

Tejsavbaktériumokkal a fonalas gombák mikotoxinjai ellen

Kovács Szilvia ¹, Adácsi Cintia ¹, Szarvas Pál ², Király Szabina ³, Miklós Ida ⁴, Nampoothiri Kesavan Madhavan ⁵, Pócsi István ³, Pusztahelyi Tünde ¹

¹ Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Agrárműszerközpont, Debrecen

² Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központ, Nyíregyháza

³ Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai Intézet, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen

⁴ Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai Intézet, Alkalmazott Genetika Tanszék, Debrecen

⁵ Microbial Processes and Technology Division, CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology, Thiruvananthapuram, India

Összefoglalás

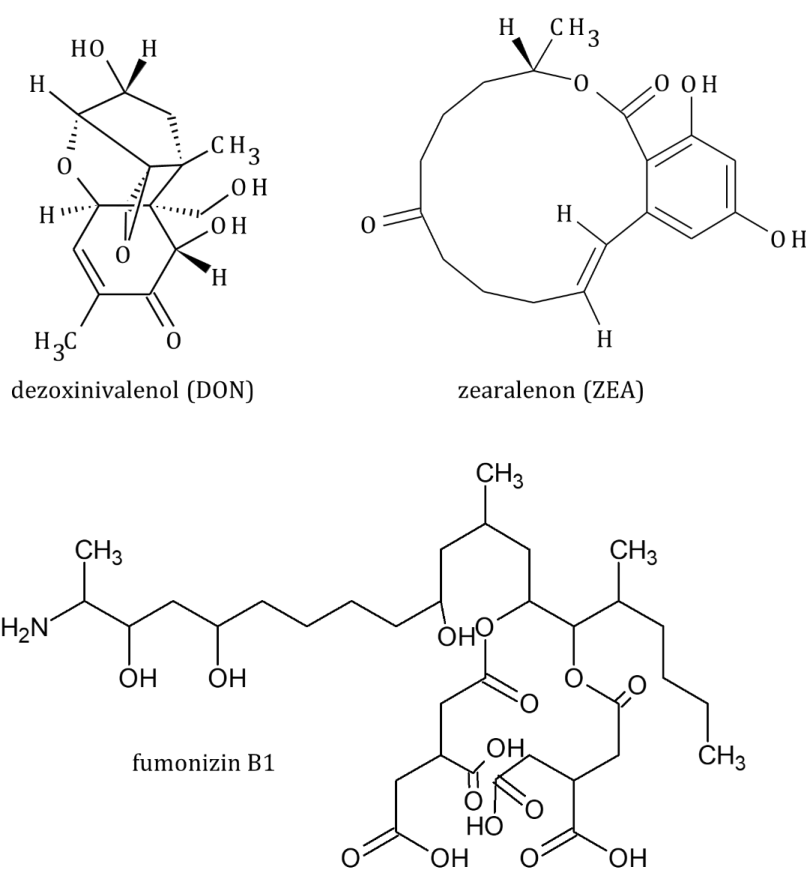
A fonalas gombák által termelt mikotoxinok világszerte jelentős gazdasági kárt és egészségügyi kockázatot okoznak. A mikotoxinok eltávolításának hagyományos fizikai és kémiai módszerei korlátozott hatékonyságúak, és a tejsavbaktériumok (LAB) ígéretes biológiai védekezési lehetőséget adnak biztonságosságuk és a gombák növekedésének gátlására való képességük miatt, miközben csökkentik a mikotoxinszintet. A különböző LAB-fajok törzsspecifikus hatékonysága a *Fusarium* gombák ellen és a mikotoxinok lebontásának változó képessége azonban továbbra is kevésbé ismert. Ezért több LAB-törzset izoláltunk és jellemeztünk, hogy értékeljük gombaellenes és mikotoxin-redukciós képességüket. Eredményeink azt mutatták, hogy a LAB-törzsek erős *Fusarium*-antagonista aktivitást mutattak, és általános rezisztenciát mutattak a mikotoxinokkal szemben, különösen jelentős képességgel a ZEA-koncentráció csökkentésére. A tesztelt LAB-törzsek, különösen a *L. fermentum* SD4 és a *L. plantarum* CB2, ígéretes biológiai védekezést képviselnek, amelyek hatékonyan gátolják a *Fusarium* fajokat, csökkentik a mikotoxinszintet és javítják az erjesztett takarmány minőségét. A vizsgált *Weissella confusa* törzsek kiváló *Fusarium elleni* biológiai védekezést mutattak, de nem voltak alkalmasak a mikotoxinszint csökkentésére. Jelen ismereteinkkel törzsspecifikus alkalmazásokat hozhatunk létre az átfogó mikotoxin-kezelési stratégiákhoz.

Kulcsszavak: *Fusarium*, mikotoxin, tejsavbaktérium, probiotikum

1. Irodalmi áttekintés

A fonalas gombák által termelt mikotoxinok kis molekulatömegű szekunder metabolitok. A mikotoxinok általában a környezeti tényezők széles spektrumával szemben rezisztensek és lassan bomlanak le. A világ gabonakészletének 25%-a, a termesztett növények 20%-a lehet mikotoxin-nal fertőzött, egyes tanulmányok szerint (JOHNS ÉS MTSAL, 2022). Ez azonban regionális szinten eltérő lehet a helyi termesztési és tárolási folyamatoktól függően (VARSHA, 2015; BRYLA ÉS MTSAL, 2018). Főként az *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* és a *Claviceps* nemzetségekbe tartozó gombák okoznak mikotoxikózist emberekben és állatokban egyaránt (CINAR ÉS ONBAŞI, 2019).

A *Fusarium* nemzetség mikotoxinjai közül a fumonizinek (FUM, pl. FB1), a dezoxinivalenol (DON), és a T2/HT2 toxinjai a leginkább veszélyesek az emberi és állati egészségre nézve (1. ábra) (MUNKVOLD ÉS MTSAL, 2021; KRISHNAN ÉS MTSAL, 2024). A DON és a T2 kémiai szerkezetét tekintve a trichotecének közé tartozik, szeszkviterpén vázas vegyületek, citotoxicitásuk a 12,13-epoxialkilen csoportok és a 9,10 kettős kötések jelenlétének köszönhető, amelyek különböző oldalláncokat tartalmaznak (McCORMICK ÉS MTSAL, 2011). Az A típusú trichotecén toxinok közé tartozik a T-2, a HT-2, a neoszolaniol (NEO) és a diacetoxiszkirpenol (DAS). A B típusú trichotecén toxinok közé tartozik a dezoxinivalenol (DON) és származékai, valamint a nivalenol (NIV), valamint a NIV acetilezett prekursora [4-acetil-nivalenol, más néven fuzarenon-X (FUX)] (KIMURA ÉS MTSAL, 2007) (1. ábra). A DON toxint főként a *Fusarium graminearum* és a *F. culmorum* termeli. Főként szántóföldön termelődik ez a toxintípus, mivel magasabb vízaktivitást igényel a termelése, és jórészt gabonafélékben fordul elő (búza, árpa, zab, rozs, kukorica, rizs), de fellelhető még szójababban, burgonyában, olajos magvakban, és banánban is (BENNETT ÉS MTSAL, 2003). A trichotecének behatolnak a sejtmembrán kettős lipidrétegébe, gátolják a riboszómális fehérjeszintézist és ezáltal megszakad a DNS-, RNS-szintézis folyamata is (RICHARD, 2007). Embereknél a DON hasi fájdalmat, émelygést, hányást, hasmenést, fejfájást, szédülést és lázat okoz (SOBROVA ÉS MTSAL, 2010). Állatoknál lassú növekedést, a szarvasmarháknál a tejtermelés csökkenését, míg tojtyúkknál a tojáshozam csökkenését, bélvérzést, csökkent immunválaszt okoz (PESTKA, 2010). A T-2/HT-2 toxinok megjelenéséért elsősorban a *F. langsethiae*, *F. poae*, és *F. sporotrichioides* gombafajok a felelősek. T-2 toxin lymphocytanekrózist okoz, haematotoxikus, valamint a gyomor-bélrendszerre nézve is toxikus hatása. Nagy dózis kardiovaszkuláris összeomlást okozhat. Allergizáló, bőrirritáló hatása (ADHIKARI ÉS MTSAL, 2017).



1. ábra. A leggyakoribb *Fusarium* mikotoxinok
(Forrás: saját szerkesztés [PubChem-letöltés alapján])

A zearalenont főként a *F. graminearum* és a *F. cerealis* termeli, ösztrogén hatású vegyület. A 17-béta-ösztradiol egy fontos reprodukív hormon, amely szerkezetileg hasonló a zearalenonhoz (ZIELONKA ÉS MTSAL, 2014). A zearalenon nem mutat halálos akut toxicitást és nem virulenciafaktor, hanem ösztrogénhormonhoz hasonló hatást fejt ki, és a reprodukív szerveket befolyásolja (MUNKVOLD ÉS MTSAL, 2017). A zearalenon kompetitíven kötődik az ösztrogénreceptorokhoz, ez meddőséget okoz a szarvasmarhákban, sertésekben, nyulakban. Szarvasmarhában a zearalenon csökkent tejtermeléshez vezet, sertéseknél petefészekatrófiát, gyenge, deformálódott malacokat eredményez (KALLELA ÉS MTSAL, 1984; KOWALSKA ÉS MTSAL, 2016).

A fumonizineket főként a *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, és a *F. nygamai* termeli. A fumonizinek négy csoportra oszthatók (A, B, C és P). Számos FUM-toxint azonosítottak eddig, de a fumonizin B csoportba tartozó FB1 fordul elő leggyakrabban az élelmiszerekben és a takarmányokban (RHEEDER ÉS MTSAL, 2002; DALL'ASTA ÉS MTSAL, 2016). Szerkezetileg a fumonizin a szfinganinhoz hasonló. Az FB1 blokkolja a szfingolipidek bioszintézisét, amely fontos összetevője az eukarióta sejtmembránnak, meghatározó szerepe van a jelátviteli folyamatokban is. Az FB1 befolyásolja az antioxidánsok és az oxidánsok közötti intracelluláris egyensúlyt és szabályozza a génexpressziót (CHEN ÉS MTSAL, 2021). Főként a májat, vesét károsítja, nyelőcsőrákot, valamint a szövetek apoptózisát okozhatja (YAZAR ÉS OMURTAG, 2008). Hidrofil jellege miatt a tejbe nem választódik ki, valamint nem halmozódik fel nagymértékben a szövetekben sem (RICHARD, 2007).

