk. A PCR reakciókhoz Phusion High-Fidelity PCR Kit-et (Thermo Scientific) alkalmaztunk a következő primer párokkal (Varga és mtsai., 2011): nor1: 5-ACC GCT ACG CCG GCA CTC TCG GCA -3; nor2: 5-GTT GGC CGC CAG CTT CGA CAC AGC -3; aflR-R: 5- TGG KGC CGA CTC GAG GAA YGG GT- 3; aflR-F: 5- GGG ATA GCT GTA CGA GTT GTG CCA -3; omt1: 5- GTG GAC GGA CCT AGT CCG ACA TCA C -3; omt2: 5-GTC GGC GCC ACG CAC TGG GTT GGG G -3. A beállítások a következők voltak: 98°C 30 mp, 98°C 10 mp, 65°C 30 mp, 72°C 30 mp, megismételve 30-szor. Ezt követte a 72°C-os 10 perces hőmérséklet és a 4°C-os hűtés.

### 2.7. *Aspergillus spp.* vizsgálata különböző táptalajokon

Az *A. minisclerotigenes* NRRL 11611 aflatoxin termelését MA, CMA és Czapek-Dox táptalajokon is vizsgáltuk. Az *A. minisclerotigenes* NRRL 11611 növekedését és aflatoxin termelését minden táptalajon megvizsgáltuk  $10^2$  spóramennyiséggel oltva, 30°C-os inkubációt követően (5-7 nap, sötétben). Az MA és CMA2.6 lemezeket, kiegészítve különböző koncentrációjú stresszorokkal: NaCl (0 - 2,5 M) vagy SDS-sel (0 - 0,75 g/L),  $10^2$  spórával oltottuk be, és 30 °C-on, sötétben inkubáltuk. A törzsek növekedését és fejlődését 5-7 napos beoltás után értékeltük. A stresszvizsgálatok során a gombatörzsek növekedését, szkleróciumképződését, a spóráképzést, valamint a pigmentációt vizsgáltuk.

### 2.8. *In vivo* kísérlet kukorica növényen

2020 és 2022 között mikro-plot kísérletet végeztünk. SY Orpheus (FAO 380; Syngenta Magyarország Kft., Budapest) kukoricahibridet választottuk ki ehhez a vizsgálathoz (Syngenta, 2020). A változók közé tartozott az év, az oltás (*A. flavus*-oltott vs. kontroll), az öntözés (öntözött vs. nem öntözött), a műtrágya kijuttatási mennyisége (60, 120 és 180 kg/ha). Minden kezelésnek három ismétlése volt. A parcellák 4 sorból álltak, mindegyik 5 m hosszú és 3 m széles. A sortávolság 76 cm, a tőtávolság 20 cm volt. A magokat minden év április közepén kézzel vetettük el.

A csapadékmennyiséget a kísérleti parcellákon kívül mértük, hogy kiküszöböljük a lombkorona miatti hibákat. A csapadékadatok gyűjtésére a Campbell Scientific (Logan, UT, USA) ARG100 billenővödös esőmérőjét használtuk. Az alkalmazott öntözési mennyiségeket beépítettük az egyes kezelések teljes vízbevitelébe. A levegő hőmérsékletét és relatív páratartalmát minden kísérleti parcellán az Onset RXW-THC-B-868 vezeték nélküli kombinált érzékelővel (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) mértük. A toxinogén *A. flavus* AMK 4-16/IV

(Debreceni Egyetem, Debrecen) saját izolátumunkat konidiospórákat 0,2% Tween 20 oldattal (Scharlab, Barcelona, Spanyolország) mostuk le, hogy spóraszuszpenziókhoz ( $10^6/\text{mL}$ ) jussunk. A növényeket minden évben R2 fenológiai stádiumban (2020. augusztus 12., 2021. augusztus 2. és 2022. augusztus 4.)  $50\text{ }\mu\text{L}$  spóraszuszpenzióval kezeltük a kukoricacsövön lévő szűrőcsatornán keresztül. A minták gyűjtése a végső érési fázisban történt. A fiziológiai fejlődés végén a szárított csöveket hántoltuk és fényképeket készítettünk. A fotókról meghatároztuk és statisztikailag elemeztük a csőhosszon mérhető magszámokat ( $n \geq 8$ ).

A mintákat szárítószekrényben (UN55, Memmert GmbH, Schwabach, Németország) szárítottuk  $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  között, három ismételéssel, súlystabilitásig. Kiszámítottuk a három ismételésből az átlagos száraztömeget és a szórást (ISO 6496:1999). A magok antioxidáns polifenol tartalmát Folin–Ciocalteu módszerrel határoztuk meg, és galluszsav-egyenértékben fejeztük ki galluszsav referenciagörbe alapján (Kaur és Kapoor, 2002). A fehérje nitrogéntartalmát Kjeldahl-módszerrel (ISO 5983-2:2009) mértük. A keményítőtartalmat szabványos polarimetriával határoztuk meg egy CETI Polaris analóg polariméterrel (Medline, Chalgrove, Egyesült Királyság).

### *2.9. Baktériumok azonosítása*

Baktérium izolátumok azonosítása MALDI-TOF MS módszerrel vagy DNS alapon történt. Az MRS és összcsíraszám agarról izolált baktériumokat MALDI-TOF MS (Microflex LT Instrument, Bruker Daltonik GmbH, Bréma, Németország) módszerrel azonosítottuk (DE Klinikai Központ, Egészségügyi Szolgáltató Egységek, Diagnosztikai Egységek, Orvosi Mikrobiológia). A szoliter kolóniákat a Biotyper 3.0 szoftverrel (Bruker Daltonik GmbH, Németország) elemeztük. Csak az 1,950 feletti pontszámokat tekintettük érvényes eredménynek.

A baktériumtenyészetek telepeit izoláltuk a lemezekből, és folyékony táplevesbe (NB) oltottuk (Nutrient Broth, Scharlab, Barcelona, Spanyolország). 16 órás tenyészetek  $200\text{ }\mu\text{L}$ -es aliquot részeit  $1000\text{ }\mu\text{L}$ -es CTAB (Biochemica, Darmstadt, Németország) lízispufferrel (Appllichem Ltd. ITW Company, Darmstadt, Németország) kevertük össze. A mintákat 30 percig inkubáltuk  $65^\circ\text{C}$ -on, majd  $2\text{ mL}$  Lysing Matrix B csövekbe helyeztük (MP Biomedicals Germany GmbH, Schwegel, Németország). A gyöngy alapú lízist 20 másodpercig végeztük  $6500\text{ r.p.m.}$  sebességgel Precellys 24 homogenizátorral (PeqLab Biotechnologie Ltd., Erlangen, Németország). A lizált baktériumok sejttörmelékét centrifugálással választottuk el ( $10\text{ perc } 14\text{ }000\text{ r.p.m.}$ ). A felülúszó minden  $600\text{ }\mu\text{L}$  aliquot részéhez  $240\text{ }\mu\text{L}$  kloroformot adtunk,  $30$

másodpercig kevertük, majd centrifugáltuk (20 percig 14 000 r.p.m.). A felső vizes fázis aliquot részeit (egyenként 400 µL) egyenlő térfogatú izopropanollal kevertük, majd újra centrifugáltuk (10 perc, 14 000 r.p.m.). A pelleteket 500 µL 70%-os etanollal átmostuk, újra centrifugáltuk, és szobahőmérsékleten hagytuk megszáradni. A genomi DNS-t 100 µL vízben újra szuszpendáltuk, majd a gyártó utasításait követve tovább tisztítottuk egy Amicon Ultra szűrőkészlettel (Merck Millipore, Darmstadt, Németország). Minden PCR-ben az iProof nagy hűségű PCR-kitet (BIO-RAD Ltd., Hercules, CA, USA Litvánia) használtunk T100 PCR készüléken (BIO-RAD Ltd., Litvánia) a **1. Táblázat** szerint.