Ugyanakkor a mikotoxinok a különböző mátrixokban sokszor együtt jelennek meg. 127 különböző mikotoxin-kombinációt írtak le eddig, amelyek közül a leggyakoribbak a DON + ZEA, aflatoxin + FUM, aflatoxin + ochratoxin, FUM + ZEA mikotoxin-kombinációk (ALASSANE-KPEMBI ÉS MTSAL, 2017; SMITH ÉS MTSAL, 2016).

A fonalas gombák mikotoxinjainak redukálására fizikai, kémiai és biológiai módszerek is rendelkezésre állnak. A biológiai kontroll során a mikroorganizmusokat vagy az általuk produkált enzimeket használják fel a mikotoxin-szennyezettség csökkentése érdekében.

A biológiai mikotoxin-elimináció hatásmechanizmusának lehetőségei (KARLOVSKY ÉS MTSAL, 2016):

- penészgombák növekedésének és mikotoxin-termelésének közvetlen vagy közvetett gátlása,
- adszorpció különféle sejtalkotók polimer molekuláihoz,
- biotranszformáció nem toxikus metabolitokká,
- sejtalkotókhoz való konjugáció.

A mikotoxin eltávolítására alkalmas baktériumok alkalmazása az élelmiszerekben, takarmányokban szigorú szabályokhoz kötött: nem tartalmazhatnak bakteriális toxinokat, allergéneket, a toxineliminálási folyamat eredményeként kevésbé vagy egyáltalán nem keletkezhet toxikus anyag, valamint az átalakulás nem lehet reverzibilis (KRISHNAN ÉS MTSAL, 2024). A tejsavbaktériumokat már régóta alkalmazzák élelmiszerek, takarmányok biológiai tartósítószerként (MUTHIALDIN ÉS MTSAL, 2020; PETROVA ÉS MTSAL, 2022). A tejsavbaktériumok Gram-pozitív, nem mozgékony, kataláznegatív baktériumok, amelyek endospóra képzésére nem képesek, és tejsavat termelnek primer metabolizmusuk során. Különféle antimikrobiális anyag termelésére is képesek, amelyek segítik az élelmiszeripari tartósítószerként történő felhasználásukat (SHI ÉS MAKTABDAR, 2022). A tejsavbaktériumokat probiotikumként is alkalmazzák élelmiszerekben. Az immunrendszer modulációja révén javíthatják az egészséget, valamint gátolhatják az enteropatogén mikroorganizmusok megtelepedését a bélcsatornában (ARENA ÉS MTSAL, 2018; MASOOD ÉS MTSAL, 2011). A tejsavbaktériumok közül sokat az Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (FDA, USA) általánosan biztonságosnak elismert mikrobáknak tekint (GRAS), és egyes törzsek rendelkeznek az

Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA, EU) minősített biztonsági védelmével is (QPS) (BANGAR ÉS MTSAL, 2022; KRISHNAN ÉS MTSAL, 2024; SADIQ ÉS MTSAL, 2019). A tejsavbaktériumok gombaellenes hatása a kompetitív növekedésből, illetve a rendkívül változatos spektrumú metabolitok termeléséből adódik (például: szerves savak [tejsav, propionsav és ecetsav], etanol, hidrogén-peroxid, diacetil, fenil-tejsav, reuterin, ciklikus dipeptidok, benzoosav, hidroxilezett zsírsavak, metilhidantoin és mevalonolakton, valamint összetettebb termékek, például fehérjeszerű és bakteriocinszerű anyagok) (BANGAR ÉS MTSAL, 2022; SADIQ ÉS MTSAL, 2019; SALMAN ÉS MTSAL, 2022; YÉPEZ ÉS MTSAL, 2017). Ezenkívül a tejsavbaktériumok képesek eltávolítani vagy csökkenteni a mikotoxinokat kémiai vagy enzimatis degradáció, vagy biotranszformáció révén, illetve adszorpció folyamatok segítségével, amely során az élelmiszerben vagy takarmányban a mikotoxinok a sejtfal komponenseihez kötődnek, megakadályozva azok felszívódását (MUHIALDIN ÉS MTSAL, 2020; NASROLLAHZADEH ÉS MTSAL, 2022; SMAOUI ÉS MTSAL, 2023; YÉPEZ ÉS MTSAL, 2017).

Kutatásunk célja az volt, hogy olyan LAB-izolátumokat találjunk, és gyakorlati alkalmazhatóságukat teszteljük, amelyek mikotoxinokkal szemben rezisztensek, képesek a mikotoxinok mennyiségét csökkenteni laboratóriumi körülmények között, illetve kísérleti silózás során, valamint a *Fusarium*-szennyezettség kialakulását gátolják kukoricaszemen. Így ezek a tejsavbaktériumok biokontrollágensként is alkalmazhatók lennének, és hatékonyan csökkenthetnék a takarmányok és élelmiszerek penészgomba-, valamint mikotoxin-szennyezettségét.

2. Anyag és módszer

2.1. Anyagok

A *Fusarium*-kultúrák tenyésztéséhez burgonyadextróz tápközeget alkalmaztunk (PDA és PDB, Hi-Media, Mumbai, Maharashtra, India). A tejsavbaktériumok (LAB) izolálásához és tenyésztéséhez MRS-agart és M17 táptalajokat (Hi-Media, Mumbai, Maharashtra, India) használtunk. Az antagonizmusvizsgálatokhoz Mueller–Hinton-agart (MHA, Hi-Media, Mumbai, Maharashtra, India) alkalmaztunk a gombák és baktériumok együttes tenyésztésére. Ammónium-citrát és nátrium-acetát nélküli, módosított MRS-táptalajt használtunk a LAB- és a *Fusarium* fajok tenyésztéséhez.

2.2. Mikroorganizmusok

A tejsavbaktériumokat (58 izolátum) különböző mátrixokból izoláltuk, mint például kovászból, savanyúságból, káposztából (friss és régi), sajtából, kecsketrágyából, sárgarépből, túróból, kenyérből, tejből, erjesztett kókuszvízből stb. (NIIST, Trivandrum, Kerala, India) és erjesztett takarmányokból (Debreceni Egyetem, Debrecen, Magyarország).

2.3. Tejsavbaktériumok jellemzése

A tiszta tenyészeteket Gram-festéssel, kataláztesztel és MRS-kalcium-karbonát zónaképződési vizsgálatokkal jellemeztük. 0,8 m/m% kalcium-karbonátot tartalmazó MRS-agarra szélesztettük a törzseket, és 37 °C-on 48 órán át inkubáltuk. A kataláznegatív, Gram-pozitív, MRS + CaCO₃ lemezekén zónaképző tenyészeteket választottuk ki a további vizsgálatokhoz (PASWAN ÉS MTSAL, 2023).

2.4. Molekuláris azonosítás

A genomiális DNS-t bakteriális genomiális DNS-extrakciós kittel (G-Spin Intron Biotechnology, Seongnam, Koreai Köztársaság) extraháltuk a gyártó utasításai szerint. PCR-amplifikáció során bakteriális 16S rDNS és *Lactiplantibacillus plantarum* 16S rDNS specifikus primereket használtunk fel. A PCR-reakció során Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS-polimerázt (Thermo Fisher Scientific Life Technologies Inc., CA, USA) alkalmaztunk, a primerek pedig a következők voltak:

1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', 515F: 5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3', Plantarum-F: 5'-GCT GGC AAT GCC ATC GTG CT-3', Plantarum-R: 5'-TCT CAA CGG TTG CTG TAT CG-3' (YUAN ÉS MTSAL, 2022). A PCR-termékeket a BIOMI Kft. (Gödöllő, Magyarország) szekvenálta. A kapott adatokat a MEGA 11 (11.0.13. verzió) programmal elemeztük. A kapott szekvenciákat benyújtottuk az NCBI Génbankhoz (BENSON ÉS MTSAL, 2013).

2.5. Izolált baktériumok mikotoxin-rezisztenciája

A rezisztenciatesztekhez a BIOPURE mikotoxinoldatokat (Romer Labs, Tulln, Austria) használtunk megfelelő hígításban. A mikotoxinokat 2 mg/L végkoncentrációban adtuk a tenyészetekhez. A baktériumokat mikotoxinokkal inkubáltuk 24 órán át 30 °C-on mikrotiterlemez-olvasóban (Synergy HTX Multimode Reader, BioTek, Winooski, VT, USA) (ADÁCSI ÉS MTSAL, 2022). Az elemzések alapján az 5%-os növekedésgátlást tekintettük a kontrolltól statisztikailag szignifikánsan eltérő minimális szintnek ($p < 0,05$).

2.6. Mikotoxin-elimináció rezisztens baktériumokkal

A mikotoxin-eliminációs vizsgálatokhoz megfelelő hígítású BIOPURE mikotoxinoldatokat használtunk fel (Romer Labs, Tulln, Austria), MRS-tápfolyadékban (ADÁCSI ÉS MTSAL, 2022). Az elemzések alapján a mikotoxin-koncentráció 15%-os csökkenését tekintettük a kontrolltól statisztikailag eltérő minimális szintnek ($p < 0,05$).

2.7. Kísérleti silózás

A silózáshoz szükséges kukoricanövényt a Debreceni Egyetem, MÉK Bemutatókertjében termesztettük, a Debreceni Egyetem, MÉK, Precíziós Növénytermesztési Kutatás-fejlesztési Szolgáltató Központja (Debrecen, Magyarország) segítségével. A teljes növekedési fázisban begyűjtött kukoricanövényt felaprítottuk és 0,1%-os hangyasavval kezeltük, majd ehhez adtuk a *Fusarium*-mikotoxinokat tartalmazó referenciaanyag-mintákat (Multitoxin in corn 10003627, BIOPURE, Romer Labs, Tulln, Ausztria). Szárastömegre számítva a mesterséges szennyezés $2,13 \pm 0,715$ mg/kg FUM, $0,625 \pm 0,140$ mg/kg DON és $141,5 \pm 36,65$ µg/kg ZEA adásával történt. 16 órás tejsavbaktérium-tenyészetet alkalmaztunk az inokuláció során $5,5 \times 10^8$ [telepképző egység (TKE)]/kg koncentrációban. Négy különböző szilázst készítettünk: kontroll, mikotoxinnal szennyezett, mikotoxinnal szennyezett és tejsavbaktériumokkal oltott, illetve csak tejsavbaktériumokkal oltott. A fermentáció végén meghatároztuk a szárazanyag-tartalmat, a mikrobiológiai minőséget, a pH-t, az illósav-tartalmat és a mikotoxinok mennyiségét. A minták tejsavtartalmát HPLC-DAD módszerrel analizáltuk. A szűrt mintát Phenomenex (Torrance, CA, USA) RP-C18 oszlopra (125 × 4 mm, 5 µm) vittük fel DAD-detektorral UV 218 nm-en, acetonitril/víz (10:90) eluens felhasználásával. Az ecetsavmérés gázkromatográfiás módszerrel történt: Varian CP 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) Variant CP-Wax 52 CB detektorral, 30 m × 0,25 mm ID; 0,25 µm kolonna, és lángionizációs detektorral (FID) 230°C-on. A vivőgáz 2,0 mL/perc hélium volt, állandó áramlással. Az injektort 240°C-ra állítottuk be, 1:10 arányú osztás mellett, a befecskendezett térfogat pedig 1 µL volt. A beállított hőmérsékleti program 95 °C, 14,5 °C/perc és 185 °C (hőmérsékleten tartás: 2,5 perc) volt. A LOD 0,002 (m/m)% volt ($n = 3$).

2.8. Mikotoxinmérés IAC-HPLC-FLD módszerrel

A DON és a ZEA mennyiségének meghatározását Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Dionex Softron Ltd., Germering, Németország) HPLC-készülékkel végeztük. Minden méréshez Biopure mikotoxin standard oldatokat (Romer Labs, Tulln, Ausztria) használtunk megfelelő hígításban. A

DON tisztításához VICAM DONtest immunkromatográfiát (Weber Consulting Ltd., Budapest, Magyarország) alkalmaztunk. A HPLC-mérés során Phenomenex RP C18 oszlopot (125 × 4 mm, 5 µm) használtunk DAD-detektorral 218 nm-en, acetonitril/víz (10: 90) eluenssel. A ZEA-análízishez a mintát immunaffinitás-kromatográfiás oszlopra (VICAM ZearalaTest WB HPLC oszlop, Weber Consulting Ltd., Göd, Magyarország) vittük. A HPLC-DAD kimutatáshoz Phenomenex RP C18 oszlopot (150 × 4,5 mm, 5 µm) használtunk ex360 nm-em440 nm-en fluoreszcens detektorral és acetonitril/víz/metanol (46: 46: 8) elúcióval (ADÁCSI ÉS MTSAI., 2022).

2.9. Mikotoxinmérés ELISA-módszerrel

A fumonizinek kimutatását AgraQuant® Fumonizin ELISA (Romer Labs, Tulln, Ausztria) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. Ezt követően a BioTek Synergy HTX Multimode Reader (BioTek, Winooski, VT, USA) segítségével a mintákat 450 nm-en mértük (n = 3, CV% < 5%; LOD 0,2 mg/kg).

2.10. Antagonista tesztek

A baktériumok és gombák külön-külön és együttes tenyésztésére különböző táptalajokat használtunk. A LAB-törzseket MRS-táptalajban tenyésztettük, míg a gombákat PDA-n. Antagonizmus vizsgálatokat vagy MHA-, vagy módosított MRS-táptalajban végeztük. Egy lemezről kiválasztottunk egyetlen baktériumtelepet, és szuszpendáltunk 250 µL steril desztillált vizet tartalmazó csőben. Steril vattapálcikával a tenyészetet a módosított MRS-táptalajlemez felületének felére szélesztettük és 37 °C-on inkubáltuk 48 órán át. Az inkubálás után a lemezeket kivettük, és steril dugófúróval egy gombakorongot helyeztünk a lemez másik felére, majd 30 °C-on inkubáltuk 5-6 napig (n = 3). Kontroll-lemezeket is készítettünk, amelyek csak gombakorongokat tartalmaztak, és 30 °C-on 5-6 napig inkubáltuk. A lemezeket megfigyeltük és összehasonlítottuk a kontroll-lemezekkel, hogy a baktériumok gombanövekedés-gátló hatását megfigyelhessük.

2.11. Bioaktív kivonatok előállítása és korongdiffúziós vizsgálat

250 ml-es MRS-tápközeget 24 órás baktériumkultúrával ($OD_{600nm} = 1$) oltottunk be, és 37 °C-on 48 órán át statikus körülmények között inkubáltuk. Az inkubálás után a sejtmentes felülúszót (CFCS) 8590 × g-vel 15 percig centrifugálással gyűjtöttük össze. A felülúszót egy 1 literes Erlenmeyer-lombikba és kétszeres térfogatú etil-acetátba vittük át, és rázóinkubátorban tartottuk egy órán át. Rázás után a kivonatot választótölcsér segítségével elválasztottuk, és az oldószeres fázist összegyűjtöttük. Az oldószert rotációs bepárlóban (BÜCHI, Flawill, Svájc) elpárologtattuk, és a félig viszkózus, koncentrált mintát összegyűjtöttük és megfelelően szuszpendáltuk. A kapott koncentrált nyers kivonatot korongdiffúziós vizsgálatokhoz használtuk. A *Fusarium* fajokat PDB-ben tenyésztettük, és 2-3 napig inkubáltuk. A korongdiffúziós vizsgálatához a gombaszuszpenziót (0,1 ml) egyenletesen eloszlattuk MHA-lemezeken, majd 50 µl nyers kivonatot steril korongokra vittünk fel, és háromszor helyeztük a gombatenyésztetre. A gátlási zónát 30 °C-on 72 órán át törtenő inkubálás után határoztuk meg.

2.12. Kukoricacsírázási teszt

Ebben a kísérletben hibrid kukoricát (B73, Martonvásár, Magyarország) használtunk. A kukoricaszemek felületét 5 percig 70%-os etanolban fertőtlenítettük, majd rövid ideig steril desztillált vízben, majd 15 percig 100%-os nátrium-hipoklorit-oldatban mostuk. A fertőtlenítés után a szemeket háromszor tíz percig mostuk steril desztillált vízben a fertőtlenítőszer eltávolítása érdekében. Először a szemek endogén *Fusarium*-szennyezettségét teszteltük PDA-lemezeken. Amikor

bebizonyosodott, hogy endogén *Fusarium*-mentesek, egy új kísérletben a fertőtlenített szemeket 0,5 mm mélységben, a csírához közel bevágtuk, hogy elősegítsük a gombás fertőzést, és 24 órán át *F. verticillioides* FGSC 7600 sejtuszuspenziókba (10^3 spóra/ml) áztattuk. A kezelés után a szemeket egy steril Petri-csészébe helyeztük, hogy eltávolítsuk a felesleges mikroba-szuszenziót. A *Fusarium*-szennyezett szemeket 10^8 TKE/ml LAB CFCS-oldatba áztattuk. A kezelés után a szemeket egy steril Petri-csészébe helyeztük, hogy eltávolítsuk a felesleges mikroba-szuszenziót. Ezután a szemeket 330 ml térfogatú, nedves papírtörölt tartalmazó sterilizált üvegekbe helyeztük. Minden kezelést hatszor ismételtünk meg, ismétlésenként öt szemmel ($n = 30$). Az üvegeket kupaakkal zártuk le, és 22°C-on, 800 lux fényintenzitás mellett, 16:8-as fotoperiódussal (CHRISTENSEN ÉS MTSAL, 2012) táptalajban tartottuk. A kísérletet 5 nap elteltével értékeltük, és feljegyeztük a fejlődő növénykékek leghosszabb gyökerének hosszát, a gyökerek számát és a hajtások hosszát. A gombás fertőzöttséget a szemeken a következőképpen értékeltük: 0 – nincs kinövés és 1 – micéliummal borított szemek.

3. Eredmények

3.1. Baktériumtörzsek izolálása, faji identifikáció

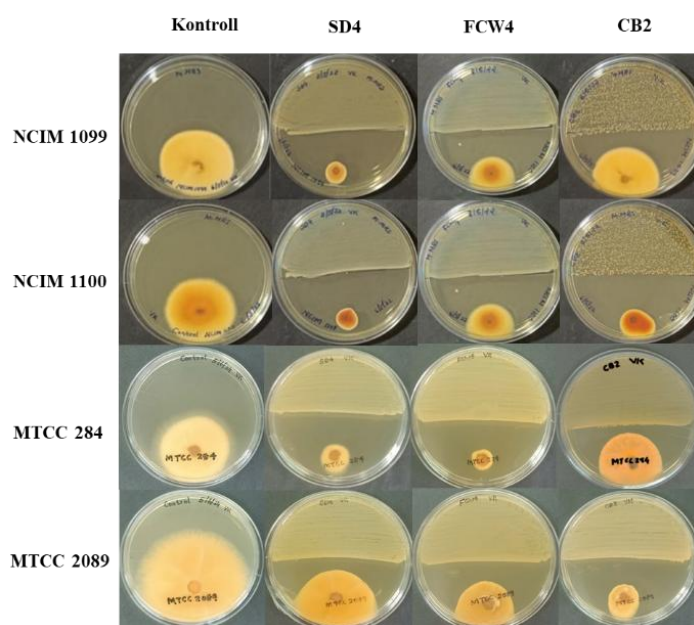
Baktériumokat izoláltunk erjesztett takarmányokból, és a 16S rDNS génszekvenciák felszaporításával és szekvenálásával az izolátumokat 97%-nál nagyobb homológiával azonosítottuk. A kukoricaszilázsából legnagyobb gyakorisággal a *Lactiplantibacillus plantarum* volt izolálható. A lucernaszilázs-mikrobiom nagy százalékát (78%) a *Lactiplantibacillus pentosus* jellemezte, míg a rozsszilázs- és a szénamintákban a *Pediococcus spp.* volt a jellemző baktérium.