**1. Táblázat** Bakteriális DNS alapú azonosításban alkalmazott PCR primerek és alkalmazási hőmérséklet (*annealing*).

| Azonosítók                                         | Szekvencia (5'-3')          | Annealing (°C) |
|----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| 27F -1492R                                         | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'  | 54             |
|                                                    | 5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3' |                |
| 515F-1492R                                         | 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'   | 60             |
|                                                    | 5'-GGTTACCTTGTACGACT T-3'   |                |
| Plantarum-F- Plantarum-R<br>(Kim és mtsai., 2020). | 5'-GCTGGCAATGCCATCGTGCT-3'  | 60             |
|                                                    | 5'-TCTCAACGGTTGCTGTATCG-3'  |                |

A DNS-amplikonokat 0,8%-os agarózgélből (BIOLINE, London, Anglia), Nucleo SpinGel és PCR tisztító kittel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) tisztítottuk a gyártók protokolljai szerint. A PCR termékeket a BIOMI Kft. (Gödöllő, Magyarország) szekvenálta. Homológia kutatást végeztünk az Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (NCBI, USA) NCBI BLASTn program segítségével (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Benson és mtsai., 2013). A szekvenciákat a NCBI adatbázisában helyeztük el OP183257-től OP183263 azonosítókig.

#### 2.10. Baktériumok biokémiai azonosítása

A tiszta tejsavbaktérium izolátumokat Gram-festéssel, kataláz teszttel és MRS-kalcium-karbonát zónaképződési vizsgálatokkal jellemeztük. A kataláz negatív, MRS+CaCO<sub>3</sub> lemezekén Gram-pozitív, zónaképző tenyészeteket választottuk ki a további vizsgálatokhoz (Paswan és mtsai., 2023).

#### 2.11. Baktériumok növekedésének vizsgálata

A sejtszaporodást 630 nm hullámhosszon mért denzitással mértük mikrotiter lemezolvasóban (Synergy HTX multi-mode reader, iBioTech Hungary Kft., Szigetszentmiklós, Magyarország), ahol a 16 órás tenyészetekből 10  $\mu\text{L}$ -t ( $10^9$  sejt/mL) töltöttünk fel 200  $\mu\text{L}$  MRS tápfolyadékkal. A mérést 24 órán keresztül folytattuk óránként 30°C-on. A kultúrákat minden mérési pont előtt rázattuk. Az összes mérési pontra kapott adatot ( $n = 4$ ) statisztikailag elemeztük ( $p < 0,05$ ).

### *2.12. Baktériumtenyészetek mikotoxin-rezisztenciájának vizsgálata*

Minden rezisztenciavizsgálathoz mikotoxin standard oldatokat (Romer Labs, Tulln, Ausztria) megfelelő hígításban alkalmaztunk. A baktériumokat beoltottuk MRS tápoldatba vagy NB táplevesbe (Scharlab, Barcelona, Spanyolország) és 16 órán át inkubáltuk 30°C-on, hogy exponenciális fázisú tenyészeteket kapjunk. Mikrotiter lemezen MRS tápoldatot vagy NB táplevest oltottunk be úgy, hogy alacsony sűrűségű kultúrát kapjunk ( $\text{OD}_{630\text{nm}} < 0,200$ ).

A tenyészetekhez különböző koncentrációkban mikotoxinokat adtunk (AFM1: 0 – 1,47  $\mu\text{g/L}$ ; AFB1: 24 – 100  $\mu\text{g/L}$ ; OTA: 50 – 1000  $\mu\text{g/L}$ ; DON: 700  $\mu\text{g/L}$  – 1000  $\mu\text{g/L}$ ; ZEA: 100 – 500  $\mu\text{g/L}$ ). A baktériumokat a mikotoxinokkal legfeljebb 24 órán át inkubáltuk 30°C-on a mikrotiter lemezolvasóban (Synergy HTX multi-mode reader, iBioTech Hungary Kft., Szigetszentmiklós, Magyarország), és óránként, intenzív rázás (30 s) után leolvastuk az optikai denzitást 630 nm-en.

### *2.13. Bakteriális sejtfrakciók előállítása*

A baktériumtörzseket táplevesben tenyésztettük (16 óra, 30°C), és az exponális fázisú tenyészeteket centrifugáltuk (8000 r.p.m., 10 perc, 4°C), eltávolítottuk a felülúszót, és a sejtpelleteket háromszor átmostuk 200  $\mu\text{L}$  steril foszfátpufferes sóoldattal (PBS). Mosás után a pelletek aliquot részeit különböző vegyi anyagoknak tettük ki, hogy különböző sejtfalfrakciókat kapjunk (Nieder Korn és mtsai., 2009; Goh és mtsai., 2009):  $\text{H}_2\text{O}$  (100°C, 15 perc) - sejttörmelék; 2% (w/v) nátrium-dodecil-szulfát (SDS) (100°C, 15 perc) - tisztított sejtfalfrakció; 0,1 M HCl (100°C, 15 perc) - teikolsav frakció; 10% (w/v) triklór-ecetsav (TCA) (100°C, 15 perc) - peptidoglikán frakció és 1 M LiCl (100°C, 15 perc) - S-réteg fehérjék. A kezelések után a mintákat 14 000 r.p.m. sebességgel centrifugáltuk (10 perc), a felülúszókat eltávolítottuk, és a pelleteket  $3 \times 200 \mu\text{L}$  PBS-sel mostuk. A baktériumsejteket és sejtfalfrakciókat -18°C-on tároltuk.

### *2.14. Mikotoxin eliminációs vizsgálatok*

A mikotoxinok eliminációs vizsgálatához BIOPURE mikotoxinokat (Romer Labs, Tulln, Ausztria) használtunk megfelelő hígításban. A mikotoxinokat MRS táptalajjal hígítottuk. 16 órás MRS baktérium tenyészetet készítettünk (25°C vagy 37°C). Minden mikotoxinnal kiegészített mintát MRS-ben inkubáltunk 1 órán át 25°C-on rázással (250 r.p.m.), majd centrifugáltuk (8000 r.p.m, 10 perc, 4°C), eltávolítottuk a felülúszókat és HPLC-vel elemeztük a mintákat. A felülúszókat metanollal kezeltük 1:1 arányban, és nagy sebességgel kevertettük. A vizsgált mikotoxinok HPLC kimutatását Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) berendezéssel végeztük.

A természetesen szennyezett nyerstej mintát centrifugáltuk (5000 r.p.m, 10 perc, 4°C) a zsírtartalom csökkentése érdekében, az AFM1 tartalmat pedig Aflatoxin M1 High Sensitivity ELISA-val (Romer Labs, Tulln, Ausztria) mértük. A zsírmentes tejből 450 µL-t pipettáztunk Eppendorf-csővekbe, és 50, 100 vagy 150 µL peptidoglükán frakciót, sejttörmeléket, sejtfal-frakciót, teikolsavat, valamint kezeletlen életképes sejteket adtunk az AFM1 kötőképesség tesztelésére. Lassú vertikális keverést (100 r.p.m.) végeztünk 4°C-on 1 órán keresztül vagy 2 órán keresztül a megfelelő homogenizálás érdekében. 10 perc centrifugálás után a fennmaradó AFM1 koncentrációt ELISA-val mértük a felülúszóból. Kontroll mintaként nyerstejjel kevert PBS-t alkalmaztunk. A kötési vizsgálatokat háromszor ismételtük meg, a sorozatok közötti RSD < 15%, a sorozaton belüli RSD pedig < 5% volt.

### 2.15. Antagonizmus tesztek

#### Bakteriális antagonizmus a *Fusarium* spp. ellen

Egy soliter baktérium telepet vettünk le egy friss MRS lemeztől, és 250 µl steril desztillált vízzel kevertük össze. Az így kapott szuszpenziót egy steril vattapálcával egy friss MRS lemez felére szélesztettük, és a lemezt 37°C-on 48 órán át inkubáltuk. A gombákat PDA táptalajon növesztettük. Az antifungális aktivitás felméréséhez egy-egy sterilen kivágott gombakorongot helyeztünk az MRS lemez másik felére, amelyet korábban baktériumokkal oltottunk. 30°C-os inkubáció után 5–6 napig a lemezeket a kontroll lemezekkel hasonlítottuk össze. A gombanövekedésének gátlását úgy számoltuk ki, mint a kolónia átmérőjének százalékos csökkenése (I%) a kezeletlen kontrollokhoz képest. Minden RSD 5% alatt volt.

#### Bakteriális sejtmentes fermentlé hatása *Fusarium* spp. ellen

Egy 250 mL-es MRS levest 16–24 órás baktérium kultúrával (OD<sub>600nm</sub> = 1) oltottunk be, és 37°C-on 48 órán át statikus körülmények között inkubáltuk. Az inkubálás után a felülúszót

centrifugálással gyűjtöttük össze (5 000 r.p.m., 15 perc). A felülúszót etil-acetáttal (EA) kevertük (1:2 arányban) egy 2 literes rázótolcsérben, majd egy órán át szobahőmérsékleten ráztuk. Az szerves réteget rotációs bepárlóval koncentráltuk (BÜCHI, Flawill, Switzerland). A félig viszkózus koncentrált mintát összegyűjtöttük. A koncentrált nyers kivonatot diffúziós vizsgálatokban használtuk a *Fusarium* fajokkal szemben.

A tesztekhez a *Fusarium* fajokat PDB-ben tenyésztettük és 2–3 napig 30°C -on inkubáltuk. Mueller–Hinton Agar (MHA, Hi-Media, Mumbai, Maharashtra, India illetve VWR International Kft.) közeget használtunk az antagonizmus vizsgálatokhoz. A PBS-ben előkészített gombaszuszpenziókat egyenletesen osztottuk szét MHA lemezekre. A lyukmódszernél 100 µL nyers kivonatot adtunk ( $n = 3$ ). A korongdiffúziós vizsgálatához 50 µL nyers kivonatot steril korongokra helyeztünk, majd három ismétlésben helyeztük a gombakultúrára. Mindkét esetben a gátló zónát 30°C-os inkubáció után határoztuk meg 72 óra múlva.

#### 2.16. Biokontroll kukorica szemeken

Egy hibrid kukoricát (B73; Martonvásár, Magyarország) használtunk ebben a kísérletben. A kukoricaszemeket felület-fertőtlenítettük 70%-os etanolban 5 percig, majd rövid mosás következett steril desztillált vízben, majd 100%-os nátrium-hipoklorit oldatban 15 percig. Fertőtlenítés után a magokat háromszor tíz percig steril desztillált vízben mostuk a fertőtlenítőszer eltávolítása érdekében. A magokat először PDA lemezeken teszteltük endogén *Fusarium* spp. szennyeződésre. Amikor bebizonyosodott, hogy *Fusarium* mentesek, egy új kísérletben a fertőtlenített magokat 0,5 mm mélységben vágtuk be a csírához közel, hogy megkönnyítsük a gombás fertőzést, és 24 órán át *F. verticillioides* FGSC 7600 sejtsuszpenzióba ( $10^3$  spóra/mL) áztattuk. A kezelés után a magokat egy steril Petri-csésze felületére helyeztük, hogy eltávolítsuk a felesleges gombaszuszpenziót. A *Fusarium*-fertőzött magokat  $10^8$  TKE/mL kultúra sejtmentes fermentlévébe áztattuk. A kezelés után a magokat egy steril Petri-csésze felületére helyeztük, hogy eltávolítsuk a felesleges mikrobaszuszpenziót. Ezután a magokat 330 ml térfogatú sterilizált üvegedényekbe tettük, amelyek nedvesített papírtörölt tartalmaztak. Mindegyik kezelést hatszor ismétlésben, ismétlésenként öt maggal ( $n = 30$ ) végeztünk el. Az üvegedényeket kupakkal zártuk, és tenyésztőszobában, 22°C-on és 800 lux fényintenzitással, 16:8 fényperiódussal tartottuk (Christensen és mtsai., 2012). A kísérletet 5 nap elteltével értékeltük, és rögzítettük a fejlődő növények leghosszabb gyökérhosszát, a

gyökerek számát és hajtásainak hosszát. A gombaszennyeződést a magokon 0 - nincs kinövés és 1 - micéliummal borított magként értékeltük.

### 2.17. Kukorica növény silózása

Az összegyűjtött nedves, majd apróra vágott kukorica növényt 0,1% hangyasavval kezeltük és *Fusarium* mikotoxinokkal szennyezett kukorica referenciamintákkal kevertük (BIOPURE, Romer Labs, Tulln, Ausztria). MRS tápközegben szaporított 16 órás LAB sejt kultúrákat alkalmaztunk az oltásra. A *Limosilactobacillus fermentum* SD4 és a *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4 és CB2 törzseket külön-külön oltottuk nedves, apróra vágott kukoricanövényre. Nyolc szilázsvariáció készült: kontroll (C), LAB-oltott (C + SD4, C + CB2 és C + FCW4), mikotoxinnal szennyezett (C + M), mikotoxinnal szennyezett és LAB-oltott (C + M + SD4, C + M + CB2 és C + M + FCW4). A mátrix egy részét mesterségesen szennyeztük száraztömegre számítva  $2,13 \pm 0,715$  mg/kg FUM,  $0,625 \pm 0,140$  mg/kg DON és  $141,5 \pm 36,65$  µg/kg ZEA mikotoxinnal. A különböző összetételű készítményeket légmentesen záródó műanyag dobozokban (~350 g nyers súly/doboz) szobahőmérsékleten 6 hétig, folyamatos nyomás alatt tartottuk. Az erjedés végén meghatároztuk a szárazanyagot, a mikrobiológiai minőséget, a pH-t, az illósavtartalmat és a mikotoxin-tartalmat.

Az erjesztett takarmánymintákat (kukorica, lucerna, rozs és tritikálé) három ismétlésben szárítottuk szárítószekrényben (UN55, Memmert GmbH, Schwabach, Németország)  $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten a tömegstabilitás eléréséig (ISO 6496:1999). A magok antioxidáns polifenol tartalmát Folin–Ciocalteu módszerrel határoztuk meg, és galluszsav-egyenértékben fejeztük ki galluszsav referenciagörbe alapján (Kaur és Kapoor, 2002). A fehérje nitrogéntartalmát Kjeldahl-módszerrel (ISO 5983-2:2009) mértük. A keményítőtartalmat szabványos polarimetriával határoztuk meg egy CETI Polaris analóg polariméterrel (Medline, Chalgrove, Egyesült Királyság).

Az erjesztett mátrix tejsavtartalmát HPLC-DAD módszerrel határoztuk meg. 50 g szilázsmintát mértünk egy Erlenmeyer-lombikba, 300 ml víz hozzáadása után parafilmmel lezártuk, és egy éjszakán át  $4^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Redős szűrőpapírral szűrtük, majd egy  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ -es pórusú Spartan fecskendőszűrővel (Merck). A szűrt mintát Phenomenex RP-C18 (Torrance, CA, USA) kolonnán szeparáltuk ( $125 \times 4\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) és DAD detektorral (218 nm) detektáltuk acetonitril: víz (10:90) eluenssel. Illékony szerves savak esetében 50 g erjesztett mátrixot 300 mL 1 % foszforsav oldattal lezártuk, és egy éjszakán át  $4^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Szűrés után gázkromatográfiával a következő komponenseket mértük: ecetsav, propionsav, i-vajsav, n-

vajsav, n-vajsav, i-valeriánsav, n-valeriánsav, i-kapronsav, n-kapronsav, heptánsav. A gázkromatográfia feltételei: Varian CP 3800 (Varian Inc, Walnut Creek, CA, USA) CP-Wax 52 CB változat, 30 m\*0,25 mm ID; 0,25 µm kolonna, és lángionizációs detektor (FID) 230°C-on. A vivőgáz 2,0 mL/min hélium volt, állandó áramlással. Az injektort 240°C-ra állítottuk, 1:10 arányban *split*-et alkalmaztunk, és a befecskendezett térfogat 1 µL volt. A beállított hőmérsékleti program 95°C, 14.5°C/min, 185°C volt (tartás: 2,5 perc).

#### 2.18. Mikotoxin mérés HPLC módszerekkel

A nedves erjesztett takarmányokat (minimum 4 kg) szárítószekrényben (LABORMIM Kft., Budapest, Magyarország) szárítottuk 60°C ± 1°C hőmérsékleten tömegstabilitásig. A tömegstabilitás elérése után a mintákat SM 100 vágómalommal (Retsch GmbH, Haan, Németország) homogenizáltuk.