Egyéb forrásból izolált tejsavbaktériumok közül a kiválasztott baktériumok faji identifikációját végeztük el speciális PCR segítségével, és a riboszómális 16S DNS gén szekvenálásával. Az SD4 (PP535088) törzs 99,69%-os homológiát mutatott a *Limosilactobacillus fermentum* BLM1.N törzsszel (PQ770680.1), az FCW4 (MT180563) pedig 98,90%-os azonosságot mutatott a *Lactiplantibacillus plantarum* Heal19-cel (CP055123.1). A CB2 (PP784682) törzs magas homológiát mutatott a *Lactiplantibacillus argentoratensis*-szel (100%), de a *L. pentosus*-szal (100%) és a *L. plantarum*-mal (100%) is. Ezért egy másik azonosítási lépést is kellett alkalmazni: *L. plantarum*-ra jellemző primer párt (Plantarum-R, Plantarum-F) használtunk, amely az LPXTG-típusú sejtfal horgonyzódomén-génjét (EFK29584.1) képes kimutatni. A CB2 és FCW4 törzsek azonosságát a Plantarum R és Plantarum F specifikus primerpárral is megerősítettük, és *L. plantarum*-ként azonosítottuk. Az SD4 törzs esetében az 515F-1492R primerpárral végzett PCR eredményét a Plantarum R és Plantarum F specifikus primerpárral bizonyítottuk. Az izolátumok szekvenciáit benyújtottuk a Nemzeti Biotechnológiai Információs Központba (NCBI, USA). A filogenetikai elemzés kimutatta, hogy az SD4-szekvencia szoros összefüggést mutat a *L. fermentum*-típusú törzsek szekvenciáival. A *Weissella*-izolátumokat szintén 16S rDNS nukleinsav PCR alapján azonosítottuk. Az NCBI adatbázisába mint *W. confusa* ML2 törzs 16S riboszómális DNS gén, parciális szekvencia (688bp DNS; PP535080.2) és mint *W. confusa* BF2 törzs 16S riboszómális DNS parciális szekvencia (560bp DNS; PP029339.2) töltöttük fel. Az ML2 szekvenciája 99,47%-os homológiát mutatott, 99%-os lefedettséggel a *W. confusa* HA1 törzs 16S rDNS részleges szekvenciával (MK255068.1). A BF2-szekvencia 100%-os homológiával és 100%-os lefedettséggel bír több *W. confusa* törzsszel; pl. *W. confusa* 1632 16S rDNS, részleges szekvencia (MT597518.1).

Az izolált baktériumok biokémiai jellemzése alapján az izolátumok Gram-pozitív, nem mozgékony, pálcika alakú baktériumok, amelyek lapos, kör alakú, krémszínű telepeket alkotnak. Nem képeznek spórákat és kataláznegatívak.

3.2. Tejsavbaktériumok *Fusarium*-antagonista képességének jellemzése

Ezekhez a vizsgálatokhoz a jellemzett tejsavbaktérium-törzseket együtt tenyésztettük *Fusarium* gombákkal agarlemezen. Kimutattuk, hogy a tejsavbaktérium törzsek gátolták a *Fusarium* fajok növekedését (2. ábra). A statisztikai elemzés szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) mutatott ki a telepkepződésben a *F. graminearum* MTCC 2089 és más gombatörzsekkel történő kezelések során. Az SD4 törzs hasonló, erős gátló hatást mutatott a *F. verticillioides* NCIM 1099 és NCIM 1100 ellen (75%, illetve 73,9%-os gátlás), de szignifikánsan kevésbé volt hatékony a *F. oxysporum* MTCC 284 (57%-os gátlás) és a *F. graminearum* MTCC 2089 ellen. Az FCW4 hatékonyan gátolta a *F. oxysporum* MTCC 284-et (71,4%), és bár kevésbé hatékony a *F. verticillioides* és a *F. graminearum* törzsekkel szemben, mégis legalább 50%-os gátlást ért el ezekkel a fajokkal szemben is. A CB2 aktivitást mutatott mind a *F. graminearum* MTCC 2089 (60%-os gátlás), mind a *F. verticillioides* NCIM 1100 (60,8%-os gátlás) ellen (1. Táblázat).



2. ábra. Antagonizmusteszt

Különböző *Fusarium* gombák növekedésének gátlása LAB-törzsekkel. A *Fusarium verticillioides* NCIM 1099 és NCIM 1100, *F. oxysporum* MTCC 284 és *F. graminearum* MTCC 2089 törzseket *Limosilactobacillus fermentum* SD4, *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4 és *L. plantarum* CB2 törzsekkel teszteltük.

(Forrás: saját szerkesztés)

A LAB-kultúrák etil-acetátos kivonatainak gombaellenes aktivitását is teszteltük korongdiffúziós vizsgálattal, azonos kivonattérfogatokkal. A vizuális vizsgálat és a mérések kimutatták, hogy a *F. verticillioides* NCIM 1099 szignifikánsan érzékenyebb volt a koncentrált LAB-metabolitokra, mint az NCIM 1100 törzs. Minden LAB-törzs erős gátlást mutatott (20 mm-nél nagyobb gátlási zóna) az NCIM 1099 törzzsel szemben. Továbbá az SD4-kivonat szignifikánsan hatékonyabban gátolta a *F. graminearum* MTCC 2089 növekedését, mint a többi törzs kivonata.

1. táblázat. Antagonizmustesztek kiértékelése

Teszt törzs	Kontroll	BF2	ML2	Kontroll	SD4	FCW4	CB2
NCIM 1099	47,6 ± 0,7aB	31 ± 0,8bA	31,7 ± 1bA	48,1 ± 2,9bA	12,2 ± 1,9cD	24,1 ± 1,6bC	36,0 ± 1,7aB
NCIM 1100	58,2 ± 0,8bC	26,4 ± 0,6aA	30 ± 0,7bB	46,2 ± 1,8bA	12,1 ± 1,7cD	24,3 ± 1,7bB	18,1 ± 1cC
MTCC 284	79,4 ± 1,1dC	31,4 ± 1,5bB	26,4 ± 1,1aA	42,3 ± 1,9bA	18,2 ± 1,8bC	12,1 ± 0,8cD	36,1 ± 2aB
MTCC 2089	63,5 ± 1,2cC	42,3 ± 0,7cB	37 ± 0,8cA	60,1 ± 2,7aA	36,3 ± 0,9aB	30,2 ± 1,9aC	24,2 ± 2bD

Különböző *Fusarium* gombák növekedésének gátlása LAB-törzsekkel. A *Fusarium verticillioides* NCIM 1099 és NCIM 1100, a *F. oxysporum* MTCC 284 és a *F. graminearum* MTCC 2089 törzseket *Limosilactobacillus fermentum* SD4, *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4, *L. plantarum* CB2 és *Weissella confusa* BF2 és ML2 törzsekkel teszteltük. Megjelenítjük a gátlási zóna átlagos átmérőjét (mm) és szórását (n = 3). A jelentős különbségeket eltérő betűkkel (p < 0,05) mutatjuk. Kisbetűk jelzik az ugyanazon LAB-kezelés során kapott gombanövekedési eredmények összehasonlítását. Ezzel szemben az eltérő nagybetűk szignifikáns különbségeket mutatnak a gombakultúrák eltérő LAB-kezelései között (p < 0,05).

3.3. A vizsgált tejsavbaktériumok mikotoxin-rezisztenciája és mikotoxin-redukciója

A silótakarmányokból izolált baktériumok mikotoxin-rezisztenciáját vizsgáltuk, hogy lássuk, hogy a fermentációs folyamatokat jelentősen akadályozó bakteriális növekedésgátlás lehetősége fennállhat-e mikotoxin-terhelés alatt. A baktériumok növekedését folyékony tenyészetekben vizsgáltuk mikotoxinok jelenlétében. A mikotoxinnal kezelt és kezeletlen baktériumtenyészetek növekedési görbéi alapján a vizsgált mikotoxin-koncentrációkra vonatkozóan azt a következtetést vontuk le, hogy az izolált tejsavbaktériumok általában erős rezisztenciát mutatnak. A DON (700 µg/L) és a ZEA (100 µg/L) általában nem gátolta a sejtszaporodást. Érdekes módon a DON csak az FCW4 törzset gátolta. A ZEA, T2 és FUM mikotoxinok az SD4 esetében azonos növekedésgátlást okoztak, ezek egymástól szignifikánsan nem különböztek. A CB2 törzs esetében a ZEA szignifikánsan nagyobb növekedésgátlást okozott, mint a T2, az FB1 vagy a DON. A kísérletben az SD4 törzs volt a legérzékenyebb az összes mikotoxinra, kivéve a DON-t. A mikotoxin-redukáló képességet folyékony LAB-kultúrákban is jellemeztük. A tápfolyadékok elemzése a ZEA-koncentráció szignifikáns (p < 0,05) csökkenését mutatta ki a *L. plantarum* FCW4 és CB2 esetében egyórás kezelés alatt (2. táblázat). A többi mikotoxin esetében a törzsek nem csökkentették szignifikánsan a mikotoxin mennyiségét.

2. táblázat. A különböző *Fusarium* mikotoxinokkal kezelt LAB-törzsek mikotoxin-redukciója

Mikotoxin-redukció (%)	DON	ZEA	T2	FB1
FCW4	<15 aA	36,7 ± 2,1 bB	<15 aA	<15 aA
SD4	<15 aA	<15 aA	<15 aA	<15 aA
CB2	<15 aA	45,5 ± 3,2 cB	<15 aA	<15 aA
ML2	<15 aA	<15 aA	<15 aA	<15 aA
BF2	<15 aA	<15 aA	<15 aA	<15 aA

Dezoxinivalenol (DON), zearalenon (ZEA), T2 és fumonizin B1 (FB1) mikotoxinokat alkalmaztunk 2 mg/L-ben a kiválasztott LAB-tenyészeteken: *Limosilactobacillus fermentum* SD4 és *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4 és CB2, és *Weissella confusa* ML2 és BF2 törzsekre MRS-táptalajban. Az átlagértékek és a szórás (n = 3) látható. A jelentős különbségeket különböző betűk jelzik (p < 0,05). A kisbetűk a LAB-törzsek eredményeinek összehasonlítására szolgálnak ugyanazon mikotoxin-kezelés mellett. A nagybetűkkel egy mikotoxin hatásának eltérését mutatjuk.

3.4. Vegyes mikrobiom hatása a mikotoxinok jelenlétére

A szilázsokból ismert mikotoxinokat, például aflatoxinokat, ochratoxin A-t, ZEA-t és DON-t is mértünk. Ezen mikotoxinok előfordulásának oka az *Aspergillus/Penicillium*, valamint a *Fusarium* általi betakarítás előtti és utáni szennyeződés.