Minden HPLC mérést Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) HPLC berendezésen végeztünk. Minden méréshez Biopure Aflatoxin Mix 1, DON, ZEA vagy OTA mikotoxin oldatokat használtunk standardként (Romer Labs., Tulln, Ausztria), és megfelelő hígításban alkalmaztuk. A mintaelőkészítést VICAM módszerekkel (Waters, Milford, Massachusetts, USA) végeztük, némi módosítással.

A DON méréséhez 12,5 g szárított mintát homogenizáltunk 2,5 g polietilén-glikollal és 50 mL desztillált vízzel nagy sebességű keverés mellett. Szűrés után 1 mL kivonatot töltöttünk a DON immunaффinitási oszlopra (VICAM DONtest HPLC Columns, Weber Consulting Kft., Göd, Magyarország). Az oszlopot egymás után desztillált vízzel (5 mL) és metil-alkohollal (5 mL) átmostuk, hogy a toxint eluáljuk az oszlopból. A metanolt a Rotavapor R114-ben (Büchi) párologtattuk el a mintákból. A Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopot (125 × 4 mm, 5 µm) DAD detektorral használtuk UV 218 nm-en, acetonitril: víz (10:90) eluenssel.

Az AF és az OTA meghatározásához 25 g szárított mintát homogenizáltunk 2,5 g nátrium-kloriddal és 50 mL 80%-os metil-alkohollal (HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nagy sebességű keverés mellett. Az extraktumot 1:4 arányban hígítottuk 40 mL desztillált vízzel. A hígított extraktumot leszűrtük és 10 mL-t töltöttünk belőle az aflatoxin immunaффinitási oszlopra (VICAM AflaTest WB HPLC Columns, Weber Consulting Ltd., Göd, Magyarország) vagy OTA immunaффinitási oszlopra (VICAM OchraTest WB HPLC Column, Weber Consulting Ltd., Göd, Magyarország). Az oszlopot 10 mL desztillált vízzel mostuk, és a toxint metil-alkohollal (5 mL) eluáltuk. Az OTA kimutatásához Phenomenex (Torrance, CA, USA)

RP-C18 oszlopot ( $150 \times 4,6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) használtunk fluoreszcens detektorral, ex360 nm, em440 nm és acetonitril: 0,012 M Na-foszfát pH7,5 (60:40) eluenssel. Az AF kimutatására Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopot ( $150 \times 4,6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) használtunk Romer UV-származékképző egységgel (Romer Labs Ltd., Tulln, Ausztria) és ex360 nm, em440 nm fluoreszcens detektorral, metil-alkohol: víz (45:55) eluenssel.

A ZEA meghatározásához 20 g szárított mintát homogenizáltunk 2 g nátrium-kloriddal (VWR, Debrecen, Magyarország) és 50 mL 90%-os acetonitrillel (HPLC, Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) nagy sebességű keverés mellett. Az extraktumot 1:4 arányban hígítottuk 40 mL desztillált vízzel. A hígított kivonatot szűrtük, és 10 mL-t töltöttünk a ZEA immunaflinitási oszlopra (VICAM ZearalaTest WB HPLC oszlop, Weber Consulting Kft., Göd, Magyarország). Az oszlopot 10 mL desztillált vízzel mostuk, és a toxint metil-alkohollal (5 mL) eluáltuk. A kimutatáshoz Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopot ( $150 \times 4,6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) használtunk ex360 nm, em440 nm fluoreszcens detektorral és acetonitril: víz: metanol (46:46:8) eluenssel.

Az alkalmazott HPLC-módszerek teljesítményét, lineáris tartományát és reprodukálhatóságát úgy határoztuk meg, hogy szárított és porított kukoricaszilázst különböző koncentrációjú mikotoxinokkal szennyeztük ( $n = 8$ ). Az AFB1, OTA, DON és ZEA esetében a LOD sorrendben 0,01  $\mu\text{g/kg}$ , 0,5  $\mu\text{g/kg}$ , 0,01  $\text{mg/kg}$  és 0,001  $\text{mg/kg}$  volt. A lineáris tartományokat 300  $\mu\text{g/kg}$ -ig találtuk az AFB1 és az OTA esetében, míg a DON és a ZEA esetében 50  $\text{mg/kg}$ -ig terjedő linearitást mutattunk ki. A relatív szórást (RSD) a variációs együttható abszolút értékeként számítottuk ki, és minden esetben 10% alatt találtuk.

#### *2.19. Az aflatoxin B1 kimutatása felületi tenyészetből*

Az MA táptalajt a felszíni tenyészetrel együtt steril Stomacher homogenizáló tasakba gyűjtöttük, majd 10 mL kloroformmal homogenizáltuk Stomacher homogenizátorban (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, Spanyolország) 2 percig, majd az eljárást még egyszer megismételtük. A homogenizált tenyészetet szűrőpapíron (Macherey-Nagel MN 619, Merck-Millipore) keresztül gömblombikokba szűrtük, majd Rotavapor R114-ben (Büchi) pároltuk be. 2 mL mozgófázis (metil-alkohol: víz, 45:55) hozzáadása után az oldott anyagot átszűrtük Millex-GV 0,22  $\mu\text{m}$ -es szűrőn (Merck-Millipore). A 20  $\mu\text{L}$ -es minták AFB1-tartalmát HPLC-technikával határoztuk meg Hibar 125-4 Lichrospher 100RP-18 ( $5\mu\text{m}$ ) oszlopon (Merck-Millipore), a mozgó fázis 1 mL/min áramlási sebességével, és fluoreszcens detektorral

detektáltuk ex360nm-en, em440nm-en. Biopure Aflatoxin B1 oldatot (Romer Labs, Tulln, Ausztria) vittünk fel az oszlopra.

#### 2.20. Mikotoxin kimutatása ELISA módszerrel

Az FB1 és T-2 mikotoxinok kimutatását AgraQuant® Fumonisin ELISA (LOD: 0,2 mg/kg, LOQ: 0,025 mg/kg, mérési tartomány: 0,2-5 mg/kg) és AgraQuant® T-2 toxin ELISA teszt (LOD: 0,01 mg/kg, LOQ: 0,020 mg/kg, mérési tartomány: 0,02-0,5 mg/kg) alkalmazásával végeztük a gyártó utasításai szerint (Romer Labs, Tulln, Ausztria). Ezt követően a BioTek Synergy HTX Multimode Reader (BioTech, Magyarország) segítségével 450 nm-en mértük a mintákat ( $n = 3$ , RSD <5%).

Az AgraQuant® Aflatoxin M1 High Sensitivity ELISA vizsgálatokat (Romer Labs, Tulln, Ausztria) a gyártó utasításai szerint, TS50 mikrolemezmosó alkalmazásával (iBioTech Hungary Kft., Szigetszentmiklós, Magyarország) végeztük (LOD: 2,9 ng/kg nyerstej esetén, LOQ: 0,3 ng/kg, mérési tartomány: 5-100 ng/kg). A mintákat 450 nm-en mértük mikrotiterlemez olvasóval (Synergy HTX multi-mode reader, iBioTech Hungary Kft., Szigetszentmiklós, Magyarország). A méréseket négy ismételtsben végeztük (RSD <5%).

#### 2.21. Észteráz aktivitás mérése

Az enzimaktivitást spektrofotometriásan mértük Castillo és mtsai. (1999) módszere alapján. A reakcióelegy 800  $\mu$ L 50 mM Tris-HCl puffert (pH 7,5), 100  $\mu$ L *p*-nitrofenil-butirátot (Merck-Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) tartalmazott szubsztrátként (8,1 mM acetonban) és 100  $\mu$ L lizált (Precellys 24 homogenizátor, Peqlab Biotechnologie Ltd., Erlangen, Németország) és PBS-mosott sejttörmelékkel vagy hőkezelt sejtfalfrakció-mintát. Az enzimaktivitást *p*-nitrofenolként detektáltuk 10 perc után 37°C inkubációban ( $\lambda = 346$  nm). Az észterázaktivitást percenként felszabaduló mM *p*-nitrofenolban fejeztük ki.