A kukoricaszilázsokban elsősorban a DON előfordulását detektáltuk, $0,1 - 3,25 \pm 0,03$ mg/kg koncentrációban. Az átlagos DON-szennyezettség $0,90 \pm 0,01$ mg/kg volt. AFB1 toxint is mértünk a szilázsokban, valamint ennek egy másik, kevésbé toxikus metabolitját, az aflatoxin G2 -t, és néhány szilázs esetében a ZEA toxin előfordulását is kimutattuk. A lucernaalapú erjesztett takarmányokban OTA- és AF-szennyeződést, míg a szilázmintákban pedig DON-t is kimutattunk. A tritikálészenázsban alacsony mikotoxin-tartalmat és viszonylag magas LAB-számot mértünk ($2,5 - 5,3 \log_{10}$ TKE/g).

Az erjesztett takarmányok mezofil aerob mikrobaszáma széles határok között mozgott. Az összes mikrobaszám logaritmikus értékei $3,265$ és $7,254 \log_{10}$ TKE/g között, az MRS-agar táptalajból származó telepszám logaritmikus értékei pedig $1,778$ és $6,167 \log_{10}$ TKE/g között voltak. Az erjesztett takarmányok összes mikrobaszáma szoros kapcsolatban állt az MRS-agaron számolt telepszámmal (főként a tejsavbaktériumokkal), mivel a korrelációs együttható $0,848$ volt, ami erős pozitív korrelációra utalt. A minták nagy részére jellemző volt az alacsony penészs szám ($1,000 \log_{10}$ TKE/g), de néhány minta kiugró penészszenyeződést mutatott ($3,000 - 6,079 \log_{10}$ TKE/g). A magas penésztartalom és a magas mikotoxin-tartalom nem korrelált egymással.

A minták összmikrobaszáma főként LAB-ból állt, és életképes sejtszámuk független volt az erjesztett takarmány végső víztartalmától (a korrelációs együttható csak $0,219$ volt), míg a takarmányok víztartalma $29 - 81\%$ tartomány közé esett. A LAB és a mikotoxinok közötti korreláció csak nagyon gyenge negativitást mutatott (AF: $-0,360$; OTA: $-0,336$).

3.5. Kísérleti silózás

A tejsavbaktériumok antimikrobiális hatása befolyásolhatja a fermentációban résztvevő mikroorganizmusokat, ezért kísérleti silózás folyamata során teszteltük az LAB-izolátumokat természetes, kevert kultúrában. *In vitro* körülmények között szilázst készítettünk *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4, *L. plantarum* CB2 és *Limosilactobacillus fermentum* SD4 izolátumok hozzáadásával. A kísérlet kezdetekor mikotoxin-keveréket is adtunk a nyers kukoricához, és hathetes fermentációt követően vizsgáltuk a különböző kémiai és mikrobiológiai paramétereket (3. ábra).

Az eltérő időpontokban használt kukorica-alapanyag eltérő minősége miatt a mikotoxinnal kezelt és kezeletlen szilázsok pH-ja, tejsavbaktérium-, illetve penészszáma, valamint ecetsav- és tejsavtartalma szignifikánsan különbözött. Emiatt a LAB-kezelések csak a megfelelő kontrollokkal voltak összehasonlíthatók. Összességében a pH-értékek változóak voltak (pH $4,40 - 6,15$). A legalacsonyabb pH-értékeket az SD4 és CB2 törzsekkel, mikotoxin-kiegészítéssel végzett LAB-kezelések esetében értük el. A legmagasabb tejsav-koncentrációkat ($22,6 \pm 3,01$ [m/m]% és $19,77 \pm 2,96$ [m/m]%, száraz tömegre vonatkoztatva) a kontrollszilázsokban (mikotoxinokkal és anélkül) tapasztaltuk szignifikáns különbségek nélkül. Az SD4- és a mikotoxin-kezelés szintén olyan tejsavtermelést eredményezett ($15,18 \pm 2,26$ m/m%), amely statisztikailag nem különbözött a kontrolltól. Az SD4 törzs és a mikotoxin-kiegészítés mellett volt a legmagasabb LAB- és a legalacsonyabb penészs szám. A mikotoxinnal és CB2 törzsszel történő kezelés statisztikailag nem hozott eltérő eredményeket a pH, a LAB-szám és az ecetsavtartalom tekintetében az SD4-kezeléshez képest. A CB2 törzs alkalmazásával azonban a silódoboz kinyitása után a mikrobiológiai elemzés statisztikailag magas penészs számot és ezen belül *Fusarium spp.* szennyezettséget mutatott ki. Míg a *Fusarium spp.* a fermentáció végére az SD4 törzsszel eliminálódott.



3. ábra. Mini silázs laboratóriumi körülmények között

A kukoricánövényt aprítását követően hangyasavval, mikotoxin-tartalmú kukoricadarával és tejsavbaktériumokkal kezeltük. A kimért mátrixok dobozait egymásra helyeztük és présbe raktuk hat hétre.

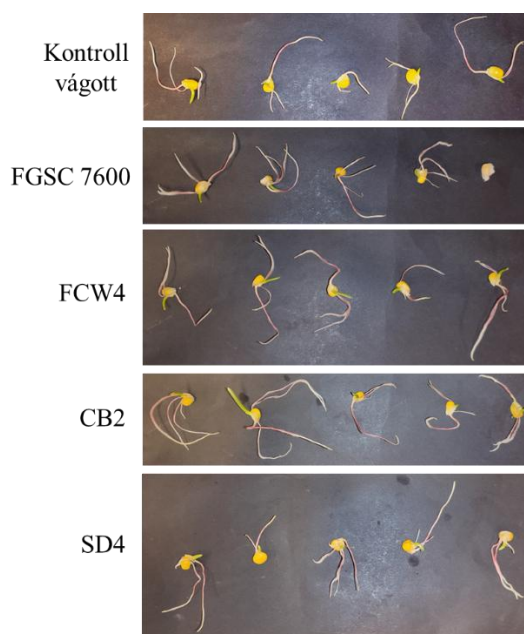
(Forrás: KOVÁCS SZILVIA, 2024)

A mikotoxinok hozzáadásával a CB2 és az FCW4 nem gátolta a *Fusarium* növekedését a fermentáció végén, ami a hosszú fermentációs idővel vagy a gátolt LAB-növekedéssel magyarázható. Sem a DON, a ZEA, vagy a FUM mikotoxinokat nem mutattunk ki a mikotoxin-kezelés nélküli mintákban a hathetes fermentáció végén. Mivel a kiegészített nyers növényi anyagban a teljes ZEA-koncentráció ($38,90 \pm 4,20 \mu\text{g/kg}$) szignifikánsan alacsonyabb volt ($p = 0,03847$), mint a mikotoxin hozzáadásával ($141,5 \pm 36,7 \mu\text{g/kg}$ ZEA), arra a következtetésre jutottunk, hogy a hosszabb inkubáció nélküli nyers növényi anyagban csökkent a ZEA koncentrációja (72,5%-os csökkenés). A mikotoxin-kiegészítéssel kezelt minták mikotoxin-szintjének csökkenését tekintve szignifikánsan eltérő ZEA-koncentrációkat mértünk. A mikotoxin-kiegészítésekkel a ZEA-koncentráció $23,59 \pm 3,53 \mu\text{g/kg}$ volt a végső szilázsban (83,3%-os csökkenés a nyersanyaghoz képest). Az FCW4 törzs nem csökkentette a ZEA koncentrációját alacsonyabb szintre a kontrollmintához képest hat hét silózást követően. Az SD4 törzs volt a legjobb választás a fermentációhoz a magasabb mikotoxin-koncentrációk mellett, mivel a silózás 90,8%-os ZEA-csökkenést eredményezett az eredetihez képest és 54%-os különbséget a kontrollmintákhoz képest a hatodik hét végére. A CB2 törzs nagyobb csökkenést eredményezett a fermentációban mutatott gyengébb teljesítménye ellenére. A silózás 94,1%-os ZEA-csökkenést hozott a nyers kukoricához képest és 64,7%-os különbséget a kontrollhoz képest a végső szilázsban. A FUM-koncentrációk nem különböztek szignifikánsan a LAB-kezeléseken belül. Az eredeti 2,13 mg/kg FUM kiegészítés radikálisan csökkent a 6. hét végére. A teljes DON-eliminációt az SD4 és CB2 hozzáadásával mutattuk ki. Ugyanakkor az FCW4 törzs a DON koncentrációjának csökkenését eredményezte, amely nem különbözött szignifikánsan a kontrollszilázstól, de még ebben az esetben is jelentős volt a DON csökkenése az eredeti szennyezettséghez képest (98%). Az SD4 törzs alkalmazása a szilázs eltérő végső minőségét eredményezte. Az SD4 nem a legoptimálisabb megoldás a fermentációhoz, de a mikotoxin jelenlétében $54,6 \pm 15\%$ -os ZEA-csökkenést eredményezett hat hét silózás alatt. A mikotoxin-kiegészítés miatt valószínűleg az érzékenyebb nem-LAB baktériumok és/vagy élesztők gátlása következett be, ami sokkal magasabb LAB-számot, tejsavtermelést, alacsonyabb penészszámot és ZEA-tartalmat eredményezett. Érdekes módon ebben az esetben a FUM-koncentráció nem csökkent jelentősen.

3.6. Biokontroll-kísérlet

LAB-törzsek antagonista képességének hatékonyságát mesterségesen fertőzött kukoricaszemeiken vizsgáltuk. Először megvizsgáltuk a B73 (Martonvásár, Magyarország) kukoricahibrid

endogén *Fusarium*-mentességét. Aztán teszteltük a kukoricánövény növekedését a kukoricaszemeken alkalmazott kis, a csírához közeli bevágással gombafertőzés nélkül, illetve eltérő kezelések mellett (4. ábra).



4. ábra. Kukoricaszemteszt *Fusarium*-antagonizmus vizsgálatára

A LAB-izolátumok (*Limosilactobacillus fermentum* SD4 és *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4 és CB2) *Fusarium*-ellenes hatását felületfertőtlenített és *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsszel kezelt, endogén *Fusarium*-mentes kukoricaszemeken (B73, Martonvásár, Magyarország) teszteltük. A gyökerek és hajtások hosszát mértük, illetve a gombafertőzés kialakulását monitoroztuk.