#### 2.22. Statisztikai elemzés

A sejtnövekedési adatok elemzését Gen5 3.05 szoftverben (BioTec, Winooski, VT, USA) végeztük, a szignifikanciaelemzést pedig a Microsoft Excel 2501 verziójában Analysis ToolPac Add-in-ben végeztük, ahol a Tukey-tesztet ( $p \leq 0,05$ ) végeztük. Az összes korrelációs (Pearson) elemzését szintén ebben a programban végeztük.

A szántóföldi kísérletből összegyűjtött adatokat egyváltozós varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztük az általános lineáris modell (GLM) eljárással. Az átlagos különbségeket Duncan

többszörös tartományú tesztjével (DMRT) és a független mintájú *t*-teszttel határoztuk meg ( $p < 0,05$ ). A Pearson-féle lineáris korrelációs elemzések a változók eltérését, míg a többszörös regressziós elemzések a változók közötti kapcsolatokat értékelték. A variancia stabilizálása érdekében a penészsúly adatait (TKE/g) log-transzformáltuk a statisztikai elemzés előtt. A transzformált adatok normál eloszlást mutattak (Clewer és Scarisbrick, 2013). A statisztikai elemzéseket IBM SPSS Statistics Version 20 szoftverrel (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) végeztük.

### 3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A mikotoxinok penészgombák által termelt másodlagos metabolitok, amelyek erősen mérgezőek lehetnek az emberekre és állatokra egyaránt. Ezek az anyagok szennyezhetik a gabonaféléket, takarmányokat és egyéb élelmiszereket, ami komoly gazdasági és egészségügyi problémát okoz. A hagyományos vegyszeres és fizikai védekezési módszerekkel szemben kutatócsoportunk olyan biológiai alapú megoldásokat kutatott, amelyek környezetkímélők és fenntarthatók. A dolgozat gerincét alkotó tanulmányok közös fókuszában a mikotoxinok elleni védekezés és a biokontroll stratégiák állnak, különösen a fonalgombák (pl. *Fusarium*, *Aspergillus*) és toxinjaik (pl. DON, ZEA, AFB1, AFM1) elleni mikrobiális biotechnológiai megoldások. Az következőkben az tézisek alapjául szolgáló közleményekben bemutatott eredményeinket összegzem.

Egyik tanulmányunk a termények *A. flavus* szennyezettségét és az aflatoxintermelő *Aspergillus* fajok PCR-alapú kimutatásának hatékonyságát vizsgálta, különös figyelmet fordítva arra, hogy mely géneket érdemes célba venni az aflatoxin gén klaszterben az azonosításhoz (Kovács és Pusztahelyi, 2017).

A *norA* és *aflR* gének kimutatása a legmegbízhatóbb indikátor az aflatoxintermelés potenciáljára, bár ezek önmagukban nem garantálják a tényleges toxintermelés megvalósulását. A genetikai jelenlét nem mindig jelent aflatoxin-termelést, mivel az aflatoxin bioszintézis környezeti tényezőktől (pl. hőmérséklet, páratartalom, tápanyagok) is erősen függ. Több nem *Aspergillus flavus* illetve *A. parasiticus* fajból is kimutathatók egyes aflatoxin klaszter-gének (pld. *A. tritici*, *A. cristatus*), de ezek nem termelnek AF toxinokat. A vizsgált mintákból a gombák több mint 40%-a potenciálisan aflatoxintermelő volt, ami komoly élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent. Közleményünk rávilágított, hogy a PCR-alapú aflatoxintermelő gombák azonosítása nem elégséges önmagában, mivel nem minden genetikai potenciállal rendelkező törzs termel ténylegesen toxint. Ezért a környezeti feltételek és a tényleges toxinmérés

elengedhetetlen a biztonságos élelmiszer- és takarmányellátáshoz. Az éghajlatváltozás miatt növekvő aflatoxin-kockázat különösen hangsúlyossá teszi a megelőzést és a szántóföldi monitoringot.

Másik tanulmányunk a különböző táptalajok – különösen a maláta agar (MA) és a kukorica alapú tápagar (CMA) – hatását vizsgálta az *Aspergillus* fajok növekedésére és aflatoxin B1 (AFB1) termelésére (Kovács és Pusztahelyi, 2018). A kutatás célja az volt, hogy jobban megértsük, milyen tápanyag- és környezeti feltételek serkentik vagy gátolják a mikotoxin-képződést a természeteshez hasonló körülmények között. Az AFB1 termeléséhez magas glükóz ( $> 0,1$  M) illetve szerves nitrogénszint szükséges, amit az MA táptalaj biztosított. A zsírsavtartalom is fontos szerepet játszik: magas zsírtartalom esetén a gombák acetil-CoA-t nyernek, ami serkenti a toxin termelését – különösen alacsony szabad szén- és nitrogénszint mellett. A CMA táptalaj – amely magas antioxidáns- és zsírsavtartalmú, de alacsony glükóz- és nitrogéntartalmú – indukálta a szklerocium képződést, amely a gombák túlélését segíti a természetes környezetben. A CMA „természet-közeli” modellként szolgált, és alkalmas a toxintermelés környezeti induktorainak vizsgálatára – ez újszerű megközelítés a mikotoxinok kutatásában. A tanulmány alátámasztotta, hogy a kukoricahibridek magas zsírtartalma növelheti az AFB1 kontamináció esélyét, még akkor is, ha a hibridek antioxidáns tartalma magas. Vizsgálatunk kiemelte, hogy a táptalaj összetétele – különösen a szén-, nitrogén- és zsírsavtartalom – döntően befolyásolja a mikotoxin-termelést. Kutatásaink arra is rámutattak, hogy az *A. flavus* illetve *A. minisclerotigenes* mikotoxintermelő gombák alkalmazkodóképessége magas, ami fokozza a mezőgazdasági kockázatot. A CMA táptalaj alkalmazása új kutatási irányt nyithat a természetes környezet modellezésében és a biológiai növényvédelem fejlesztésében.

További tanulmányunk rávilágított az *A. flavus* fertőzés és az AFB1 termelés a kukorica fejlődésére, terméshozamára és élelmiszerbiztonságára tett súlyos hatásaira (Mwalugha és mtsai., 2025). Az eredmények alapján a gombafertőzés jelentősen csökkent a csőhosszra jutó szemszámot, elsősorban a tápanyagokért folytatott verseny, a növényi hormonháztartás felborulása és az aflatoxinok toxikus hatása révén. A kutatás kiemelte az öntözés és nitrogéntrágyázás kulcsfontosságú szerepét a fertőzés hatásainak mérséklésében: a megfelelő víz- és tápanyagellátás javítja a növény fiziológiai ellenálló képességét, csökkentve az AFB1-felhalmozódást. Az eredmények hangsúlyozták a környezeti feltételek – különösen a vízhiány és a tápanyaghiány – által kiváltott stresszhatások szerepét a gombás fertőzések és mikotoxin-bioszintézis fokozódásában. A kutatás során a SY Orpheus hibrid stressztűrésének

köszönhetően stabil makrotápanyag- és polifenol-tartalmat mértünk, ami potenciálisan előnyös lehet a rezisztencia-nemesítésben. A tanulmány hozzájárul a fenntartható kukoricatermesztés stratégiáinak kialakításához, különösen a klímaváltozás okozta kihívások közepette, és alátámasztja, hogy a precíziós tápanyag- és vízgazdálkodás csökkentheti a toxinterhelést és növelheti a termésbiztonságot.

További munkánk három tejsavbaktérium-törzs – *L. plantarum* FCW4 és CB2, valamint *L. fermentum* SD4 – antifungális és mikotoxin-csökkentő képességét vizsgálta különböző gabonákon és fermentációs körülmények között (Krishnan és mtsai., 2025a). A kutatás fő célja az volt, hogy ezek a törzsek biológiai növényvédő szerként (biokontroll-ágensként) alkalmazhatók-e az élelmiszerláncban, különösen gabonafélékben gyakran előforduló *Fusarium* fajok és mikotoxinjaik ellen. A kiválasztott LAB törzsek jelentős gombaellenes aktivitást mutattak, különösen a *F. graminearum* és *F. verticillioides* ellen. A sejtmentes fermentlé is gátolta a gombák növekedését, ami lehetőséget teremt élő mikroorganizmus nélküli alkalmazásra is. A *L. fermentum* SD4 törzs bizonyult a leghatékonyabbnak a mikotoxinok csökkentésében, különösen ZEA esetében (~90%). A fermentációs körülmények és a mikotoxinok jelenléte jelentősen befolyásolták a LAB hatékonyságát. A törzsek használata nemcsak a gomba fertőzések visszaszorításában, hanem a növények növekedésének fokozásában is ígéretesnek bizonyult. A kutatás új, környezetbarát stratégiát kínál a gabonák mikotoxin- és gombafertőzésének csökkentésére biológiai úton. Ez hozzájárulhat a fenntartható mezőgazdasághoz, élelmiszerbiztonsághoz és takarmányminőséghez, különösen a *Fusarium* gombák által veszélyeztetett kultúrák esetében.

További tanulmányunk *W. confusa* törzsek gombaellenes tulajdonságait vizsgálta, különös tekintettel a *Fusarium* fajokkal szembeni hatékonyságra (Krishnan és mtsai., 2025b). A kutatás megállapította, hogy bár a *W. confusa* képes hatékonyan gátolni mikotoxintermelő gombák (pl. *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*) növekedését, a mikotoxinok mennyiségének csökkentésére nem alkalmas. A *W. confusa* törzsek aktívan gátolták a gombaspórák csírázását és növekedését, különösen a korai micéliumfejlődési szakaszban. A sejtmentes fermentlé etil-acetát kivonatai kifejezett antifungális hatást mutattak *Fusarium* fajokkal szemben. A gátló hatás szerves savaknak és potenciális bakteriocinoknak tulajdonítható. A kutatás új ismereteket nyújtott a kevésbé ismert, ipari szinten nem alkalmazott *W. confusa* potenciális biokontroll szerepéről. Bár mikotoxin-degradációra nem alkalmas, ígéretes alternatíva lehet biofungicidként a mezőgazdaságban, különösen megelőző alkalmazásra a *Fusarium* és más gombák elleni védekezés során.

Egy tanulmányunk azt vizsgálta, mennyire hatékony az erjesztés a mikotoxinok – különösen a *Fusarium* eredetű DON és ZEA – eltávolításában az állati takarmányból, főként kukoricaszilázs és lucerna esetén (Adácsi és mtsai., 2022a). Az erjesztett takarmányok gyakran tartalmaznak magas DON koncentrációt. Az erjesztés nem minden esetben csökkenti a mikotoxin szinteket – sőt, bizonyos körülmények között a DON koncentrációja nőhet. A mikotoxin-szintek a betakarítás előtti fertőzésre is visszavezethetők, mivel az erjedési körülmények (anaerob környezet, alacsony pH) nem minden gombafaj számára kedvezők. A LAB fontos szerepet játszik a fermentációban, nemcsak a tartósításban, hanem potenciálisan a mikotoxinok elleni védekezésben is (pl. *L. buchneri*, *L. plantarum*). Egyes nem tejsavbaktériumok (pl. *L. fusiformis*, *R. suwonensis*, *B. thuringiensis*) is mikotoxin-elimináló képességgel rendelkeznek, ami új biotechnológiai lehetőségeket vet fel. A kutatásunk tehát rávilágított, hogy az erjesztés önmagában nem garantálja a mikotoxinmentességet, sőt egyes esetekben a mikotoxinok szintje emelkedhet. A mikrobiális összetétel és a környezeti tényezők döntően befolyásolják a végeredményt. A LAB és más potenciális mikotoxinbontó baktériumok tudatos alkalmazása új lehetőséget kínálhat a biztonságosabb takarmány előállításához, de további kutatások szükségesek az optimális alkalmazásukhoz.

Egy további tanulmányunk célja különböző Gram-pozitív baktériumok (élő, elölt és sejtfalfrakcióik) mikotoxin-elimináló képességének vizsgálata volt, különös tekintettel az AFB1, ZEA és DON eltávolítására (Adácsi és mtsai., 2022b). A vizsgált baktériumok között szerepeltek újonnan azonosított törzsek (pl. *R. suwonensis* AMK9/2 és *L. boronitolerans* AMK9/1), amelyek mikotoxin-megkötő képességéről eddig nem állt rendelkezésre adat.

A baktériumsejtfal fő komponensei – különösen a peptidoglükán és teikolsavak – kulcsszerepet játszanak a mikotoxinok megkötésében. A hő- és savkezelés módosította a sejtfalszerkezetet, növelve a mikotoxinok megkötésére alkalmas helyek számát (pl. pórusméret nőtt, fehérjék denaturálódtak). A DON elimináció nem volt sikeres a vizsgált törzsek és frakciók esetén – ez arra utal, hogy ezen törzsek nem rendelkeznek megfelelő adszorpciós vagy enzimes bontási képességgel DON-ra. AFB1 esetében a *B. thuringiensis* törzs S-réteg és teikolsav-frakciói mutatták a legjobb eliminációs eredményeket. A ZEA eltávolítás hatékonyságát szintén befolyásolta a sejtfal komponenseinek szerkezete és kezelése. A hőkezelt sejtek általában hatékonyabbak voltak, mivel megnőtt a kötőhelyek száma. Az enzimes bontás szerepe a ZEA eliminációban valószínű, de nem domináns – az adszorpció bizonyult fő mechanizmusnak, különösen a sejtfal szénhidrát összetevői révén. A *R. suwonensis* magas sejtfalhoz kötött észteráz aktivitást mutatott, de ez nem korrelált a ZEA eltávolítási képességgel.

A kutatás hozzájárul a baktériumalapú mikotoxin eliminációs technológiák fejlesztéséhez, különösen a nem élő sejtes és sejtfal-alapú biotechnológiák területén. A kutatás új törzsek mikotoxin-megkötő potenciálját tárta fel, és rávilágított arra, hogy a sejtfal szerkezeti komponenseinek specifikus kezelése (pld. hő, sav) fokozhatja az adszorpciós képességet. Ez elősegítheti a hatékonyabb, sejtmentes detoxifikációs eljárások kidolgozását a takarmány- és élelmiszeripar számára.

Egy másik tanulmányunk célja az AFM1 különböző koncentrációinak hatásvizsgálata volt ipari probiotikus baktériumtörzsek növekedésére és toxinmegkötő képességére (Adácsi és mtsai., 2023). Az AFM1 jelenléte általában nem befolyásolta jelentősen a baktériumok növekedését. A tejből történő AFM1-eltávolítás szempontjából a legnagyobb hatékonyságot a TCA-kezeléssel nyert peptidoglükán frakciók mutatták (*L. lactis* R703: 58%, *B. animalis* BB12: 60%). A sejtfal más frakcióinak és az élő sejteknek a toxinmegkötő képessége jóval gyengébb volt. A kötési képességet nem növelte sem a hosszabb inkubációs idő, sem a nagyobb biomassza mennyiség. Az AFM1-megkötés tehát főként a peptidoglükánhoz kapcsolódik, amelyet hő- és savkezelés (TCA) hozzáférhetőbbé tett. A kötés jellege nem kovalens, részben reverzibilis, és független az inkubációs idő hosszától.