(Forrás: KIRÁLY SZABINA, 2024)

A statisztikai elemzés kimutatta, hogy a csírához közeli vágás szignifikánsan növelte a gyökér és a hajtás hosszát. A vágott szemek *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsszel történő kezelése szignifikáns ($p < 0,05$) növekedést okozott a hajtás hosszában ($p = 0,0004$) a gombakezelés nélküli vágott szemekhez képest. Ugyanakkor a *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsszel kezelt vágott és vágatlan szemek nem mutattak szignifikáns különbséget a növények fejlődésében.

A *F. verticillioides* FGSC 7600 törzsszel szennyezett vágott szemeken végzett LAB-kezelések szignifikánsan növelték a gyökérhosszt és szignifikánsan csökkentették a gombamicélium növekedését a LAB-mentes FGSC 7600 törzsszel szennyezett vágott szemekhez képest, viszont ezek a kezelések eltérő hajtáshosszakat eredményeztek. Az FCW4 esetében a hajtáshossz szignifikánsan csökkent ($p = 0,0108$) a gombával kezelt vágott szemekhez képest, míg az SD4 törzs alkalmazásával a hajtáshossz nőtt ($p = 0,0328$). Ezenkívül az SD4 törzsszel végzett kezelés a hajtáshossz szignifikáns eltérését okozta a CB2- ($p = 0,0030$) és az FCW4- ($p = 0,0012$) kezelésekhez képest (3. táblázat). Figyelembe véve a szemeken lévő gombamicélium mennyiségét, a LAB-kezelések hatásukban nem különböztek szignifikánsan. Az FCW4-, CB2- és SD4-kezeléssel a gombaszennyezettség (a micéliummal teljesen vagy részben beborított szemek) $50 \pm 1\%$, $60 \pm 1\%$ és $27 \pm 2\%$ volt.

3. táblázat. Kukoricánövény gyökér- és hajtáshossz-elemzése *F. verticillioides* FGSC 7600 és LAB-törzsekkel végzett kezelések után

Kezelések	Mag	Gomba	LAB	Gyökér (mm)	Hajtás (mm)
1	-	-	-	39,16 ± 9,40a	7,53 ± 3,73a
2	vágott	-	-	51,47 ± 10,87b	10,47 ± 2,65b
3	-	Fv	-	49,25 ± 9,66b	12,29 ± 7,54b
4	vágott	Fv	-	48,57 ± 14,35b	15,13 ± 5,76bc
5	vágott	Fv	FCW4	56,07 ± 10,52c*	11,43 ± 5,09b*
6	vágott	Fv	CB2	57,27 ± 15,97c*	12,53 ± 5,64bc
7	vágott	Fv	SD4	62,09 ± 15,19c*	20,45 ± 6,70d*

Limosilactobacillus fermentum SD4 és *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4 és CB2 hatásának vizsgálata *Fusarium verticillioides* FGSC 7600 (Fv) gombával szemben B73 (Martonvásár, Magyarország) kukoricaszemeken. A gyökér és a hajtás hosszát 7 napos magokon vizsgáltuk. Eltérő kisbetűk jelzik az eltérő kezelések szignifikánsan eltérő hatását a gyökér, illetve a hajtás növekedésére. Vastaggal szedett sor a kontrollnak tekintett kezelés, amelyhez viszonyítva adtuk meg az eltérések szignifikanciáját: *, $p < 0,05$.

4. Diszkusszió

A tejsavbaktériumok antifungálisanyag-termelését számos tényező befolyásolja, mint például az alkalmazott tápközeg, az inkubációs idő, hőmérséklet, pH (DALIE ÉS MTSAL, 2010; MUHIALDIN ÉS MTSAL, 2011). Azonos és állandó körülményeket alkalmaztunk a törzsek összehasonlítására és a legjobb antagonista tejsavbaktérium-izolátum kiválasztására. Vizsgáltuk a LAB-izolátumok antifungális aktivitását, a legjobbnak bizonyuló törzsekkel további kísérleteket végeztünk. A *Lactiplantibacillus plantarum* FCW4, *L. plantarum* CB2 és *Limosilactobacillus fermentum* SD4 (KRISHNAN ÉS MTSAL, 2025a), illetve *Wissella confusa* (KRISHNAN ÉS MTSAL, 2025b) törzseket izoláltuk, azonosítottuk és jellemeztük, valamint különféle kísérletekkel felmértük a biokontroll potenciálját, például agarlemeztes kísérletek, fermentációs tesztek. Ezenkívül sejtmentes tenyészetek segítségével is teszteltük a biokontrollhatást, a sejtmentes frakciók későbbi felhasználása céljából. A heterofermentatív *Limosilactobacillus fermentum* főként takarmányokban, élelmiszerekben és tejtermékekben fordul elő, gátolja az *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* (GARCIA ÉS MTSAL, 2024; MANDAL ÉS MTSAL, 2023; OGUNREMI ÉS MTSAL, 2022), *Microsporum canis* (VANITHA ÉS MTSAL, 2024), *F. graminearum* (GEREZ ÉS MTSAL, 2022; HARČÁROVÁ ÉS MTSAL, 2021; MAHJOORY ÉS MTSAL, 2023), *F. equiseti*, *F. proliferatum* (ADITHI ÉS MTSAL, 2024) és *F. oxysporum* (KIM ÉS MTSAL, 2022) fajok növekedését. Az *L. fermentum* SD4 izolátum sejtmentes frakcióit sikeresen alkalmaztuk *F. graminearum* MTCC 2089 korongtesztekben, viszont az agarlemezen történő együttes tenyésztés során a *F. verticillioides* érzékenyebb volt az *L. fermentum* SD4-re, mint az *F. graminearum* MTCC 2089. A *Fusarium* mikotoxinokat 2 mg/kg koncentrációban alkalmazva azok homogén tenyészetekben gátolták az SD4 törzs növekedését, és alacsony mikotoxin-redukáló kapacitást tapasztaltunk ezen LAB-tenyészetek esetében. A *L. plantarum*-ot elsősorban növényi anyagokból és tejtermékekből izolálták, jól ismert probiotikus, antimikrobiális hatású tejsavbaktérium (DE MUYNCK ÉS MTSAL, 2004; MAGNUSSON ÉS MTSAL, 2003). A *L. plantarum* sejtmentes kivonatai hatékonyak voltak *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* és *F. oxysporum* ellen (LAITILA ÉS MTSAL, 2002), a saját kísérleti eredményeinkhez hasonlóan (KRISHNAN ÉS MTSAL, 2025a).

A kutatásunk alapján megállapítható, hogy a két *L. plantarum* izolátum CB2 és az FCW4 antagonista képessége, valamint a *F. verticillioides*-el szembeni érzékenysége eltérő. Ez a sejtszám

normalizálása mellett is fennáll, és a sejtmentes frakcióban eltérő metabolitokkal vagy azok eltérő mennyiségével magyarázható. SATHE ÉS MUNKATÁRSAI (2007) azt feltételezték, hogy a LAB-metabolitok hígított oldatainak növényekre és talajra permetezése javítja a növények egészségét és növekedését. Biokontroll céljából friss zöldségeket permeteztek be életképes tejsavbaktériumok sejtuszpenziójával vagy sejtmentes kivonataival. A különböző romlást okozó gombák, mint például a *F. graminearum* patogenitása gátlódott, és a gombanövekedés jelentősen késleltetett volt. A növényvédelemben már régóta alkalmaznak tejsavbaktériumokat (HIGA ÉS PARR, 1994), például fermentált készítményeket, benne élesztőgombákkal, tejsavbaktériumokkal (OLIVEIRA ÉS MTSAL, 2014).

Kísérleteink során a LAB-kezelések segítségével sikerült csökkenteni a kukoricaszemek *F. verticillioides* szennyezettségét és növekedett a kukorica-csíránövény növekedési potenciálja (KRIHNAN ÉS MTSAL, 2025a). ADITHI ÉS MUNKATÁRSAI (2024) megállapították, hogy a *L. fermentum* MYSAGAM1 sejtmentes kivonata hétnapos inkubáció során gátolta a gombanövekedést, amit a termelődő szerves savaknak tulajdonítottak. A silózásnál a *Levilactobacillus brevis* mellett a *L. plantarum* is jól ismert oltóanyag; azonban használatuk célja általában a szerves szénvegyületek termelése, és nem a biokontroll-képességük kihasználása (KIM ÉS MTSAL, 2021). A *L. fermentum* hatékonyan csökkentette a cirokszilázs mikotoxin-szennyezettségét (YUAN ÉS MTSAL, 2022). Kukoricaszilázs vegyes kultúrában (*L. fermentum* [61,2%], *L. plantarum* [11,2%], *L. paralimentaris* [11,2%], *L. pentosus* [5,6%], *L. buchneri* [5,6%] és *Sporolactobacillus* [5,6%]), valamint a szántóföldön is, a *L. fermentum* sikeresen gátolta a *F. verticillioides* szennyezettséget (KHARAZIAN ÉS MTSAL, 2017). A *L. fermentum* 5KJEU5 gombaellenes hatást mutatott a kunu-zakiban, egy gabonaalapú, őshonos erjesztésű nigériai italban (OGUNREMI ÉS MTSAL, 2022). Számos tejsavbaktériumokkal fermentált élelmiszerben mutatták ki az antioxidáns-aktivitás növekedését, a fenolos vegyületek metabolizmusának, illetve egyes szerves savaknak köszönhetően (DRIEHUIS ÉS MTSAL, 2013). A kukoricánövény fermentációja *L. plantarum* FCW4 vagy a *L. fermentum* SD4 segítségével nem volt hatékony (alacsony tejsavkoncentráció, magas penészs szám), viszont mikotoxin hozzáadásával ez megváltozott. A természetes és mesterséges mikotoxin-szennyezést is tartalmazó kevert kultúrákban a CB2 és az FCW4 törzsek nem gátolták a *Fusarium* fajok megjelenését a fermentáció során, ami a hosszú fermentációs idővel és/vagy a LAB-sejtek gátolt növekedésével magyarázható. A *L. fermentum* SD4 alkalmazása eltérő végső silóminőséget eredményezett mikotoxin hozzáadása nélkül vagy hozzáadásával. Az SD4-kiegészítés a fermentáció szempontjából nem a legjobb választás volt, viszont mikotoxin hozzáadásával itt értük el a legjobb minőségű szilázst. A pH, a LAB és penészs szám, az ecetsav és a tejsav szignifikánsan ($p < 0,05$) eltért a kontrolltól. Ezenkívül a fermentáció során a ZEA szintje 90,8%-kal csökkent a mikotoxinnal kiegészített nyers kukoricához képest (KRIHNAN ÉS MTSAL, 2025a).

Kevés tanulmány vizsgálta a mikotoxinokat szilázsban. NYAMETE ÉS MUNKATÁRSAI (2016) arról számoltak be, hogy a *L. fermentum* az FB1 szintjét mindössze 14%-kal csökkentette (amely a fermentációs folyamatban nagyobb, 20%-os csökkenést jelentett). CHLEBICZ ÉS MUNKATÁRSAI (2020) megállapították, hogy a tejsavbaktériumok által okozott fumonizinszökkenés 62% és 77% közé tehető. Itt átlagosan 85,7%-os csökkenést észleltünk a LAB-kezelések esetében, míg homogén kultúrában ez 15% alatt volt. A legnagyobb koncentrációcsökkenést a ZEA esetében figyeltük meg. A legnagyobb csökkenés 45,5% volt a CB2 törzs esetében homogén kultúrában, míg az SD4 alkalmazásával ez kevert kultúrában 90,8% volt, míg a tejsavbaktériumok esetében 57% volt (KRIHNAN ÉS MTSAL, 2025a). Ezzel szemben a legrezisztensebb mikotoxin a DON volt: koncentrációját a *Lactobacillus* spp. törzsek 24 órás inkubáció után 19–39%-kal csökkentették (CHLEBICZ ÉS MTSAL, 2020). A DON-t gyakran detektálják szilázsokban, és itt magas koncentrációban is előfordulhat (> 2 mg/kg) (OGUNADE ÉS MTSAL, 2018). A DON-konjugátumok biodegradációja miatt a DON

koncentrációjának növekedése megfigyelhető a kukorica silózása során (JENSEN ÉS MTSAL, 2019; KELLER ÉS MTSAL, 2013). Kísérleteinkben a DON a kimutatási határ alatt volt, kivéve a *L. plantarum* FCW4 alkalmazása mellett. Az FCW4 törzs és a mikotoxin-kiegészítés gátolhatott bizonyos mikroorganizmusokat, különösen a DON-degradáló képességű LAB-okat, amint azt az alacsony LAB-szám és tejsavszint is bizonyítja az FCW4 törzs kezelésben. Ezenkívül a DON szintén erős gátló hatást gyakorolt (45,9%) az FCW4-re homogén tenyészetben vizsgálva. A LAB-kultúrák szántóföldi (OLIVEIRA ÉS MTSAL, 2014) vagy betakarítás utáni (GONÇALVES ÉS MTSAL, 2019) alkalmazása hatékonyan bizonyult a *Fusarium*-szennyezettség csökkentésében, illetve a kukorica magnővekedésének serkentésében. A kukoricánövény fermentációjában a *L. fermentum* SD4 kiegészítését javasoljuk *L. plantarum* CB2-vel. A sejtmentes termékek fejlesztése pedig egy jó irány lehet a megfelelő minőségű élelmiszerek, takarmányok biztosítása érdekében.

Köszönetnyilvánítás

A kutatásainkat a 2019-2.1.13-TÉT_IN-2020-00056 a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap 2019-2.1.13-TÉT_IN programja támogatta. Megköszönjük a Debreceni Egyetemnek a támogatást, valamint a *Microbial Processes and Technology Division (MPTD)*, *CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (NIIST)*, *Thiruvananthapuram, India* munkatársainak az együttműködést.

Irodalom

- ADÁCSI, C., KOVÁCS, SZ., PÓCSI, I., GYŐRI, Z., DOMBRÁDI, Z., & PUSZTAHELYI, T. (2022). Microbiological and toxicological evaluation of fermented forages. *Agriculture*, 12(3), 421. <https://doi.org/10.3390/agriculture12030421>
- ADHIKARI, M., NEGI, B., KAUSHIK, N., ADHIKARI, A., AL-KHEDHAIRY, A. A., KAUSHIK, N. K., & CHOI, E. H. (2017). T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8(20), 33933–33952. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.15422>
- ADITHI, G., DIVYASHREE, S., SHRUTHI, B., DEEPA, N., & SREENIVASA, M. Y. (2024). Evaluation of *Limosilactobacillus fermentum* MYSAGAM1 isolated from herbal Amla juice as a probiotic candidate with antifungal characteristics against *Fusarium equiseti*. *Food Bioscience*, 58, 103843 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103843>
- ALASSANE-KPEMBI, I., SCHATZMAYR, G., TARANU, I., MARIN, D., PUEL, O., & OSWALD, I. P. (2017). Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3489–3507. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>
- ARENA, M. P., CAPOZZI, V., RUSSO, P., DRIDER, D., SPANO, G., & FIOCCO, D. (2018). Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 9949–9958. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9403-9>
- BANGAR, S. P., CHAUDHARY, V., SINGH, T. P., & OZOGUL, F. (2022). Retrospecting the concept and industrial significance of LAB bacteriocins. *Food Bioscience*, 46, 101607. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101607>
- BENNETT, J. W., & KLICH, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J., & SAYERS, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- BRYŁA, M., WAŚKIEWICZ, A., KSIEŃIEWICZ-WOŹNIAK, E., SZYMCHYK, K., & JĘDRZEJCZAK, R. (2018). Modified *Fusarium* mycotoxins in cereals and their products—Metabolism, occurrence, and toxicity: an updated review. *Molecules*, 23(4), 963. <https://doi.org/10.3390/molecules23040963>
- CHEN, J., WEI, Z., WANG, Y., LONG, M., WU, W., & KUČA, K. (2021). Fumonisin B1: mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. *Food and Chemical Toxicology*, 149, 111977. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111977>
- CHLEBICZ, A., & ŚLIŹEWSKA, K. (2020). In vitro detoxification of aflatoxin B 1, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 12, 289–301. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9512-x>

- CHRISTENSEN, S., BORREGO, E., SHIM, W.B., ISAKEIT, T., & KOLOMIETS, M. (2012). Quantification of fungal colonization, sporogenesis, and production of mycotoxins using kernel bioassays. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 3727. <https://doi.org/10.3791/3727>
- CINAR, A., & ONBAŞI, E. (2019). "Mycotoxins: the hidden danger in foods," in Mycotoxins and food safety, ed. S. Sabuncuoglu (Boston, MA: IntechOpen), 1–21. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77743>
- DALIE, D. K. D., DESCHAMPS, A. M., & RICHARD-FORGET, F. (2010). Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
- DALL'ASTA, C., & BATTILANI, P. (2016). Fumonisin and their modified forms, a matter of concern in future scenario? *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 727–740. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2058>
- DE MUYNCK, C., LEROY, A. I., DE MAESENEIRE, S., ARNAUT, F., SOETAERT, W., & VANDAMME, E. J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, 159(4), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.07.002>
- DRIEHUIS, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 16–34. <https://doi.org/10.23986/afsci.6699>
- GARCIA, M. V., STEFANELLO, R. F., PIA, A. K., LEMOS, J. G., NABESHIMA, E. H., BARTKIENE, E., ROCHA, J. M., COPETTI, M. V., & SANT'ANA, A. S. (2024). Influence of *Limosilactobacillus fermentum* IAL 4541 and *Wickerhamomyces anomalus* IAL 4533 on the growth of spoilage fungi in bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 413, 110590. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110590>
- GEREZ, C. L., TORINO, M. I., ROLLAN, G., & DE VALDEZ, G. F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20(2), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
- GONÇALVES, A., GKRILLAS, A., DORNE, J. L., DALL'ASTA, C., PALUMBO, R., LIMA, N., BATTILANI, P., VENÂNCIO, A., & GIORNI, P. (2019) Pre-and postharvest strategies to minimize mycotoxin contamination in the rice food chain. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 441–454. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12420>
- HIGA, T., & PARR, J. F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. *International Nature Farming Research Center: Atami, Japan*, Vol. 1., pp. 1–16.
- JENSEN, T., DE BOEVRE, M., PREUSKE, N., DE SAEGER, S., BIRR, T., VERREET, J., & SONNICHSEN, F. (2019). Evaluation of high-resolution mass spectrometry for the quantitative analysis of mycotoxins in complex feed matrices. *Toxins*, 11(9), 531. <https://doi.org/10.3390/toxins11090531>
- JOHNS, L. E., BEBBER, D. P., GURR, S. J., & BROWN, N. A. (2022). Emerging health threat and cost of *Fusarium* mycotoxins in European wheat. *Nature Food*, 3, 1014–1019. <https://doi.org/10.1038/s43016-022-00655-z>
- KALLELA K., & ETTALA E. (1984). The oestrogenic *Fusarium* toxin (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. *Nordisk Veterinaermedicin*, 36(9–10), 305–309. PMID: 6240023
- KARLOVSKY, P., SUMAN, M., BERTHILLER, F., DE MEESTER, J., EISENBRAND, G., PERRIN, I., OSWALD, I. P., SPEIJERS, G., CHIODINI, A., RECKER, T., & DUSSORT, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32, 179–205. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0257-7>
- KELLER, L. A. M., GONZALES PEREYRA, M. L., KELLER, K. M., ALONSO, V. A., OLIVEIRA, A. A., ALMEIDA, T. X., BARBOSA, T. S., NUNES, L. M. T., CAVAGLIERI, L. R., & ROSA, C. A. R. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.09.001>
- KHARAZIAN, Z. A., JOUZANI, G. S., AGHDASI, M., KHORVASH, M., ZAMANI, M., & MOHAMMADZADEH, H. (2017). Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi. *Biological Control*, 110, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.004>
- KIM, D. H., LEE, K. D., & CHOI, K. C. (2021). Role of LAB in silage fermentation: Effect on nutritional quality and organic acid production – An overview. *AIMS Agriculture and Food*, 6(1), 216–234. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021014>
- KIM, J. H., LEE, E. S., KIM, B. M., HAM, J. S., & OH, M. H. (2022). Broad-spectrum antimicrobial activity of cinnamoyl esterase-producing *Lactobacilli* and their application in fermented rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(8), 3130–3139. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11654>
- KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S., & FUJIMURA, M. (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 71(9), 2105–2123. <https://doi.org/10.1271/bbb.70183>
- KOWALSKA, K., HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA, D. E., & PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015>