#### 4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Megállapítottam, hogy az aflatoxin génklaszter gének közül az *Aspergillus* fajokban a *norA* és *aflR* gének a legjobb genetikai indikátorok, de szekció szintű elkülönítésre sem alkalmasak és kimutatásuk nem garantálja a toxintermelés tényleges meglétét. .
- Megállapítottam, hogy a kukorica alapú (CMA) táptalaj – amely magas antioxidáns- és zsírsavtartalmú, de alacsony glükóz- és nitrogéntartalmú – indukálja a szklerocium képződést, amely a gombák túlélését segíti a természetes környezetben. CMA táptalaj természet-közeli modellt biztosít a mikotoxin-termelés környezeti tényezőinek vizsgálatára. Ezek szerint a kukoricahibridek zsírtartalma befolyásolja az AFB1-szintet és ez a nemesítésnél, illetve kockázatbecslésben fontos információ.
- Megállapítottam, hogy a zsírsavtartalom a növényi polifenol tartalomtól függetlenül határozza meg az aflatoxin termelést.
- Megállapítottam az agronómiai beavatkozások hatásvizsgálata alapján, hogy az öntözés és nitrogén-trágyázás csökkenti az AFB1-felhalmozódást és javítja a növényi stresszrezisztenciát. Tehát a precíziós gazdálkodás szerepe a gombás fertőzések megelőzésében, különösen a jelenlegi klímaváltozás idején, megnő.
- Megállapítottam a fermentált takarmányok mikotoxin-tartalmának vizsgálatával, hogy a kevert tenyészzettel történő fermentációban a *Fusarium* mikotoxinok egy része redukálható. Megállapítottam, hogy a *Fusarium* mikotoxinok közül a DON koncentrációja növekedhet a kukorica erjesztése során. A fermentáció hatékonysága erősen függ a mikrobiális összetételtől és körülményektől és ez új lehetőségek nyit a LAB és más baktériumok célzott alkalmazásában.
- Elsőként vizsgáltam a *Weissella confusa*, *Rummeliibacillus suwonensis* és *Lysinibacillus boronitolerans* mikotoxin-redukáló képességét.
- Igazoltam a *L. fermentum* SD4 törzs erős ~90%-os ZEA-csökkentő képességét és gombaellenes hatását. Ennek jelentősége: potenciális alkalmazása élő és sejtmentes formában is biofungicidként, ami környezetbarát alternatíva.
- Megállapítottam, hogy a Gram-pozitív baktériumok hőkezelt sejtfal preparátumai (főként peptidoglükán, teikolsav) fokozottan képesek a ZEA és AFB1 megkötésére. Élettelen sejtek használata sejtfalalapú detoxifikációra új biotechnológiai irány lehet.

- Megállapítottam, hogy a Gram-pozitív sejtfalfrakciók közül a TCA-val kezelt peptidoglükán a leghatékonyabb az AFM1 eltávolításra (*Lactococcus lactis* R703: 58%, *Bifidobacterium animalis* BB12: 60%). Jelentősége: élő sejtek helyett sejtfal-komponensek használata a tej detoxifikációban lehetséges, mert stabil, de reverzibilis kötés van jelen.
- Először írtam le, hogy a *Weissella confusa* sejtmentes fermentlé etil-acetát kivonatai kimagasló antifungális hatást mutatnak, de a sejtek nem csökkentik a mikotoxinszintet. Ez a baktérium a gombafertőzések korai kezelésében ígéretes, de nem alkalmas detoxifikációra.

## 5. A TÉZISEKBEN SZEREPLŐ HIVATKOZÁSOK

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W., 2013. GenBank. Nucleic Acids Research, 41(D1), D36-D42.

Castillo, I., Requena, T., De Palencia, P.F., Fontecha, J. and Gobbetti, M., 1999. Isolation and characterization of an intracellular esterase from *Lactobacillus casei subsp. casei* IFPL731. Journal of Applied Microbiology, 86(4), pp.653-659.

Casu, A., Camardo Leggieri, M., Toscano, P. and Battilani, P., 2024. Changing climate, shifting mycotoxins: A comprehensive review of climate change impact on mycotoxin contamination. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 23(2), p.e13323.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal., 10(3), pp.178–182.

Christensen, S., Borrego, E., Shim, W.B., Isakeit, T. and Kolomiets, M., 2012. Quantification of fungal colonization, sporogenesis, and production of mycotoxins using kernel bioassays. Journal of visualized experiments: JoVE, (62), p.3727.

Clewer, A. G., & Scarisbrick, D. H., 2013. Practical statistics and experimental design for plant and crop science. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England

De Simone, N., López, L., Ciudad, C.S., Scauro, A., Russo, P., Rodríguez, J., Spano, G. and Martínez, B., 2024. Antifungal activity of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fruit and vegetables and detection of novel antifungal VOCs from fungal-LAB co-cultures. Food Bioscience, 58, p.103824.

Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W. and Samson, R.A., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Studies in Mycology, 93(1), pp.1-63.

Gajendran, V.P. and Rajamani, S., 2024. Recent advancements in harnessing lactic acid bacterial metabolites for fruits and vegetables preservation. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 17, pp.2673–2689

Goh, Y.J., Azcarate-Peril, M.A., O'Flaherty, S., Durmaz, E., Valence, F., Jardin, J., Lortal, S. and Klaenhammer, T.R., 2009. Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Applied and Environmental Microbiology, 75(10), pp.3093-3105.

Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D., Frisvad, J.C. and Samson, R.A., 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(2), pp.477-486.

ISO 15214:2005; Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 °C. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland; 2005.

ISO 4833-1:2013; Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms—Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland; 2013.

ISO 6496:1999; Animal Feeding Stuff—Determination of moisture and other volatile matter content. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 1999.

ISO 7954:1987; Microbiology — General guidance for enumeration of yeasts and moulds — Colony count technique at 25 degrees C. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 1987.

Kaur, C. and Kapoor, H.C., 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science and Technology, 37(2), pp.153-161.

Kim, E., Yang, S.M., Lim, B., Park, S.H., Rackerby, B. and Kim, H.Y., 2020. Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 *Lactobacillus* species in a single 96 well plate. BMC Microbiology, 20(1), p.96.

Moretti, A., Pascale, M. and Logrieco, A.F., 2019. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. Trends in Food Science & Technology, 84, pp.38-40.

Nakashima, Y., Yamauchi, N. and Murano, H., 2025. Suppressive effects of *Levilactobacillus brevis* on *Fusarium*-plant disease and its potential contribution to environmentally friendly agriculture. Biological Control, 205, p.105758.

Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Aboab, B., Lemaire, M. and Boudra, H., 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology, 106(3), pp.977-985.

Oliveira, P.M., Zannini, E. and Arendt, E.K., 2014. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. Food Microbiology, 37, pp.78-95.

Paswan, M., Adhikary, S., Salama, H.H., Rusu, A.V., Zuurro, A., Dholakiya, B.Z., Trif, M. and Bhattacharya, S., 2023. Microbial synthesis of lactic acid from cotton stalk for polylactic acid production. Microorganisms, 11(8), p.1931.

Pinton, P., Terciolo, C., Payros, D. and Oswald, I.P., 2025. Mycotoxins hazard: the European view. Current Opinion in Food Science, 63, p.101306.

Varga, J., Frisvad, J.C. and Samson, R., 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Studies in Mycology, 69(1), pp. 57-80.

Weber, M., Liscio, M.C., Bregoli, D. and Sospiro, P., 2025. From agriculture to agroindustry: the European Union Farm to Fork policy. Journal of Industrial and Business Economics, pp.1-23. <https://doi.org/10.1007/s40812-025-00355-2>

White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds): PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, CA, 18(1), pp.315-322.

## 6. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ, REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Adácsi, C., Kovács, S. and **Pusztahelyi, T.**, 2023. Aflatoxin M1 binding by probiotic bacterial cells and cell fractions. *Acta Alimentaria*, 52(4), pp.579-588.

Adácsi, C., Kovács, S., Pócsi, I. and **Pusztahelyi, T.**, 2022b. Elimination of deoxynivalenol, aflatoxin B1, and zearalenone by Gram-positive microbes (Firmicutes). *Toxins*, 14(9), p.591.

Adácsi, C., Kovács, S., Pócsi, I., Győri, Z., Dombrádi, Z. and **Pusztahelyi, T.**, 2022a. Microbiological and toxicological evaluation of fermented forages. *Agriculture*, 12(3), p.421.

Kovács, S. and **Pusztahelyi, T.**, 2017. Survey of the aflatoxin gene cluster in *Aspergilli* from Hungarian crops. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 52(2), pp.169-176.

Kovács, S. and **Pusztahelyi, T.**, 2018. Investigation of polyphenol resistance of *Aspergillus flavus* on cornmeal media. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 53(2), pp.163-170.

Krishnan, S.V., Anaswara, P.A., Nampoothiri, K.M., Kovács, S., Adácsi, C., Szarvas, P., Király, S., Pócsi, I. and **Pusztahelyi, T.**, 2025a. Biocontrol activity of new lactic acid bacteria isolates against *Fusaria* and *Fusarium* mycotoxins. *Toxins*, 17(2), p.68.