- KRISHNAN, S. V., NAMPOOTHIRI, K. M., SURESH, A., LINH, N.T., BALAKUMARAN, P. A., POCSI, I., & PUSZTAHELYI, T. (2024). *Fusarium* biocontrol: Antagonism and mycotoxin elimination by lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1260166. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1260166>
- KRISHNAN, S. V., ANASWARA, P. A., NAMPOOTHIRI, K. M., KOVÁCS, S., ADÁCSI, C., SZARVAS, P., KIRÁLY, S., PÓCSI, I. & PUSZTAHELYI, T. (2025a). Biocontrol activity of new lactic acid bacteria isolates against *Fusaria* and *Fusarium* mycotoxins. *Toxins*, 17(2), 68. <https://doi.org/10.3390/toxins17020068>
- KRISHNAN, S. V., ANASWARA, P. A., NAMPOOTHIRI, K. M., KOVÁCS, S., ADÁCSI, C., MIKLÓS, I., KIRÁLY, S., PÓCSI, I. & PUSZTAHELYI, T. (2025b). Unveiling the perspective on *Weissella confusa* as a promising biocontrol agent against *Fusaria*. *Microorganisms*, 13(3), 666. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13030666>
- LAITILA, A., ALAKOMI, H. L., RAASKA, L., MATTILA-SANDHOLM, T., & HAIKARA, A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 566–576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01731.x>
- MAGNUSSON, J., STROM, K., ROOS, S., SJOGREN, J., & SCHNURER, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7)
- MAHJOORY, Y., MOHAMMADI, R., HEJAZI, M. A., & NAMI, Y. (2023). Antifungal activity of potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and their role against toxigenic aflatoxin-producing aspergilli. *Scientific Reports*, 13, 388. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27721-1>
- MANDAL, S., & MANDAL, N. C. (2023). Formulation of food grade *Limosilactobacillus fermentum* for antifungal properties isolated from home-made curd. *Scientific Reports*, 13, 20371. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45487-4>
- MASOOD, M. I., QADIR, M. I., SHIRAZI, J. H., & KHAN, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, 37, 91–98. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.536522>
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A., & ALEXANDER, N. J. (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- MUHALDIN, B. J., SAARI, N., & MEOR HUSSIN, A. S. (2020). Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of food supply. *Molecules*, 25(11), 2655. <https://doi.org/10.3390/molecules25112655>
- MUHALDIN, B. J., ZAITON, H., SAJAA, K. S., NUR AQILAH, Z., & AZFAR, A. A. (2011). Effect of pH and heat treatment on antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Lactobacillus pentosus* G004 and *Pediococcus pentosaceus* Te010. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 8, 41–43. Available from: <https://www.gup.ugal.ro/ugaljournals/index.php/IFRB/article/view/3372>
- MUNKVOLD, G. P. (2017). “*Fusarium* species and their associated mycotoxins,” in *Mycotoxigenic fungi. Methods in molecular biology*, 1542, eds A. Moretti and A. Susca (New York, NY: Humana Press). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4
- MUNKVOLD, G. P., PROCTOR, R. H., & MORETTI, A. (2021). Mycotoxin production in *Fusarium* according to contemporary species concepts. *Annual Review of Phytopathology*, 59, 373–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-102825>
- NASROLLAHZADEH, A., MOKHTARI, S., KHOMEIRI, M., & SARIS, P. (2022). Mycotoxin detoxification of food by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Contamination*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40550-021-00087-w>
- NYAMETE, F. A., MOURICE, B., & MUGULA, J. K. (2016). Fumonisin B1 reduction in lactic acid bacteria fermentation of maize porridges. *Tanzania Journal Agricultural of Sciences*, 15(1), 13–20. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/tjags/article/view/164869>
- OGUNADE, I. M., MARTINEZ-TUPPIA, C., QUEIROZ, O. C., JIANG, Y., DROUIN, P., WU, F., VIYAS, D., & ADESOGAN, A. T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4034–4059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>
- OGUNREMI, O. R., LEISCHTFELD, S. F., MISCHLER, S., & SCHWENNINGER, S. M. (2022). Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from kunu-zaki, a cereal-based Nigerian fermented beverage. *Food Bioscience*, 49, 101648. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101648>
- OLIVEIRA, P. M., ZANNINI, E., & ARENDT, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiology*, 37, 78–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.003>
- PASWAN, M., ADHIKARY, S., SALAMA, H. H., RUSU, A. V., ZUORRO, A., DHOLAKIYA, B. Z., TRIF, M., & BHATTACHARYA, S. (2023). Microbial synthesis of lactic acid from cotton stalk for polylactic acid production. *Microorganisms*, 11(8), 1931. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081931>
- PESTKA, J. J. (2010). Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 84, 663–679. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>

- PETROVA, P., ARSOV, A., TSVETANOVA, F., PARVANOV-MANCHEVA, T., VASILEVA, E., TSIGORIYNA, L., & PETROV, K. (2022). The complex role of lactic acid bacteria in food detoxification. *Nutrients*, 14(10), 2038. <https://doi.org/10.3390/nu14102038>
- RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., & VISMER, H. F. (2002). Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101–2105. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2101-2105.2002>
- RICHARD, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- SADIQ, F. A., YAN, B., TIAN, F., ZHAO, J., ZHANG, H., & CHEN, W. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1403–1436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>
- SALMAN, M., JAVED, M. R., ALI, H., MUSTAFA, G., TARIQ, A., SAHAR, T., NAHEED, S., GILL, I., ABID, M., & TAWAB, A. (2022). Bioprotection of *Zea mays* L. from aflatoxigenic *Aspergillus flavus* by *Loigolactobacillus coryniformis* BCH-4. *PLoS ONE*, 17, e0271269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271269>
- SATHE, S. J., NAWANI, N. N., DHAKEPHALKAR, P. K., & KAPADNIS, B. (2007). Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2622–2628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03525.x>
- SHI, C., & MAKTABDAR, M. (2022). Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products—A review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 819684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.819684>
- SMAOUI, S., AGRIOPOULOU, S., D'AMORE, T., TAVARES, L., & MOUSAVI KHANEGHAH. (2023). The control of *Fusarium* growth and decontamination of produced mycotoxins by lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(32), 11125–11152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2087594>
- SMITH, M.-C., MADEC, S., COTON, E., & HYMER, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>
- SOBROVA, P., ADAM, V., VASATKOVA, A., BEKLOVA, M., ZEMAN, L., & KIZEK, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3(3), 94–99. <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0019-x>
- VANITHA, P. R., SHIVAKUMAR, D., BASAVARAJ, S., GUNDURAJ, A., JANARDANACHAR, D., BV, D., & YANJARAPPA SREENIVASA, M. (2024). *Limosilactobacillus fermentum* MYSY8, a potential probiotic isolate from fermented rice beverage for the control of *Microrhizopus canis*. *Food Biotechnology*, 38(3), 314–342. <https://doi.org/10.1080/08905436.2024.2383743>
- VARSHA, K. K. (2015). Isolation and characterization of antifungal compounds from lactic acid bacteria. Doctoral dissertation. Thiruvananthapuram: National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (CSIR).
- YAZAR, S., & OMURTAG, G. Z. (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(11), 2062–2090. <https://doi.org/10.3390/ijms9112062>
- YÉPEZ, A., LUZ, C., MECA, G., VIGNOLO, G., MANES, J., & AZNAR, R. (2017). Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin. *Food Control*, 78, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.009>
- YUAN, X., YANG, X., WANG, W., LI, J., DONG, Z., ZHAO, J., & SHAO, T. (2022). The effects of natamycin and hexanoic acid on the bacterial community, mycotoxins concentrations, fermentation profiles, and aerobic stability of high moisture whole-crop corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 286, 115250. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115250>
- ZIELONKA, Ł., GAJECKA, M., ROZICKA, A., ABROWSKI, M., ZMUDZKI, J., & GAJECKI, M. (2014). The effect of environmental mycotoxins on selected ovarian tissue fragments of multiparous female wild boars at the beginning of astronomical winter. *Toxicon*, 89, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.021>

Lactic acid bacteria against the mycotoxins of filamentous fungi

Szilvia Kovács ¹, Cintia Adácsi ¹, Pál Szarvas ², Szabina Király ³, Ida Miklós ⁴,
Kesavan Madhavan Nampoothiri ⁵, István Pócsi ³, Tünde Pusztahelyi ¹ 

¹ Food and Environmental Toxicology Research Group, Central Laboratory of Agricultural and Food Products, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary

² Centre for Agricultural Genomics and Biotechnology, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management Center, University of Debrecen, H-4400 Nyíregyháza, Hungary

³ Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Institute of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary

⁴ Department of Applied Genetics, Institute of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary

⁵ Microbial Processes and Technology Division, CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology, Thiruvananthapuram, India

Summary

Mycotoxins produced by filamentous fungi pose significant economic damage and health risks worldwide. Traditional physical and chemical methods for mycotoxin elimination show limited effectiveness, and lactic acid bacteria (LAB) have emerged as promising biological control agents due to their safety profile and ability to inhibit fungal growth while reducing mycotoxin levels. However, the strain-specific efficacy of different LAB species against Fusarium fungi and their varying capacity for mycotoxin degradation remains poorly understood, limiting the development of effective bio-control strategies for contaminated feed and agricultural products. Therefore, we isolated and characterized multiple LAB strains to evaluate their antifungal and mycotoxin reduction capabilities. Our results demonstrated that LAB strains exhibited vigorous Fusarium-antagonistic activity and showed general resistance to mycotoxins, with particularly significant ability to reduce ZEA concentrations. The tested LAB strains, particularly L. fermentum SD4 and L. plantarum CB2, represent promising biocontrol agents that effectively inhibit Fusarium species, reduce mycotoxin levels, and improve the quality of fermented feed. The investigated Weisella confusa strains proved to be excellent Fusarium biocontrol agents but were not suitable for reducing mycotoxin levels, thereby establishing strain-specific applications for comprehensive mycotoxin management strategies.

Keywords: Fusarium, mycotoxin, lactic acid bacteria, probiotics