Krishnan, S.V., Anaswara, P.A., Nampoothiri, K.M., Kovács, S., Adácsi, C., Miklós, I., Király, S., Pócsi, I. and **Pusztahelyi, T.**, 2025b. Unveiling the perspective on *Weissella confusa* as a promising biocontrol agent against *Fusaria*. *Microorganisms*, 13(3), p.666.

Mwalugha, H.M., Molnár, K., Rácz, C., Kovács, S., Adácsi, C., Dövényi-Nagy, T., Bakó, K., Pócsi, I., Dobos, A. and **Pusztahelyi, T.**, 2025. Irrigation, nitrogen supplementation, and climatic conditions affect resistance to *Aspergillus flavus* stress in maize. *Agriculture; Basel*, 15, p. 767.

## 7. A DOLGOZATBAN FEL NEM HASZNÁLT, DE ANNAK TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

Acs-Szabo, L., Pfliegler, W.P., Kovács, S., Adácsi, C., Rácz, H.V., Horváth, E., Papp, L.A., Murvai, K.P., Király, S., Miklós, I. and Péter, G., **Pusztahelyi, T.**, Pócsi, I. 2025. Striking mycotoxin tolerance and zearalenone elimination capacity of the decaying wood-associated yeast *Sugiyamaella novakii* (Trichomonascaceae). BMC Microbiology, 25(1), p.422.

Farkas, Z., Országh, E., Engelhardt, T., Csorba, S., Kerekes, K., Zentai, A., Süth, M., Nagy, A., Miklós, G., Molnár, K., Rácz, C., Dövényi-Nagy, T., Ambrus, Á., Győri, Z., Dobos, A. C., **Pusztahelyi, T.**, Pócsi, I., & Jóźwiak, Á. 2022. A systematic review of the efficacy of interventions to control aflatoxins in the dairy production chain—feed production and animal feeding interventions. Toxins, 14(2), p. 115.

Horváth, E., **Pusztahelyi, T.**, Adácsi, C., Tanyi, E. and Pócsi, I., 2022. Optimization and validation of ELISA for aflatoxin B1 detection in fermented forages and feeds. Scientifica, 2022(1), p.6059880.

Krishnan, S.V., Nampoothiri, K.M., Suresh, A., Linh, N.T., Balakumaran, P.A., Pócsi, I. and **Pusztahelyi, T.**, 2024. *Fusarium* biocontrol: Antagonism and mycotoxin elimination by lactic acid bacteria. Frontiers in Microbiology, 14, p.1260166.

Loi, M., Logrieco, A.F., **Pusztahelyi, T.**, Leiter, É., Hornok, L. and Pócsi, I., 2023. Advanced mycotoxin control and decontamination techniques in view of an increased aflatoxin risk in Europe due to climate change. Frontiers in Microbiology, 13, p.1085891.

Molnár, K., Rácz, C., Dövényi-Nagy, T., Bakó, K., **Pusztahelyi, T.**, Kovács, S., Adácsi, C., Pócsi, I. and Dobos, A., 2023. The effect of environmental factors on mould counts and AFB1 toxin production by *Aspergillus flavus* in maize. Toxins, 15(3), p.227.

Murvai, K.P., Rácz, H.V., Horváth, E., Németh, B., Imre, A., Pereira, K.N.O., Antunovics, Z., Peles, F., Sipos, P., Béri, B., **Pusztahelyi, T.**, Pócsi, I., Pfliegler, W.P., 2024. The bacterial and yeast microbiota in livestock forages in Hungary. BMC Microbiology, 24(1), p.340.

Papp, L.A., Acs-Szabo, L., Kovács, S., Adácsi, C., Batta, G., **Pusztahelyi, T.**, Pócsi, I. and Miklós, I., 2025. Transcriptome changes of fission yeast cells exposed to fumonisin B1 or co-cultured with *Fusarium verticillioides*. Applied Microbiology and Biotechnology, 109(1), pp.1-16.

Pfliegler, W.P., **Pusztahelyi, T.** and Pócsi, I., 2015. Mycotoxins—prevention and decontamination by yeasts. Journal of Basic Microbiology, 55(7), pp.805-818.

**Pusztahelyi, T.** and Pócsi, I., 2013. Functions, cooperation, and interplays of the vegetative growth signaling pathway in the Aspergilli. Journal of Mycology, 2013(1), p.832521.

**Pusztahelyi, T.**, Holb, I.J. and Pócsi, I., 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. Frontiers in Plant Science, 6, p.573.

**Pusztahelyi, T.**, Radócz, L., Gellért, C., Kovács, S., Szabó, Z., Pócsi, I. and Vad, A., 2017. Effect of preventive and curative fungicide treatment on *Fusarium proliferatum*-infected maize—a field trial. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 52(1), pp.29-38.

Recalde-Soliz, V., Brendzsák, B., Győri, Z. and **Pusztahelyi, T.**, 2025. A tej és a tejtermékek mikotoxinszennyezettsége Európában—Áttekintés. *Scientia et Securitas*, 6(1-2), pp.139-150.

Szabó, Z., Pákozdi, K., Murvai, K., **Pusztahelyi, T.**, Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Logrieco, A.F., Emri, T., Ádám, A.L., Leiter, É. and Hornok, L., 2020. FvafA regulates growth, stress tolerance, as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18), pp.7879-7899.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönet illeti a Debreceni Egyetem vezetőségét, hogy biztosították a kutatás feltételeit.

Örök hálával tartozom mentoromnak, aki egyetemi hallgató koromtól támogatta kutatásomat: Prof. Dr. Pócsi István (DE TTK Biotechnológiai Intézet Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék). Hálával tartozom volt és jelenlegi kutatóhelyeim dolgozóinak: DE TTK Biotechnológiai Intézet Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék; DE MÉK Agrárműszerközpont.

A dolgozatban bemutatásra került kutatások sikerében elévülhetetlen érdemmel bírnak:

- végzett és jelenlegi doktoranduszaim: Dr. Kovács Szilvia, Dr. Adácsi Cintia, Heltan M. Mwalungha, Brendzsák Barbara;
- munkatársaim: Pákozdi Hajnalka, Tóth-Bogárdi Andrea, Tóth Gáborné, Tózsér Martin, Sörös Istvánné, Kiss Csaba és Békési Ádám szakmai szolgáltatók (DE MÉK Agrárműszerközpont);
- a kukorica termesztés és szenzoros adatgyűjtés megvalósításáért: Dr. Dobos Attila tudományos tanácsadó és munkacsoportja (DE MÉK Precíziós Növénytermesztési Kutatás-fejlesztési Szolgáltató Központ);
- a kukorica termesztés területéért: a DE AKIT;
- a törzsgyűjteményi segítségéért, és az izolátumok fenntartásáért: Dr. Péter Gábor (MATE Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye);
- a MALDI-TOF analízisek kivitelezéséért: Zudorné dr. Dombrádi Zsuzsanna Rita (DE Klinikai Központ, Egészségügyi Szolgáltató Egységek, Diagnosztikai Egységek, Orvosi Mikrobiológia);
- a kukorica mag precíz vágásáért: Szarvas Pál (DE MÉK Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központ) és Király Szabina (DE MÉK Biotechnológiai Intézet Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék);
- LAB izolátumokért: Prof. Madhavan. K. Namphoothiri és munkacsoportja (Microbial Processes and Technology Division (MPTD), CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), Thiruvananthapuram, India;
- az eltérő kukorica termékekért: Agri-Corn Kft. (Monostorpályi);

- a takarmány és tejminták gyűjtéséért: Prof. Dr. Peles Ferenc és Prof. Dr. Sipos Péter (DE MÉK) és az Alföldi Tej Kft. (Debrecen);

- a szekvenálások kivitelezéséért: BIOMI Kft. (Gödöllő) és UD-GENOMED Kft. (Debrecen).

Hálásan köszönöm az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K100464 és OTKA K108333) támogatását. Az indiai Tudományos Technológiai Osztály (DST) az Indo-Magyarország Nemzetközi Projekt pénzügyi támogatását [DST/INT/Hun/P-27/2020(G) Dátum: 9.7.2021]. Továbbá a 2018-1.2.1-NKP-2018-00002 számú projekt, a TKP2020-IKA-04 és TKP2021-EGA-20 (Biotechnológia), és a 2019-2.1.13-TÉT\_IN-2020-00056 számú projekt kapcsán a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatását.