

Debreceni Egyetem
Agrártudományi Központ
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és
Környezetgazdálkodási Kar
Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet
Intézetigazgató: Prof. Tamás János

Baromfi toll biodegradálhatóságának és újrahasznosításának
értékelése

Készítette:
Molnár Szabolcs
Környezetgazdálkodási
agrármérnök
II. éves Bsc. jelölt

Konzulens:
Dr. Mézes Lili
egyetemi tanársegéd

Debrecen
2014

Tartalomjegyzék

BEVEZETÉS	3
1. TÉMAFELVETÉS	4
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A biomassza energetikai hasznosítása	5
2.2. A biogáz energetikai hasznosítása	5
2.3. A biogáz termelés mikrobiológiai folyamatai	6
2.3.1. A biogáz-képződés folyamata	6
2.3.2. A biogáz-képződést befolyásoló tényezők	8
2.4. A baromfi toll, mint alapanyag	10
2.5. A <i>Bacillus licheniformis</i> jellemzése	11
2.6. A baktériumok szaporodása	12
2.7. Mikroorganizmusok tenyésztése, táptalajok	14
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	15
3.1. A kísérletek és vizsgálatok helyszíne	15
3.2.1. Vizsgálati eszközök ismertetése	15
3.2.2. Vizsgálati módszerek ismertetése	18
3.3. A vágóhídról származó baromfi toll előkezelése	21
3.4. A <i>Bacillus licheniformis</i> felszaporítása	22
3.4. Szilárd táptalajok előállítása	22
3.4.1. Az „A” szilárd táptalaj összetétele	22
3.4.2. A „B” szilárd táptalaj összetétele	23
3.4.3. A „C” szilárd táptalaj összetétele	23
3.5. Folyékony táptalajok előállítása	24
3.5.1. Az „A” folyékony táptalaj összetétele	24
3.5.2. A „B” folyékony táptalaj összetétele	25
3.6. Keratin degradáció mértékének kiszámítása	25
3.7. Vágóhídról származó baromfi tollról keratinbontó baktérium törzs kisselektálása, fenntartása, a keratinbontó képességének meghatározása szilárd táptalajon	25
4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE	27
4.1. Szilárd táptalajon folytatott vizsgálatok	27
4.2. Folyékony táptalajon folytatott vizsgálatok	30
4.3. Vágóhídról származó baromfi tollról keratinbontó baktérium törzs kisselektálása, fenntartása, a keratinbontó képességének meghatározása szilárd táptalajon	34
ÖSSZEFOGLALÁS	38
INTERNETES FORRÁSOK	42
JOGSZABÁLYOK	42
MELLÉKLETEK	43
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	47

Bevezetés

A Föld fosszilis energiaforrásai kimerülőben vannak, Magyarország különösen szegény a fosszilis energiahordozók területén, ezért egyre fontosabb a biomassa alkalmazása az energiatermelésben. Magyarország éves energiaigénye átlagosan 1040 PJ aminek közel 3/4 része importból származik. Az összenergia felhasználáson belül a megújuló energiaforrások aránya az Eurostat szerint 2009-ben 8,1% volt, az Európai Unió átlaga 11,7% volt. Az Európai Unió 2009-es irányelve szerint a tagországokban 2020-ra a felhasznált energia 20 százalékának kell megújuló forrásokból származnia. Magyarország stratégiai célja, hogy 2020-ra a megújuló energiaforrások felhasználása elérje a 186,3 PJ-t (2148/2008. (X.31.) Korm. határozat. A megújuló energiaforrások közül a tűzifa után a biomassa a legjelentősebb az energiatermelésben. Magyarország stratégiai céljának eléréséhez egyik lehetséges eszköze a mezőgazdaságban keletkező biohulladékok felhasználása az energiatermelésben. Biogáz termelés során elektromos és hőenergia egyaránt előállítható, valamint a fermentált végtermék alkalmas a termőtalajok trágyázására. A nagyüzemi állattartás során keletkező állati hulladékok kezelésére szigorú jogszabályok vonatkoznak, míg korábban bizonyos állati hulladékokat újra felhasználtak és takarmány formájában visszajutatták a termelésbe, ma már ez nem lehetséges a betegségek a takarmányokon át az élelmiszerláncba való bekerülése miatt (1774/2002/EK, 71/2003 FVM). A jogszabály az állati hulladékokat három kategóriába sorolja be, melyek közül az első és a második kategóriába tartozó vágóhídi hulladékot az esetleges biogáz célú hasznosításuk előtt fertőtleníteni kell. A harmadik kategóriába tartoznak a környezetre jóval kisebb kockázatot jelentő állati hulladékok, melyeket nem szükséges fertőtleníteni, ezek közé tartozik a baromfi feldolgozó üzemekben nagy mennyiségben keletkező toll. A baromfi-feldolgozó iparban keletkező melléktermékek egyike a nedves körülbelül 50-70% víztartalmú toll, amely további felhasználásra nem alkalmas. A baromfik teljes testsúlyának mintegy 10%-át a toll képezi, így a vágóhídon keletkező magas víztartalmú toll világszerte több millió tonnára rúg. Dolgozatom célja a hulladékként keletkező baromfi toll feltárhatóságának vizsgálata biogáz célú hasznosításhoz.

1. Témafelvetés

Magyarország baromfi állományának jelentős részét a brojler csirke adja, ez az elmúlt években 32-33 millió szárnyast jelent. A vágóállat-termelés 2009 és 2011 között 368087 tonnáról 387689 tonnára nőtt, ezzel együtt növekedett a hulladéknak tekinthető baromfi toll aránya is. Az így keletkezett hulladék mennyisége megbecsülhető, ha figyelembe vesszük, hogy a baromfi testsúlyának 10%-át a tollazat adja. 2011-ben körülbelül 38769 tonna nehezen kezelhető és ártalmatlanítható baromfi toll keletkezett csak a brojlercsirkék vágása során (I1). A szigorodó hazai és európai jogszabályok hatására olyan, technológiák fejlesztésére van szükség, mellyel ezt a hulladékot bevihetjük a biogáz-termelésbe és ezzel a csökkenthetjük a környezet terhelését.

Kutatásom célja a vágóhídról származó baromfi toll feltárásához szükséges oltóanyag (*Bacillus licheniformis*) segítségével különböző táptalajok tesztelése annak érdekében, hogy a biogáz előállítás során a lehető legtöbb energiát nyerjük ki a biomasszából. A toll fehérjét *Bacillus licheniformis* nevű keratinbontó baktérium segítségével tárjuk fel. A vizsgálatok célja a baromfi toll biodegradációját befolyásoló paraméterek optimalizálása. Másik feladata a tollbontó mikroorganizmusok koncentrációjának optimalizálása, felszaporíthatóságának vizsgálata. A további kutatások célkitűzése annak a maximálisan bevihető előkezelt toll mennyiségének és időbeli ütemezésének a meghatározása, mely nem eredményezi a fermentációra toxikus gázok keletkezését, valamint más környezeti paraméter, így a pH káros eltolódását.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A biomassza energetikai hasznosítása

Egészen a középkor végéig az ember a tevékenységéhez szükséges energiát a biomassza felhasználásával állította elő. A technika az ipari forradalom során olyan irányba fejlődött, hogy a fosszilis tüzelőanyagok jutottak vezető szerephez, azonban a fosszilis energiahordozó készleteink végesek. Az emberiségnek a megújuló energiaforrások irányába kell nyitnia, így a biomassza újból jelentőssé válik az energiatermelésben.

Biomasszának nevezzük egy adott élettérben található, életfolyamatok révén képződött eleven és holt szervesanyagot. Biomassza három alcsoportját különböztetjük meg: a producensek, a konzumensek és a lebontók.

A producensek termelik a levegő széndioxidjából és vízből a biomassza primer hozamát, a vegetációt. Az ehhez szükséges energiát a fotoszintézis szolgáltatja.

A konzumens csoport tagjai: a növényevők, illetve növényevőket fogyasztó ragadozók. A növényevők képesek arra, hogy a növényi alapanyagokat a saját testük (és a ragadozók testének) felépítéséhez szükséges zsírokká alakítsák át.

A lebontók csoportjába különböző mikroorganizmusok és gombák tartoznak, melyek az elhalt szervesanyagot lebontják és visszaforgatják a táplálék láncba, illetve anyagcsere folyamataik során metánná és szén-dioxiddá alakítják.

Becslések szerint Földünk „biomassza” termelése 165 milliárd tonna/év; ennek energia-tartalma pedig 1500-3000 EJ/év, mely tízszerese a világ jelenlegi energia-igényének (HALÁSZ et al., 2007). Magyarország összes biomassza tömege 350 millió tonna, míg az évente képződő biomassza-készlet 105-110 millió tonnára tehető, ennek energia-tartalma 1100 PJ. Az ország energiaigénye 1030-1050 PJ, mely ebből fedezhető lenne (SZUNYOG et al., 2008.).

2.2 A biogáz energetikai hasznosítása

A biomasszából anaerob körülmények között végbemenő mikrobiológiai folyamatok eredményeként energetikai célokra hasznosítható, metán tartalmú biogáz képződhet.

A biogáz esetében három nagy csoportot különíthetünk el; depóniagáz, szennyvíztelepi gáz, mezőgazdasági biogáz. Depóniagáz alatt értjük azt a hulladéklerakóban képződő gázt, amely kommunális hulladékban található szerves anyagok bomlásából keletkeznek. Szennyvíztelepi gáznak nevezzük a szennyvíztelepeken működtetett fermentorokban képződött gázokat.

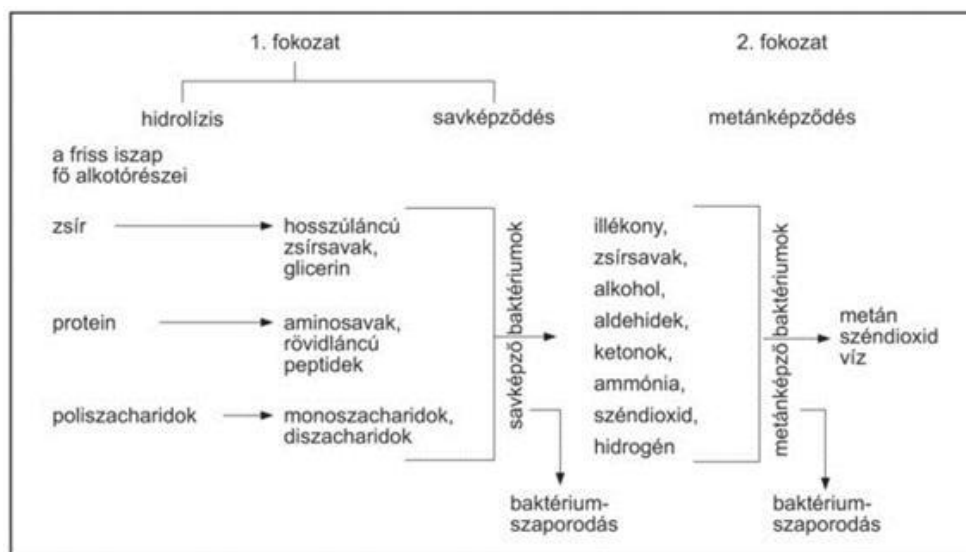
Mezőgazdasági biogáznak nevezzük a mezőgazdasági termékekből, melléktermékekből és egyéb szerves anyagokból képződő gázokat.

A biogáz energia értékét a tiszta metán részaránya határozza meg, ez függ az alkalmazott eljárástól és a feldogozott hulladék milyenségétől, de általánosan elmondható, hogy ez az érték 50-70% között mozog (BARÓTFI, 2000.).

2.3. A biogáz termelés mikrobiológiai folyamatai

2.3.1. A biogáz-képződés folyamata

A biogáz-képződés teljes folyamata alapvetően két szakaszra osztható fel (BARÓTFI, 2000); az első egy fermentációs biokémiai folyamat (savas erjedés), amely nagy molekulájú szerves anyagok lebontását, feltárását jelenti. A lebontást savképző baktériumok és gombák (tejsav, propionsav és vajsavbaktériumok) végzik. A fermentatív folyamat végrehajtóit savképző baktériumoknak nevezzük. A második szakasz a metánképződés biokémiai folyamata, a metánt termelő baktériumok, azaz a metanogén baktériumok az egyszerűbb molekulákat építik le. A szerves anyagokat oldható zsírsavakra, alkoholokra, szén-dioxidra, hidrogénre, hidrogén-szulfidra bontják. A folyamat végeredménye a főleg metánból és széndioxidból álló, energetikai célokra hasznosítható biogáz. A fentebb leírt folyamatot az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra: A biogáz képződés folyamata (BARÓTFI, 2000.)

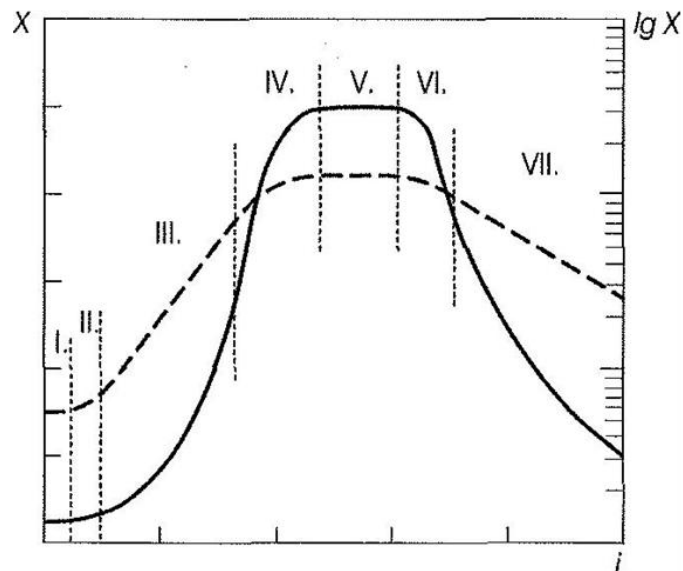
Újabb kutatások szerint a két szakasz között van egy acetogén biokémiai folyamat is, ennek elkülönítése lényegében elméleti jellegű, mivel a folyamatot végző acetogén baktériumok csak a

metanogén baktériumokkal szimbiózisban képesek élni, így lényegében ezt közbűlső folyamatot felfoghatjuk a második szakasz részeként (HALÁSZ et al., 2007.). A fermentációs folyamatot a legújabb kutatások alapján a szerzők négy meghatározó fázisra osztják fel (BITTON et al., 1994.; DUEBLEIN-STEINHAUSER., 2008; TAMÁS et al., 1998.).

Az anaerob fermentáció négy lépése:

1. Hidrolízis: komplex makromolekulák lebomlása monomerekre
2. Savképződés fázisa: oldható monomerek átalakulása illékony zsírsavakká
3. Acetogén fázis: esetsav képződés
4. Metanogén fázis: esetsavból vagy hidrogénből és szén-dioxidból történő metán-termelődés (BITTON, 1994).

Az anaerob fermentációs folyamatok során a baktériumok szaporodási szakaszait DEÁK et al., (2006) alapján foglalnám össze (2. ábra):



2. ábra: Klasszikus baktérium szaporodási görbe (DEÁK et al., 2006.)

I. A kezdeti indulási szakasz. A $t=0$ időpontban még igen kevés baktérium van jelen. A szaporodás nem azonnal kezdődik, időnek kell eltelnie ahhoz, hogy a baktériumok osztódni tudjanak.

II. A növekedés kezdetét jelző „lag” szakasz. Ez a szakasz a szaporodás megindulásával jellemezhető. Megváltozik a sejtosztódás sebessége, a szakasz végén a szaporodás eléri

maximumát. A „lag” fázisban nem csak spontán megindul a szaporodás, hanem az osztódás nélküli adaptáció is lejátszódik.

III. Az igen gyors logaritmikus szakasz. A szaporodási sebesség elérte maximumát ez az exponenciális szaporodás fázisa.

A bakteriális szaporodás sebessége a logaritmikus fázisban az alábbi egyenlettel fejezhető ki (HERBERT, 1964.):

$$dx/dt = \mu x$$

melyből következik:

$$\mu = 1/x \cdot dx/dt \quad (\ln-1)$$

$$\frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \mu$$

Ahol x - a mikroorganizmus koncentráció, t – az idő, μ - a fajlagos szaporodási sebesség, idő⁻¹ (HERBERT, 1964).

Az exponenciális szaporodást leíró összefüggés:

$$\mu = \frac{\log X_t - \log X_0}{t_t - t_0}$$

IV. Csökkenő szaporodás fázisa. A baktériumok rendelkezésére álló tápanyag mennyiség csökkenése és a mérgező anyagcsere-termékek szaporodása folytán az új és az elpusztuló baktériumok közti arány csökken.

V. Állandósult stagnáló szakasz. Beáll a szaporodás és pusztulás közötti egyensúly.

VI: Növekvő pusztulási végszakasz. Az elpusztuló baktériumok száma meghaladja az újonnan születő baktériumokét. A pusztulási arány nő, majd eléri a maximumát.

VII. Logaritmikus pusztulási befejező szakasz. A pusztulási arány elérte maximumát (SZENTIRMAI, 1996.).

2.3.2. A biogáz-képződést befolyásoló tényezők

A metán előállításában a mikroorganizmusok életfeltételeinek szabályozása a döntő tényező. Optimális életfeltételek mellett a mikroorganizmusok gyorsan elszaporodnak. A hulladék anyagokban egyidejűleg nagyon sokféle mikroorganizmus van jelen, melyek közül azok szaporodnak gyorsabban és válnak döntő többségűvé, melyeknek életkörülményeik kedvezőbbek.

Ezek a befolyásoló életkörülmények a következőek:

Tápanyag

A mikroszervezetek számára felvehető, megbontható szerves anyag, amely az életfunkciókhoz szükséges energiamennyiséget biztosítani tudja, lényegében a bontandó hulladék. A biogáz termelés szempontjából fontos, hogy a reaktorba kerülő „tápanyag” keverék állandó összetételű legyen, ez biztosítja a kiegyensúlyozott mikrobiológiai tevékenységet. Továbbá lényeges a tápanyag szén-nitrogén aránya, ennek legoptimálisabb értéke 3:1, a kívánt érték beállítását a hulladékok keverésével lehet megoldani. Hasonlóan lényeges a szén-foszfor arány, amelynek optimális aránya 150:1. Az egyéb tápelemek a kén, a kalcium, a kálium, a magnézium, a cink, a kobalt szükséges mennyisége minden komposztálásra szánt anyagban jelen vannak.

Hőmérséklet

A biogáz előállítás mikrobiológiai folyamatainak és technológiáinak legfontosabb rendező tényezője a hőmérséklet. A mikroszervezetek más-más csoportjai jellemzőek a mezofil (30-35°C) és a termofil (50-65°C) hőmérsékleti tartományban. A termofil mikroorganizmusok esetén 10-20%-kal gyorsabb termelés érhető el ugyanazon szerves anyagok lebontása esetén, ám ennek az ára, hogy műszakilag bonyolultabb technológiát kell alkalmazni, mivel a termofil mikroorganizmusok érzékenyebbek a külső körülményekre.

Nedvesség, víztartalom

Víz szükséges a mikroszervezetek anyagcseréjéhez, és ez a biokémiai folyamatok közege is. Ezért a tápanyag nedvességtartalma is fontos tényező. A mikroorganizmusok tevékenységéhez szükséges nedvesség meglehetősen tág határok között mozog. Erjesztési kísérletek mutatják, hogy 0,1%-tól 60%-ig nőhet a szárazanyag-tartalom. A technológiát a gazdaságosságra is figyelve alakítják ki. Nedves-, félszáraz és száraz eljárások ismertek. Ezek közül legelterjedtebb a nedves eljárás.

Mérgező anyagok

A toxikus anyagok a mikróbák aktivitását csökkentik, szélsőséges esetben pusztulásukat okozzák. Újabb kutatások szerint a metánképződési folyamatokban résztvevő a mikroorganizmusok, nagyon érzékenyek a sejtmérgekre, de rövid ideig elviselik azokat, és ha kellően felhígul vagy kicserélődik a tápanyag, a populáció újra aktiválódik. Tehát kisebb dózisú és rövid ideig tartó toxikus szennyezést képesek elviselni.

Kémhatás

A fermentatív és metanogén szervezetek a semleges, pH=7 körüli értéken fejtik ki hatásukat a legkedvezőbben. A gyakorlatban azt tapasztalhatjuk, hogy a degradáció során a pH-érték a savas irányba tolódik el (pH=4-5) a fermentatív szervezetek működése lelassul. Az elsavasodást időben észlelve, savfogyasztó anyagokkal (mésztej, szódaoldat) az egyensúly helyreállítható.

2.4. A baromfi toll, mint alapanyag

Az élelmiszeripar fejlődésének eredményeként a vágóhidakon keletkező nagy mennyiségű baromfi toll, veszélyes hulladéknak minősül. Nem tartalmaz toxikus anyagokat, de magas fehérje-tartalma miatt ide soroljuk. A baromfi toll termelés specifikus technológiai hulladék, másodlagos biomassa, melynek elhelyezése nehézségekbe ütközik. Az állategészségügyi jogszabályok változása miatt a toll-liszt felhasználhatósága jelentősen korlátozódott, így potenciális fermentációs alapanyagként érdemes hasznosítani.

A toll a baromfi testén védő funkciót lát el, ezért meglehetősen stabil szerkezetűnek és elállónak kell lennie. A toll szaruból áll mely tömegének közel 90%-a keratin. A keratin a természetben előforduló, nem emészthető fehérjék csoportjába tartozik (ÁDÁM, 2001.). Vízben oldhatatlan fehérje, és ellenáll a legtöbb proteolitikus (keratinolitikus) enzim aktivitással szemben, szerkezetük fonalas, viszonylag sok cisztein oldalláncot tartalmaznak, amelyek a polipeptid-láncokat diszulfid-kötésekkel kapcsolják össze. A nagyszámú diszulfid-híd miatt a keratin nehezen feltárható az olyan enzimek számára, mint a tripszin, pepszin és papain, így degradációjához speciális fehérjebontó (keratinbontó) mikroorganizmusokra van szükség (COHLBERG, 1993.; STEINERT, 1993.; ONIFADE et al., 1998.; ELŐDI, 1980.) A keratin szénből (50-55%), oxigénből (25-30%), hidrogénből (15-18%), nitrogénből (7-8%) (1. táblázat), kénből (0,5-2%) van, és nyomokban tartalmaz bórt, klórt, vasat is (ÁDÁM, 2001.). Ezért a vágóhídi toll hulladékok nagyon nehezen kezelhetők és ártalmatlaníthatóak.

1. táblázat: C/N arány a baromfitollban

Az eredeti baromfi tollban mért paraméterek			
Paraméterek	Szén-tartalom (%)	Nitrogén-tartalom (%)	C:N arány
1.	50,59	14,31	3,54
2.	53,66	14,605	3,67
3.	50,58	14,81	3,42
4.	-	12,63	-
Átlag	51,61	14,09	3,66
Szórás	±1,78	±0,995	±0,13

Forrás: MÉZES, 2009.

Hő vagy lág hatására a cisztinhidak lebontódnak, így a toll elveszti rugalmasságát. A tollban található fehérje molekulák egy része rendezett kristályszerkezetben helyezkednek el, másik részük kusza, rendezetlen formában helyezkednek el, ezek közé tud beépülni és megkötődni a víz. E részek teszik a tollat nedvszívóvá (ÁDÁM, 2001.).

Nagyfokú ellenálló képességének ellenére bizonyos baktériumok, a *Bacillus* nemzetség bizonyos törzsei és fajai (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*) keratinázok segítségével képesek a keratin hidrolízisére (MÉZES et al., 2007.).

2.5. A *Bacillus licheniformis* jellemzése

Magyarországon Kovács et al. (2002.), Perei et al. (2004.) folytattak kísérleteket *Bacillus licheniformis*-sal, a természetből elkülönített *Bacillus licheniformis* KK1-es törzset használták vizsgálataikhoz, én is ezt a törzset használtam az általam végzett kísérletekben. A baktérium extracelluláris proteázt termel és enzimátikus képessége révén teljesen elbontja a szőrt és a tollat. Az ezután kapott végtermék ártalmatlan, így nem veszélyes a környezetre, ezért a baktérium alkalmas a keratin-tartalmú hulladékok ártalmatlanítására (PEREI et al., 2004.).

A *Bacillus licheniformis* Gram pozitív, aerob, endospóras, pálcika formájú, leginkább a sokat vizsgált *Bacillus subtilis*-hez hasonló baktérium. Peptid antibiotikumot termel. A pH-igénye 6,5-8, hőmérséklet-igénye 30-50°C közötti tartományban van. Tárolhatósága +4°C-on folyékony táptalajon 1 hét, agar lemezen 1 év. Alkalmazott tenyésztési idő 2 nap. A baktérium toleráns a környezeti, biogén feltételekkel szemben (MÉZES et al., 2007.).

A *Bacillus licheniformis*-t a fermentációs ipar 25 éve használja fel fehérjebontó enzimek előállítására (WILLIAMS et al., 1990., I2), nagy mennyiségű exoenzimet állít elő, mint a

proteinázt, amilázt, és antibiotikumot is termel (KEVEI et al., 2002.). A fermentációs ipari felhasználás mellett a *Bacillus licheniformis* ER-15-ös törzsével kutatásokat folytattak arra, hogy egy gyors eljárást fejlesszenek ki toll-liszt előállítására (TIWARY et al., 2012.) A baktériumos kezelés hatására olyan toll-lisztet állítanak elő, amelynek fehérje-összetétele jóval kedvezőbb (2. táblázat), mintha csak mechanikai eljárással kezelték volna a baromfi tollat.

2. táblázat: A *Bacillus licheniformis* ER-15-ös törzsével előállított toll-liszt aminosav-tartalma

Aminosav	Aszparaginsav	Glutaminsav	Szerin	Hisztidin	Glicin
mg/g	51,00	56,10	73,80	65,90	51,05
Aminosav	Treonin	Alanin	Arginin	Tirozin	Valin
mg/g	50,09	46,30	32,85	37,85	33,15
Aminosav	Metionin	Fenil-alanin	Izoleucin	Leucin	Lizin
mg/g	31,60	69,95	51,85	17,15	14,85

Forrás: TIWARY et al., 2012.

2.6. A baktériumok szaporodása

Kedvező körülmények között a baktériumok tömege gyorsan növekedik. Ebben különböző növekedési anyagoknak, vitaminoknak, nyomelemeknek van szerepe. A növekedés következtében a tömeg-felület arány romlik, ezért a sejt kettéosztódik. Az ivartalan szaporodás mellett előfordulhat az örökítő anyag cseréje is konjugációval.

A szaporodás mechanizmusa a következő: a DNS állomány megkettőződik, majd a citoplazma szétválék, a harántmembrán betüremkedik és elválasztja a két utódsejtet, ezután kialakul a sejtfal. A keletkezett új sejtek hosszú ideig összekapcsolódhatnak, így jönnek létre a már ismert többsejtes formák, mint pl. *Streptococcus*, *Streptobacillus*, stb.

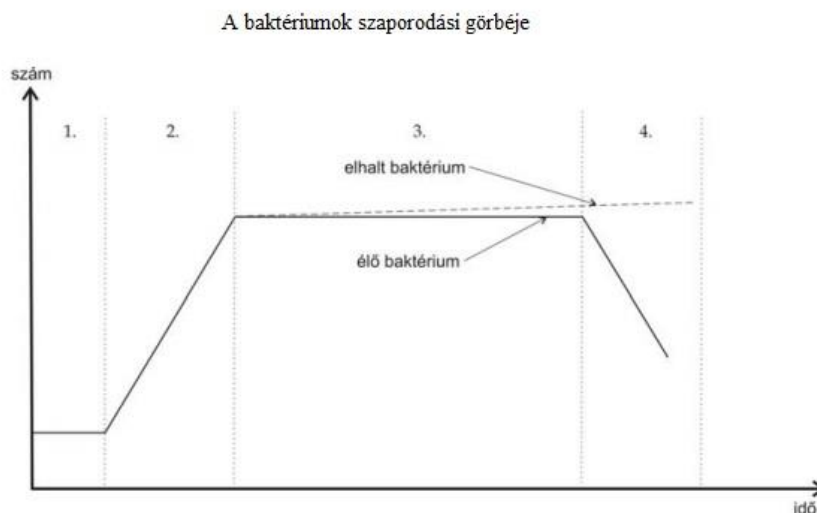
A szaporodás üteme átlag 20-30 perc. (Ennek ismerete gyakorlati szempontból is fontos.)

Lefolyása négy szakaszra bontható (3. ábra):

1. Nyugalmi szakasz: Ilyenkor a sejt csak növekedik, szaporodás még nincs.
2. Logaritmusos szakasz: állandó, gyors osztódás, az osztódások közötti idő fajonként változhat.

3. Stracioner szakasz: az élő baktériumok száma állandó, az elpusztultakkal együtt az összlétszám kismértékben növekszik. (Az intenzív szaporodás megszűnésének oka a táptalaj kimerülése és a mérgező anyagcseretermékek felhalmozódása.)

4. Csökkenő szakasz: a baktériumok folyamatosan pusztulnak, az élők száma rohamosan csökken, spórás baktériumok esetén megkezdődik a spóráképzés (a *Bacillus licheniformis* spórás baktérium).



3. ábra: A baktériumok szaporodási szakaszai (I3)

A szaporodást befolyásoló külső tényezők:

- **Hő:** Optimális az az érték, ahol a legintenzívebb a szaporodás, kórokozóknál, pl.: a 37°C. A magas hőmérséklet denaturáló hatású, ez a sterilizálás alapja. Az alacsony hőmérsékleten lassú a szaporodás, a kritikus érték alatt leáll. Az ún. mezofil fajoknál az ideális határ 15-40°C közötti értékek között változik. A termofil baktériumok esetében az optimum 45-60°C. A pszihrofilok (hidegkedvelők) főleg a hideg tengerekben, a talaj mélyebb rétegeiben élnek, ezek 30°C-on már elpusztulnak. (A hidegkedvelők okozzák, hogy a hűtőszekrényekben 4-6°C-on tárolt élelmiszerek megromlanak.)

- **Kémhatás:** a baktériumok számára optimális a 7,2-7,8 pH érték, de a savkedvelők még 5-ös pH mellett is szaporodnak. Vannak fajok, amelyek a lúgos közeget kedvelik.

- **Víz:** alapvető testalkotó és tápanyag. A baktériumok a vízhiányt (kiszáradást) változó módon viselik el, a spórások sokáig életképesek maradnak (I3).

2.7. Mikroorganizmusok tenyésztése, táptalajok

A baktériumok és más mikroorganizmusok tenyésztése táptalajokon történik. Ezek megfelelő mennyiségben – optimális pH érték mellett – kell, hogy tartalmazzák a felvehető tápanyagokat, amelyekre a tenyésztetni kívánt mikroorganizmusoknak szaporodásukhoz, élettevékenységükhöz szükség van. A táptalaj ugyanazt jelenti a mikroorganizmusok számára, mint a talaj a magasabb rendű növények részére.

A mikroorganizmusok tápanyag igénye igen változatos. A baktériumok között is vannak olyanok, amelyek speciális összetételű táptalajokat (vitaminokat, tejet, vért tartalmazó) igényelnek, de vannak olyanok is, amelyek az alaptáptalajokon (pl. húsgar) is jól növekednek.

A táptalajokkal szemben állított legfontosabb követelmények: a kedvező tápanyagtartalom, a tisztaság, az optimális pH, és a sterilitás.

Bizonyos vegyületek hatására a táptalaj szelektívvé, biokémiai diagnosztika elvégzésére alkalmassá válik. Alapvetően minden táptalajnak tartalmazni kell: vizet, nitrogénforrást (szerves és szervetlen) – kivétel N_2 -kötők, szénforrást (pl. szénhidrátok) – kivétel autotrófok, ásványi sókat, vitaminokat, járulékos növekedési faktorokat – kivétel a patogének (SZABÓ et al. 2008.).

3. Anyag és módszer

3.1. A kísérletek és vizsgálatok helyszíne

A szakdolgozatomhoz szükséges kísérleteket és vizsgálatokat a Debreceni Egyetem, MÉK, Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet mikrobiológiai laboratóriumában végeztem el.

3.2.1. Vizsgálati eszközök ismertetése

Autokláv

Henger alakú duplafalú, légmentesen zárható tartály. A tartály alja félgömb alakú így kisebb falvastagság szükséges ugyanakkora nyomásra. Belső űrtartalma 10 és 200 liter között változhat. Természetesen ezek a számok csak a laboratóriumokban használt autoklávokra vonatkoznak az iparban ezeknél lényegesen nagyobb űrmértékűeket is használnak. Általában 1,0-1,5 bar túlnyomáson és 110-140°C üzemi hőmérsékleten működik (4. ábra).



4. ábra: Az autokláv beállítása (I4)

A sterilizálás fontos eszköze. A duplafal közötti teret, desztillált vagy ioncserélt vízzel töltjük fel. A vizet elektromosan forraljuk, a keletkező gőzt pedig a munkatérbe (gőztérbe) vezetjük. A magas hőmérsékleten és nyomáson a mikroorganizmusok elpusztulnak (sterilizálás). Az autoklávban azok a táptalajok (például agaros táptalajok) és anyagok sterilizálhatóak, amelyek 100°C feletti hőmérsékleten nem szenvednek változást (SZABÓ et al., 2008.).

Lamináris fülke

A lamináris fülkék olyan egy oldalról nyitott munkaterek, melyek vízszintes vagy függőleges steril levegőáramlással biztosítják az aszeptikus körülményeket. A munkatérbe a ventilátor által szállított levegő az előszűrő porleválasztása után kerül a főszűrőbe (finomszűrő), ahol a $0,3\ \mu\text{m}$ átmérőjű porszemek 100%-s leválasztása megtörténik (HEPA – high efficiency particulate air). Az így megtisztított levegő, többnyire vízszintes irányban, a dolgozó felé túlnyomással, laminárisan (turbulencia-mentesen) áramlik, folyamatosan biztosítva a munkatér tisztaságát. Ezáltal kizárt annak a lehetősége, hogy a tárgyak, kéz, vagy ruha útján külső szennyeződés kerüljön a munkatérbe. A modern lamináris fülkébe germicid lámpa is van szerelve. A germicid vagy baktériumölő lámpák speciális UV-C tartományú fényforrások. Ez a rövidhullámú ultraibolya sugárzás roncsolja a kórokozók DNS-ét, ionizálja az oxigént és ózon keletkezik, ami szintén fertőtlenítő hatású (HEGYI et al. 2013.).

Termosztát

Szekrény alakú, duplafalú, szigetelt, állandó hőmérséklet tartására szolgáló, önműködő berendezés. A fala közötti tér vízzel (desztillált vízzel) van feltöltve. A készülék elektromos fűtéssel és hőmérséklet-szabályozással (kontakt-hőmérő) van felszerelve. Ez biztosítja, hogy a termosztát belsejében állandó ($\pm 1^\circ\text{C}$ eltérés) – a tenyésztendő mikroorganizmus optimális hőigényének megfelelően beállított – hőmérséklet alakuljon ki (SZABÓ et al. 2008.).

Fénymikroszkóp

Minden mikroszkóp leglényegesebb részét a lencséből álló optikai rendszer alkotja. A lencsék tartását és a vizsgálat közben szükséges műveletek elvégzését megfelelő mechanikai berendezés biztosítja. Így a mikroszkópnak mechanikai és optikai alkotórészeit szokás elkülöníteni.

A mechanikai berendezés vázát az állvány (statív) adja. Két részből áll, a talpból és az oszlopból. A talp általában, hagyományosan patkó alakú és az asztal lapjával három ponton érintkezik, biztosítva a csúszás és rezdülés mentességet, vagy szögletes. Az oszlop a mikroszkópállvány függőlegesen álló része, ez a világító berendezés, a tárgyasztal és a tubus közös optikai tengelyben tartását biztosítja. A tárgyasztal az optikai tengelyre merőleges masszív lap. Ez különböző alakú lehet. Közepén nyílás helyezkedik el az alulról vetített fénysugarak

átbocsátására. A mikroszkópi preparátumot az úgynevezett szorítókapcsokkal rögzíthetjük a tárgyasztalhoz. Az újabb mikroszkópokon kereszteltárgyasztalokkal vannak ellátva, melyek segítségével a preparátumot egymásra merőleges irányban is elmozdíthatjuk. A tubus egy üres fémcső. Belül a tükröződés elkerülésére matt lakkal van festve. Feladata, hogy az objektívet és az okulárt egymástól és a tárgytól a megfelelő távolságban tartsa. Mono-, illetve binokuláris tubusokat ismerünk. Az első esetben csak az egyik szemmel vizsgálhatjuk a készítményt, míg a binokuláris tubus használatakor mindkét szemünkkel, így kényelmesebb és kevésbé fárasztja a szemet.

Az optikai berendezés a nagyító rendszerből és a megvilágító készülékből áll. A nagyító rendszer részei: a tárgylencse (objektív) és a szemlencse (okulár). A fémből készült foglalatban tüntetik fel az objektív teljesítményét, jellemző adatait. Az objektív a mikroszkóp legfontosabb része, mert ettől függ a mikroszkóp teljesítőképessége. Az objektív fontos értékmérője a rajzoló vagy definiáló képesség. E fogalom alatt az objektívnek azt a tulajdonságát értjük, hogy a tárgy képét mennyire élesen alkotja meg. Ez pedig attól függ, hogy mennyire van lencsehibák tekintetében javítva (korrigálva). A lencsehibák javítása több lencséből álló lencserendszerek szerkesztésével történik, ahol a rendszer egyes tagjai többé-kevésbé kijavítják egymás hibáit. A képdomborodás szempontjából javított lencserendszert aplanikus vagy komplanikus lencsének nevezzük. A nagy nyílású, erős domborulatú lencsék alkalmazásánál azonban különböző leképezési hibák lépnek fel. Ezeknek két típusa van: színi eltérés és monokromatikus eltérés.

Az optikai berendezés másik része a megvilágító berendezés. Mikroszkóvizáláskor igényelt erős nagyítás és a vizsgált tárgy kis mérete miatt a szembe jutó fény igen csekély, ezért a tárgyat erősen meg kell világítani. Az átlátszó tárgyakat alulról világítjuk meg és áteső fényben vizsgáljuk, az átlátszatlanokat felülről világítjuk meg, és reflektált fényben nézzük. A megvilágító berendezés részei a fényforrás, tükör, és a kondenzor. A modern típusoknál a fényforrás a talpba van építve. A fényforrás az optikai rendszer kiinduló pontja, döntő befolyása van a mikroszkóp sugármenetére és annak eredményére, a képre is. A kondenzor a tükör által továbbított fénysugarakat a vizsgálandó tárgyra vetíti. A kondenzor lencserendszere gyűjti össze az optikai tengelybe juttatott fénysugarakat (SZABÓ et al. 2008.).

3.2.2. Vizsgálati módszerek ismertetése

Baktérium sejtszámolása Bürker kamra segítségével

A Bürker kamra négyzetrácsos karcolattal jelölt térfogatmérő eszköz. A nagy négyzet mérete $1/5 \times 1/5$ mm, a téglalap mérete $1/20 \times 1/5$ mm, a kis négyzet mérete $1/20 \times 1/20$ mm. A Bürker kamra magassága $1/10$ mm. Egy speciális tárgylemezről és egy vékonyabb fedőlemezből áll. A fedőlemez tárgylemezre helyezése, majd a fémkarokkal való rászorítása után pontosan $0,1$ mm vastag rés marad a tárgylemez és a fedőlemez között. A vizsgálandó anyagot ebbe a résbe helyezzük be a fedőlemez felhelyezése után úgy, hogy a vastag lemezbe vésett H-alakú mélyedés szárai között található négyzetnél a fedőlemez széléhez cseppentjük. Mivel tudjuk a rés vastagságát és az üveglemezen lévő beosztások távolságát ($1,00$ mm, $0,20$ mm, $0,05$ mm), a beosztások és a fedőlemez által határolt bármelyek téglatest térfogatát, így meg tudjuk adni a térfogategységben található sejtek számát. A legnagyobb négyzet oldalai $0,20$ mm hosszúak területe $0,04$ mm², a téglalap területe $0,05$ mm $\times$ $0,20$ mm = $0,01$ mm², a kisebb négyzet pedig $0,05$ mm oldalhosszúságú, területe $0,0025$ mm². Az eltérő méretekből adódóan az átszámítási szorzószámok is különböznek, a nagy négyzet esetén $2,5 \times 10^5$ -nel, a téglalap esetén 1×10^6 -nal a kis négyzet esetén 4×10^6 -nal kell megszoroznunk az átlag sejtszámot, hogy megkapjuk, mennyi az összes sejtszám a minta 1 ml-ében (FEKETE-KERTÉSZ et al. 1993.).

Spektrofotometria

A spektrofotometria az egyik leggyakrabban használt analitikai eljárás a biokémiában. A módszer igen alkalmas kis mennyiségű anyag gyors, egyszerű, rutinszerű mérésére. A mérés feltétele az, hogy a vizsgált anyagnak a színek valamelyik pontján abszorpciós maximuma legyen. Ha az abszorpciós maximum a spektrum látható tartományába esik, az anyag színes. A látható tartományban elvégezhető analízisek száma igen nagy. Ha a vizsgálandó anyagnak magának nincs színe, valamilyen kémiai reakciót kell végezni a kérdéses anyaggal, ami színes vegyület képződéséhez vezet.

Ezen kívül az ultraibolya tartományú analízisek is széles körben elterjedtek, mivel sok színtelen anyagnak van ezen a területen (190 - 320 nm) intenzív elnyelési sávja.

A spektrofotometriás mennyiségi analízisek az oldatok fényelnyelésére vonatkozó Lambert-Beer-törvényen alapulnak. A fényelnyelés nagyságából az abszorbeáló komponens koncentrációjára lehet következtetni, a következő összefüggések alapján.

Ha a fény I_0 intenzitása a közeg L vastagságú rétegén áthaladva I -re csökken, akkor a Lambert-Beer-törvény értelmében:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

A $\log \frac{I_0}{I}$ kifejezést extinkciónak (E) vagy abszorbanciának (A), esetleg optikaisűrűségnek (optikai denzitás, OD) nevezzük. Olyan hullámhossznál, amelynél az oldószer nem abszorbeál, a Lambert-Beer-törvény szerint E arányos az oldat c koncentrációjával, ha az oldott anyag a hígítás alkalmával nem megy át molekuláris változáson. A törvény csak adott hullámhosszú monokromatizált fény esetén érvényes. ε az oldott anyag koncentrációjától független állandó, melyet extinkciós koefficiensnek hívunk. Ha a koncentrációt mol/l-ben fejezzük ki, akkor moláris extinkciós koefficiensről, vagy moláris abszorptivitásról beszélünk. A moláris abszorptivitás megadja, hogy adott hullámhosszon 1 cm-es rétegvastagság esetén 1 mol/l (M) koncentrációjú oldatnak mekkora extinkció felel meg, mértékegysége a $M^{-1}cm^{-1}$. Értéke az adott anyagra jellemző, de függ az oldószertől és a hőmérséklettől.

A fenti összefüggések alapján tehát a fényelnyelés mértékéből a koncentráció kiszámítható:

$$C = \frac{E}{\varepsilon \cdot L}$$

Ha ε a moláris extinkciós koefficiens, akkor a „ c ” moláris koncentrációnak adódik. L a kuvetta (plánparallel üvegből, műanyagból, vagy kvarcból készült mérőedény) optikai úthosszúsága cm egységben kifejezve. Ha a mérendő anyag nem követi pontosan a Lambert-Beer törvényt, egyéb módon pontosan meghatározott koncentráció sorozat segítségével kalibrációs görbét készítünk. Ennek alapján megfelelő korrekcióval elvégezhetőek a mérések. Régebbi fotométerekben a transzmisszó (transzmittancia) értékét mérték:

$$T = I/I_0 \text{ vagy } T \% = I/I_0 \times 100$$

Összefüggése az extinkcióval:

$$E = \log \frac{100}{T\%} \text{ vagyis } E = 2 - \log T\% \text{ (LOCH et al., 1982.; KŐMÍVES, 2001.)}$$

Fehérje koncentráció meghatározása Bradford-módszerrel

Viszonylag új, mégis talán a legelterjedtebb fehérje meghatározási módszer. Az eljárás a Coomassie Brilliant Blue G250 festék azon tulajdonságán alapszik, hogy savas közegben kötődik (elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatással) a fehérjékhez (a fehérje arginin- és lizin-részeihez kötődik), ebből következik, hogy a különböző fehérjék meghatározása során a válaszok eltérőek lehetnek. Ezért a referenciaanyagként használt fehérjének azonosnak kell lennie a vizsgálandó fehérjével. Ekkor elnyelési maximuma 465-ről 595 nm-re tolódik el.

Előnye: nagyon érzékeny, a hasznos mérési tartomány 1-20 cg, és gyorsan kivitelezhető. Viszonylag kevés olyan anyag van, ami zavarja a mérést (urea és guanidin-hidroklorid jelenlétében is lehet mérni vele), de sajnos a detergenssek ilyenek. Nyomnyi mennyiségű mosogatószer is meghiúsíthatja a kapott eredményt.

Hátránya: a módszer meglehetősen aminosav összetétel-függő és megfesti a küvetákat is. Ehhez a vizsgálathoz minden tompítóoldatot és reagenst R desztillált vízzel kell készíteni.

Vizsgálati oldat. A vizsgálandó anyag megfelelő mennyiségét (100 µl) az előírt tompító oldatban oldjuk; az oldatot úgy készítjük, hogy koncentrációja a kalibrációs görbe tartományába essék (hígítási sor 1, 1:10, 1:100, 1:1000). A vizsgálandó mintákat duplán készítjük el.

Összehasonlító oldatok (Standard). A meghatározandó fehérjének megfelelő referenciaanyagot az előírt tompítóoldatban oldjuk. Az oldat részleteit ugyanazon tompítóoldattal hígítva legalább öt összehasonlító oldatot készítünk, melyeknek fehérjekoncentrációi egyenletesen oszlanak el egy megfelelő, 0,1-1 mg/ml közti tartományban.

Összeállításához szükséges: 1 g Bovine serum albumint (fehérje koncentrátum) feloldunk 11 desztillált vízzel. A kalibrációs görbe elkészítéséhez egy hígítási sort kell készítenünk az összehasonlító oldatból. Pipetáznunk kell 10 µl, 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl Bovine serum albumin oldatot, majd desztillált vízzel az így kapott sort 100 µl-re feltöltjük. A hígítási sort duplán készítjük el.

Üres oldat (vakminta). Azt a tompítóoldatot használjuk, amellyel a vizsgálati oldatot és az összehasonlító oldatot készítettük. Jelen esetben ez 100 µl desztillált vizet jelent.

Coomassie Brilliant Blue reagens. Összeállításához szükséges 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 festék, 50ml 95%-os etanol, 100 ml 85%-os foszforsav majd desztillált vízzel felöntjük 11-re. Wathman no1. szűrőpapír segítségével megszűrjük, a szűrés helyettesíthető centrifugálással: 6000 rpm-es sebességgel 20 percig (WALKER, 2002.).

Mérés menete:

A mérés első lépése a kalibrációs görbe elkészítése, a vakmintához és az összehasonlító oldatokhoz 5 ml Coomassie Brilliant Blue reagens-t adunk, összerázzuk majd az így kapott oldatok abszorbanciáját fotométer segítségével megmérjük 595 nm-n 2 perc elteltével majd ismételt összerázás után 1 óra múlva. A 2 perc utáni és az 1 óra elteltével történő mérést az indokolja, hogy az oldott fehérje és a Coomassie Brilliant Blue festék reakciója ennyi idő alatt zajlik le. A mérés értékei alapján kalibrációs görbét készíthetünk, melynek segítségével a későbbiekben megállapítható a minták fehérje koncentrációja (a Bovine serum albumin oldat fehérje koncentrációja ismert 1 mg /ml). A vizsgált oldatokhoz szintén 5 ml Coomassie Brilliant Blue reagens-t adunk, összerázás után 2 perc illetve ismételt összerázás után 1 óra múlva 595nm-n megmérjük az oldatok abszorbanciáját. A kapott abszorbancia értékeket a kalibrációs görbéhez viszonyítva megállapítható a minták fehérje koncentrációja.

3.3. A vágóhídról származó baromfi toll előkezelése

A vágóhídról származó nedves baromfi toll sterilizálásához autoklávozható speciális üvegedényekbe helyeztem a tollat, az üvegedényeket félig zárt kupakkal az autoklávbba helyeztem, majd beállítjuk a programot (115°C, 1,5-2,5 atm). Mivel a vizsgálatokhoz egyaránt szükség volt egész (folyékony táptalajhoz), illetve darált tollakra (szilárd táptalajhoz), a tollak egy része ezután nedves aprításon ment keresztül. Az aprított és az egész tollminta ezután a szárítószekrénybe került. 80°C-on 8 órát töltöttek a minták a szárítószekrényben. Az előaprított tollminta további daráláson ment keresztül (5. ábra.).



5. ábra: Szárított aprított baromfi toll minta (SAJÁT, 2014.)

3.4. A *Bacillus licheniformis* felszaporítása

A *Bacillus licheniformis* felszaporítása LB táptalajon történt. Az LB broth medium táptalaj összetétele a következő: 10 g/l fehérje (peptone), 5 g/l NaCl, 5g/l élesztő kivonat (MILLER, 1972). Az LB broth medium táptalaj pH-ja 7,5, ez megfelel a *Bacillus licheniformis* számára. A steril folyékony LB táptalaj előállítása autoklávban történt 121°C-on. A beoltás után 42°C-os inkubáció és 200 rpm rázatás után az első nap a Bürker kamrában történő sejtszámlálás után megállapítottam, hogy baktériumok rendkívül gyorsan felszaporodtak 91×10^6 sejtszámra 1 ml-ben. A vizsgálatokhoz szükséges $1-5 \times 10^6$ /ml sejtszámú oltóanyagot hígítással hoztam létre. A 91×10^6 /ml sejtszámú oldatot először a tízszeresére hígítottam, majd az így kapott $9,1 \times 10^6$ /ml sejtszámú oldatot a felére hígítottam így kaptam meg a megfelelő sejtszámú oltóanyagot $4,55 \times 10^6$ /ml.

3.4. Szilárd táptalajok előállítása

A keratinbontó *Bacillus licheniformis* baktérium aktivitásának vizsgálatához háromféle szilárd táptalajt készítettem el. Az „A” és „B” szilárd táptalaj alapvető tápanyagokban megegyezik, különbség egyedül a toll keratin szubsztrát (aprított toll) mennyiségében volt, az egyikben 1% a másikban 2%. A „C” táptalaj ezektől eltérő kazein-tartalmú táptalaj volt.

3.4.1. Az „A” szilárd táptalaj összetétele

A baktérium keratináz aktivitásának mérésére szolgáló táptalaj összetétele (KRIZSÁN, 2012.) (1 liter):

- 0,2 g KH_2PO_4 (kálium-foszfát),
- 0,1 g citromsav,
- 0,1 g élesztő kivonat,
- 1% toll keratin szubsztrát (10 g/l),
- 15 g agar,
- feltöltjük 1 literre desztillált vízzel.

A táptalajt 1 literre kell feltölteni desztillált vízzel. A táptalaj pH értékének 7,5-nek kell lennie, beállítása Tris-HCl-al (savas) és NaOH-al (lúgos) történt. A pH beállítása után, a táptalajt autoklávozni kellett 121°C-on, majd a táptalajt műanyag Petri-csészékbe tölteni. A táptalaj

megszilárdulása után elvégeztem az oltást ($20\ \mu\text{l}$ $4,55 \times 10^6$ sejtszámú *Bacillus licheniformis*) a táptalaj 4 sarkába hígítási sorral (1x, 10x, 100x, 1000x). Az oltókörök átmérője 10 mm volt. A feloldási zónák méretét 3 napon keresztül naponta egyszer mértem (KRIZSÁN, 2012.). OKOROMA et al, (2012) a nyers enzimet szintén 1:0, 1:10, 1:100, 1:1000 hígítással helyezte a 7 mm-es oltókörökbe, és úgy vizsgálta a hidrolízis köröket kazeines szilárd táptalajon. A legnagyobb oltóköröket produkáló törzseket szelektálta ki a további kísérletekhez.

3.4.2. A „B” szilárd táptalaj összetétele

A baktérium keratináz-aktivitásának mérésére szolgáló táptalaj összetétele (KRIZSÁN, 2012.) (1 liter):

- 0,2 g KH_2PO_4 (kálium-foszfát),
- 0,1 g citromsav,
- 0,1 g élesztő kivonat,
- 2% toll keratin szubsztrát (20 g/l),
- 15 g agar,
- feltöltjük 1 literre desztillált vízzel.

A táptalaj pH értékének beállítása, sterilizálása és a kísérlet beállítása a 3.4.1. bekezdés szerint történt.

3.4.3. A „C” szilárd táptalaj összetétele

A kazein tartalmú szilárd táptalaj összetétele (MARASABESSY et al., 2011.) (1liter):

- 10 g kazein,
- 15 g agar,
- feltöltjük 1 literre desztillált vízzel.

A táptalaj pH értékének beállítása, sterilizálása és a kísérlet beállítása a 3.4.1. bekezdés szerint történt. A feloldási zónák méretének vizsgálatát 3 napon keresztül naponta egyszer mértem. MARASABESSY et al. (2011) 9 mm-es oltóköröket használt, illetve a hígítási sor helyett a *Bacillus licheniformis* 3 különböző törzsének (BK21, BK22, BK23) és egy standard proteáz enzimnek a keratin-aktivitását hasonlította össze a speciális szilárd táptalajon.

3.5. Folyékony táptalajok előállítása

A folyékony táptalajokban a célom a toll:víz elegy oltása, a hidrolízis hatékonyságának vizsgálata és a biodegradáció során az oldott fehérje-tartalom meghatározása (Bradford-módszerrel) volt. A vizsgálatokhoz kétféle folyékony táptalajt készítettem el.

3.5.1. Az „A” folyékony táptalaj összetétele

Folyékony táptalaj (FAKHFAKH et al., 2011.) (1 liter):

- 0,5 g KH_2PO_4 (kálium-foszfát),
- 0,5 g K_2HPO_4 (dikálium-foszfát),
- 2,0 g NaCl (konyhasó),
- 0,1 g KCl (kálium-klorid),
- 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (magnézium szulfát 7 hidratos),
- feltöltjük 1 literre desztillált vízzel.

A táptalaj pH értékének beállítása és sterilizálása a 3.4.1. bekezdés szerint történt. Az autoklávozás után a folyékony táptalajból 200-200 ml-t öntöttem 1-1 db 500 ml-es lombikba. Mindkét lombikba 2-2 g egész baromfi tollat tettem és elvégeztem az oltást 1 ml $4,55 \times 10^6$ sejtszámú *Bacillus licheniformissal*. A vizsgálatok idejére a táptalajok rázató-pados inkubátor szekrénybe kerültek állandó 42°C-os hőmérsékletre és 200 rpm rázatasra. A két folyékony táptalajos lombik az *Folyékony 4A* és *Folyékony 4B* felirattal lett ellátva (6. ábra). A fehérjekoncentráció mérése 3 napon keresztül naponta egyszer történt Bradford-módszer segítségével. Emellett naponta figyelemmel kísértem a baktériumok szaporodását Bürker-kamra segítségével.



6. ábra: Folyékony táptalajok az inkubátor szekrényben (SAJÁT, 2014.)

3.5.2. A „B” folyékony táptalaj összetétele

Folyékony táptalaj (OKOROMA et al., 2012.) (1 liter):

- 0,7 g KH_2PO_4 (kálium-foszfát),
- 1,4 g K_2HPO_4 (dikálium-foszfát),
- 0,5 g NaCl (konyhasó),
- 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (magnézium szulfát 7 hidratos),
- feltöltjük 1 literre desztillált vízzel.

A pH beállítása és a sterilizálás a 3.4.1. bekezdésben leírtak alapján, a kísérlet beállítása a 3.5.1. bekezdés szerint történt.

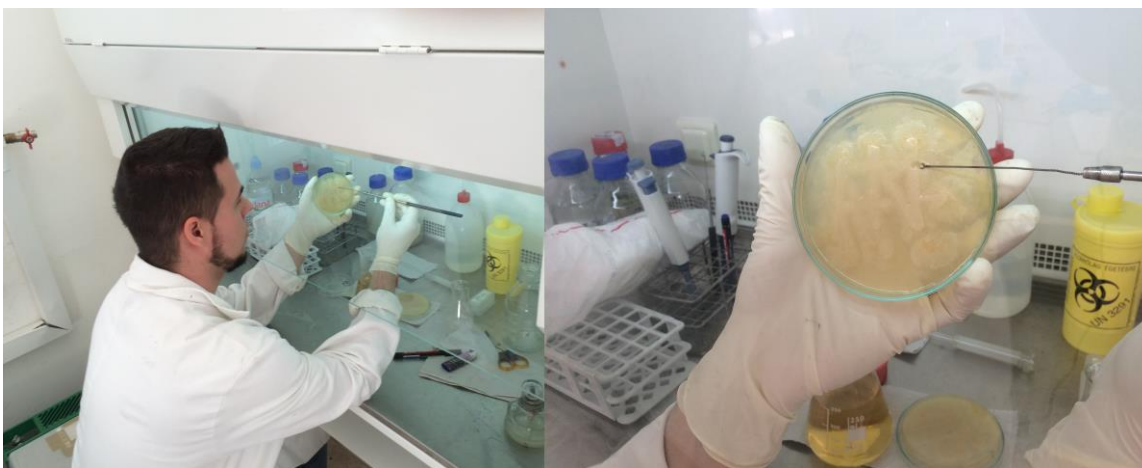
3.6. Keratin degradáció mértékének kiszámítása

A keratin degradáció mértékének kiszámítása (%) úgy történt, hogy a kezeletlen toll fehérje-tartalmát viszonyítottam a már folyékony táptalajban *Bacillus licheniformis*-sal kezelt toll fehérje-koncentrációjához, a két érték különbsége adta meg a degradáció mértékét (%). A kontroll kezelések esetében is elvégeztem az elemzéseket.

3.7. Vágóhídról származó baromfi tollról keratinbontó baktérium törzs kiszelektálása, fenntartása, a keratinbontó képességének meghatározása szilárd táptalajon

A vágóhídról származó toll semmilyen speciális kezelésem nem esett át, ioncserélt vízzel átöblítettem, majd steril fülke alatt az elkészített 2% tollat tartalmazó szilárd táptalajra (KRIZSÁN et al., 2012.) helyeztem, és többször megforgattam a mintákat. A táptalajban egyedüli

szén-, nitrogén-, és kénforrásként a darált tollpor szolgált. A táptalajokat 4-5 napig 20 és 30°C-os inkubátor szekrénybe tettem, majd azokat a baktériumokat, melyek látszólag nagyobb tollbontási aktivitást mutattak, agar-agaros szilárd LB táptalajra szelektáltam ki, hogy tiszta tenyészetet készítek. Miután az LB táptalajon az ismeretlen baktérium törzs tiszta tenyészetként felszaporodott, átoltottam folyékony LB táptalajra (7. ábra). A továbbiakban a 3.4. fejezetben ismertetett módon oltottam a kisselektált ismeretlen baktérium törzseket a speciális szilárd táptalajra, keratin-degradációs képességük meghatározása céljából.

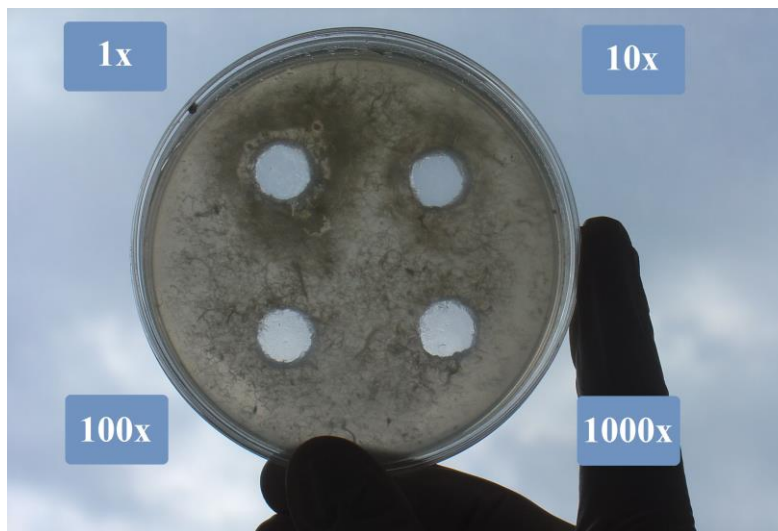


7. ábra: Kisselektált ismeretlen baktérium oltása folyékony LB táptalajra (SAJÁT, 2014.)

4. Eredmények és azok értékelése

4.1. Szilárd táptalajon folytatott vizsgálatok

Mindkét táptalaj esetén 10-10 db Petri-csészében folytattam a keratin-aktivitás vizsgálatot. A szilárd táptalajokon folytatott kísérletek során a feloldási zónák méretét mértem a beoltás napjától számítva három napon keresztül naponta egyszer. A mérést megnehezítette, hogy a feloldási zónák színe nem sokkal tért el a táptalaj színétől. Az „A” szilárd táptalaj fele annyi aprított tollat tartalmazott, mint a másik táptalaj, ezért sokkal áttetszőbb volt. Fény felé fordítva a Petri-csészét jól körvonalazódtak a feloldási zónák, és az is megfigyelhető, hogy bár az 1% tollat tartalmazó táptalaj esetén az 1000x-es hígítás a 3 nap elteltével nem adott mérhető feloldási zónát, az oltólyuk körüli aprított toll szájakon láthatóak voltak a keratin aktivitás jelei (sötétebb színűek) (8. ábra).



8. ábra: Keratin aktivitás vizsgálata az „A” szilárd táptalajon (SAJÁT, 2014.)

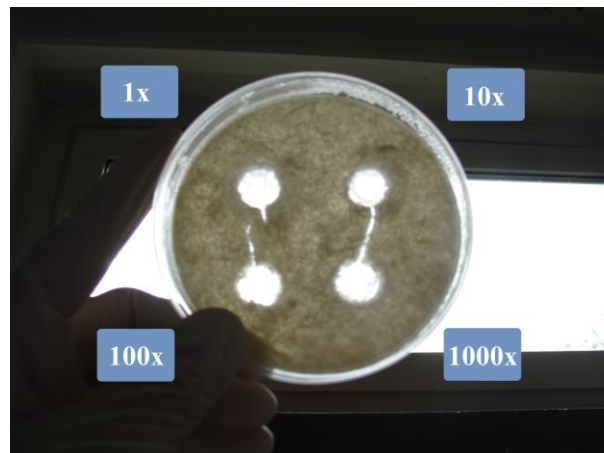
Az „A” táptalaj esetén 100x hígítás mellett a 10 ismételtsből hétszer adott mérhető oldódási zónát a vizsgálat. Három nap elteltével az „A” táptalajon a következő átlagos oldódási zóna értékeket kaptam; 1x hígítás esetén 24,1 mm, 10x hígítás esetén 14,4 mm, 100x hígítás mellett pedig 11,2 mm (1. melléklet). Az egyes mérési adatok között nem volt számottevő eltérés, amint ez a szórási adatokból is jól látható (4. táblázat).

4. táblázat: Az „A” táptalaj oldódási zóna értékeinek szórása

Szórás (mm)			
Hígítás	1. nap	2. nap	3. nap
1x	1,2	1,4	1,6
10x	0,5	0,6	0,7
100x	-	-	0,4

Az alacsony szórási értékek alapján arra következtetnek, hogy annak ellenére, hogy tollmintát nem sikerült egészen por állagúra aprítani, mégis egy viszonylag homogén összetételű táptalajt sikerült belőle készíteni.

A „B” táptalaj a dupla mennyiségű aprított toll miatt sokkal sűrűbb, és kevésbé átlátszó lett, ezzel jócskán megnehezítette a feloldódási zónák mérését (9. ábra). A dupla annyi mennyiségű toll (20 g/l) tömegét tekintve nem sokkal több, mint amennyi az „A” táptalajban volt. Ha térfogat szempontjából közelítjük meg, a mennyiség duplázásának hatására jelentősen több teret vesz el az aprított toll a víztől. Tehát a „B” táptalaj sokkal kevesebb vizet tartalmaz, ezért sokkal hamarabb ki is szárad, ez szintén egy olyan tényező, amely megnehezíti a vizsgálatokat. A korai kiszáradás hatására szilárd táptalaj sugár irányban repedezni kezd az oltólyukak széleitől kezdve (9. ábra).



9. ábra: Keratin aktivitás jelei a „B” szilárd táptalajon (SAJÁT, 2014.)

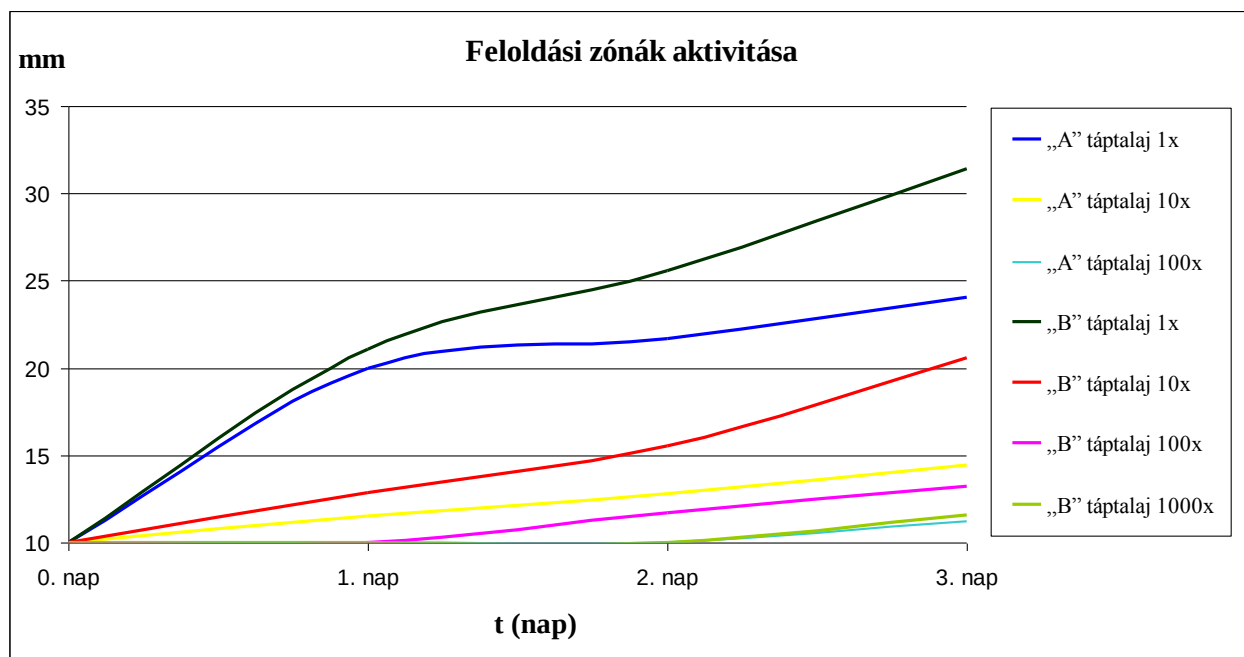
A „B” táptalaj esetén, mind a 10 táptalajon mérhető keratin aktivitás volt megfigyelhető 100x hígítás mellett, valamint a harmadik napon 1000x hígítás mellett is mérhető oldódási zónák jelentek meg. Három nap elteltével a „B” táptalajon a következő átlagos oldódási zóna értékeket

kaptam: 1x hígítás mellett 31,4 mm, 10x hígításnál 20,6 mm, 100x hígításnál 13,2 mm, 1000x hígításnál pedig 11,6 mm (2. melléklet). A szórási adatokat áttekintve (5. táblázat) jól látható, hogy az 1x hígításhoz tartozó szórási értékek a többi értékhez képest elég magasak. Ez az eltérés a mérési módszerem egyik hibájából ered. Az oldódási zónák az ismétlések körülbelül felénél kevésbé lettek koncentrikusak, sokkal inkább amorf alakúak voltak. Az oldódási zónák méretét úgy mértem, hogy megmértem a legnagyobb és a legkisebb átlót majd ezeket átlagoltam. Amorfa alakzatok esetén ez a mérési technika némi torzítást eredményezett, mint ahogy ez a szórási értékekben is meglátszik.

5. táblázat: A „B” táptalaj oldódási zóna értékeinek szórása

Szórás (mm)			
Hígítás	1. nap	2. nap	3. nap
1x	1,5	3,4	3,6
10x	1,2	1,7	1,6
100x	-	0,5	0,8
1000x	-	-	0,6

Ha összehasonlítjuk a két táptalaj értékeit (1. és 2. melléklet), megállapítható, hogy 1x és 10x hígítás mellett a feloldási zónák azonos időben kezdtek el kialakulni. 100x hígítás esetén már jelentős eltérés mutatkozik a két táptalaj között. Míg a B táptalajon már a második napon mérhető keratin aktivitást lehetett tapasztalni, az A táptalaj esetében csak a harmadik napon. Az 1000x hígítású oltásoknál még látványosabb különbség volt a két táptalaj között. Mérhető keratin aktivitás csak a B táptalajon jelentkezett a vizsgálat harmadik napján. A két táptalaj ezen eltérései rámutattak arra, hogy a *Bacillus licheniformis* aktivitását döntően befolyásolja a táptalajban található toll mennyisége (10. ábra).



10. ábra: Az „A” és „B” szilárd táptalajok keratin aktivitás görbéinek összehasonlítása

Az oldódási zónák méreteit összehasonlítva egyértelműen látszik, hogy a két táptalaj közötti különbség már az első naptól kezdve folyamatosan növekedett, a harmadik nap végére a „B” táptalajon átlagosan 30,3%-al nagyobb keratin aktivitás volt megfigyelhető (6. táblázat).

6. táblázat: A keratin aktivitás százalékos különbségei a „B” táptalaj javára

Magasabb keratin aktivitás a „B” táptalajban százalékban kifejezve			
Hígítás	1. nap	2. nap	3. nap
1x	+5,5%	+18,0%	+30,6%
10x	+11,7%	+21,7%	+42,7%
100x	-	-	+17,7%
Átlag:	+8,6%	+19,9%	+30,3%

4.2. Folyékony táptalajon folytatott vizsgálatok

A kétféle folyékony táptalajon végzett kísérletek célja a *Bacillus licheniformis* fehérjebontó-képességének vizsgálata volt. A szilárd táptalajon folytatott vizsgálatoktól eltérően a két táptalajba azonos mennyiségű egész baromfi toll került, a lényeges eltérés a két táptalaj összetételében volt (3.5. fejezet).

A kétféle táptalaj 2-2 db 500 ml-es lombikba lett öntve, egy lombikba 200 ml táptalaj került, tehát mindkét táptalajhoz tartozott 1-1 ismételtség a pontosabb értékelhetőség miatt, és 2-2 db 200 ml-es kontroll mintát is készítettem oltóanyag nélkül.

A fehérje koncentráció mérésekor mindegyik lombikból 2-2 mintát vettem. Így táptalajonként napi 4 mintán mértem meg a fehérje koncentrációt. Emellett naponta megtörtént a baktériumok sejtszámolása Bürker kamra segítségével.

A Bradford-módszer alapján történő fehérje koncentráció méréséhez szükség van egy kalibrációs görbére. Ez a kalibrációs görbe ismert fehérje-tartalmú oldatok abszorbanciáján alapszik (Bovine serum albumin oldat 1 mg/ml fehérje-tartalom), így ha elkészítjük a kalibrációs görbét, segítségével meghatározhatjuk a mintáink oldott fehérje-tartalmát.

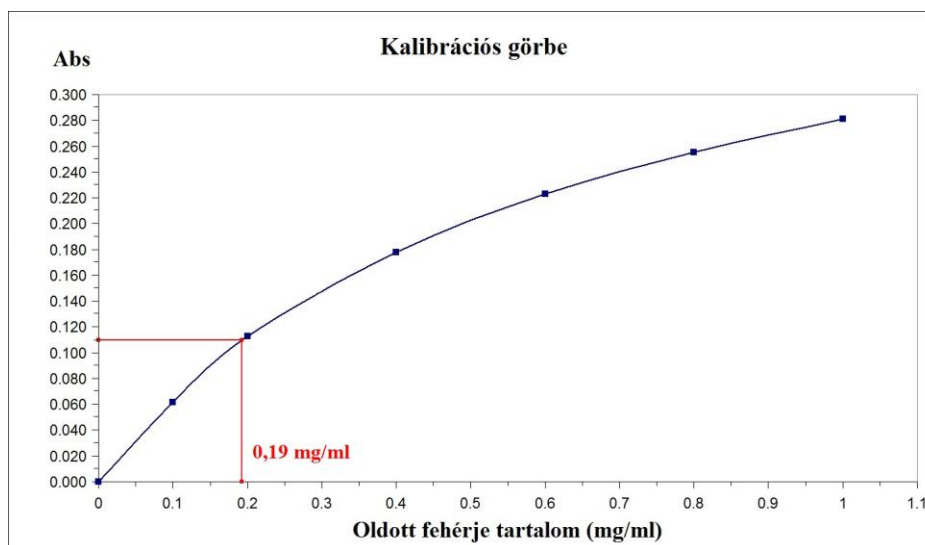
Az összes későbbi mérésünk pontossága a kalibrációs görbén múlik, ezért érdemes a kalibrációs görbéhez szükséges összehasonlító oldat hígítási sorából kettő hígítási sort készíteni (11. ábra). Továbbá rendkívül fontos, hogy az összehasonlító oldat (standard oldat) elkészítéséhez desztillált vizet használjunk.



11. ábra: Összehasonlító oldat hígítási sora (2x) (SAJÁT, 2014.)

Elkészítettem a két hígítási sort, az így kapott pontos eredmények alapján el tudtam készíteni a kalibrációs görbét. Amennyiben a méréseink pontosak, egy majdnem lineáris görbét kell adnia a kalibrációs görbének. A kalibrációs görbe segítségével meghatároztam a mintáink oldott fehérje-tartalmát a következő módon. A mérési adatok közül kiválasztottam egy abszorbancia értéket (6. melléklet). A 2. nap mérési adatai közül az „A2” minták átlagolt abszorbancia értékét

szemléltetem, ami 0,110 volt. Ezt az értéket felvettem a kalibrációs görbén és megkaptam a minta oldott fehérje-tartalmát, ami jelen esetben 0,19 mg/ml volt (12. ábra).



12. ábra: Fehérjekoncentráció meghatározása kalibrációs görbe alapján

Az összes oldott fehérje-tartalom érték kiszámítása után összevethetjük a két táptalaj hatékonyságát (7 táblázat).

7. táblázat: Oldott fehérje-tartalom

Táptalaj	Oldott fehérje-tartalom (mg/ml)			
	1. nap	2. nap	3. nap	5. nap
A1	0,10	0,19	0,47	0,65
A2	0,08	0,19	0,51	0,65
B1	0,13	0,25	0,56	0,81
B2	0,11	0,23	0,58	0,70

Egyértelműen látszik, hogy a „B” folyékony táptalaj (B1, B2) összetétele kedvezőbb volt a *Bacillus licheniformis* baktérium számára. Adott idő alatt több oldott fehérje keletkezett. A „B1” és a „B2” táptalaj utolsó mérési eredményei közt 15% eltérés volt, ennek a különbségnek okát abban látom, hogy egész tollak kerültek a táptalajokba, bár tömegre azonos mennyiségű baromfi

toll jutott mindegyik táptalajba, de szerkezetileg eltérőek lehetnek (szárnytollak, kisebb pihetollak stb.). Homogénebb baromfi toll minta állítható elő, ha az egész tollat ledaráljuk. A keratin fehérje degradációjának mértékét a két táptalaj esetében a 8. táblázat szemlélteti.

8. táblázat: Keratin degradáció mértéke „A” és „B” táptalajok esetén

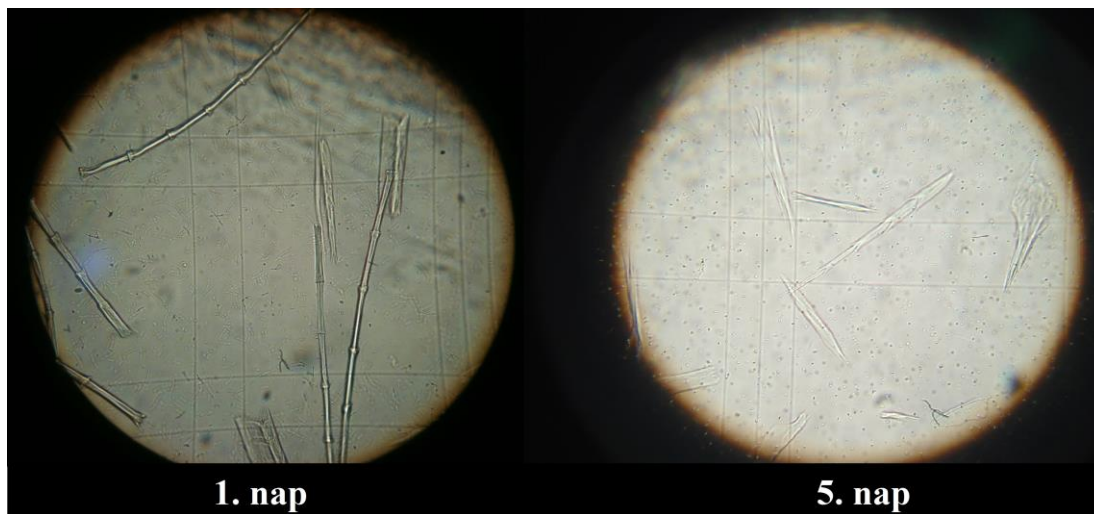
Táptalaj	Keratin degradáció mértéke (%)			
	1. nap	2. nap	3. nap	5. nap
A	1,02	2,16	5,56	7,37
B	1,14	2,72	6,47	8,62

A keratin feltáródásának mértékét elemezve a „B” típusú táptalaj bizonyult eredményesebbnek (+1,25%) azonos toll mennyiségek esetén. A folyékony táptalajos vizsgálatok másik tárgya a baktérium sejtszám növekedésének figyelemmel kísérése volt. A fehérje koncentráció mérése mellett minden mérés alkalmával Bürker kamra segítségével megszámláltam a baktériumok sejtszámát (9. táblázat).

9. táblázat: Baktérium sejtszám a táptalajokban

Táptalaj	Oltott sejtszám	Baktérium sejtszám (x10 ⁶ /ml)			
		1. nap	2. nap	3. nap	5. nap
A1	4,55	9,20	17,00	44,20	56,80
A2	4,55	8,80	16,40	46,40	56,80
B1	4,55	10,60	22,60	50,40	72,80
B2	4,55	9,80	21,00	52,00	66,40

Ha összevetjük a kapott eredményeket az oldott fehérje-tartalom mennyiségével, látszik, hogy a baktériumok sejtszáma egyenesen arányos az oldott fehérje-tartalommal, vagyis minél több a baktérium a táptalajban annál nagyobb a keratin aktivitás. A baktériumok sejtszámlálása közben, figyelemmel kísérhető volt a baromfi toll degradációja (13. ábra).

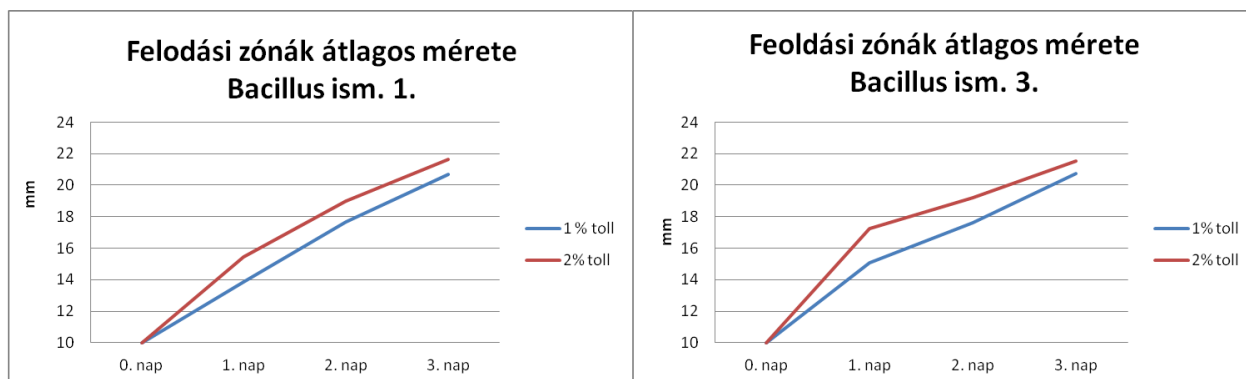


13. ábra: A B1 táptalaj mikroszkópos képe a kiindulási- és a végpontban (SAJÁT, 2014)

4.3. Vágóhídról származó baromfi tollról keratinbontó baktérium törzs kisselektálása, fenntartása, a keratinbontó képességének meghatározása szilárd táptalajon

A *Bacillus licheniformis* KK1 törzsének keratinbontó képességének vizsgálata után indokoltnak láttam, hogy más baktérium törzssel is összehasonlítsam.

A keratinbontó baktériumok kisselektálása során 5 különböző baktérium fenntartására és keratinbontó képességének meghatározására került sor szilárd speciális 1%-os és 2%-os aprított tollport tartalmazó táptalajokon (3.4. fejezet). Ezek közül az 1. és a 3. (3. melléklet) bizonyult eredményesnek a feloldási zónák mérete alapján (14. ábra).



14. ábra: Bacillus ismeretlen 1. és 3. keratinbontó baktérium aktivitása

A feloldási zónák mérete alapján mindkét baktérium esetében a több tollat tartalmazó táptalajon bizonyultak hatékonyabbnak, de a hatékonyság mértéke nem arányos a többlet toll mennyiséggel (50%). Az „A” és „B” szilárd táptalaj színe és baktérium telepek hasonló színe miatt az oldódási körök mérése meglehetősen nehézkesnek bizonyult (15. ábra).

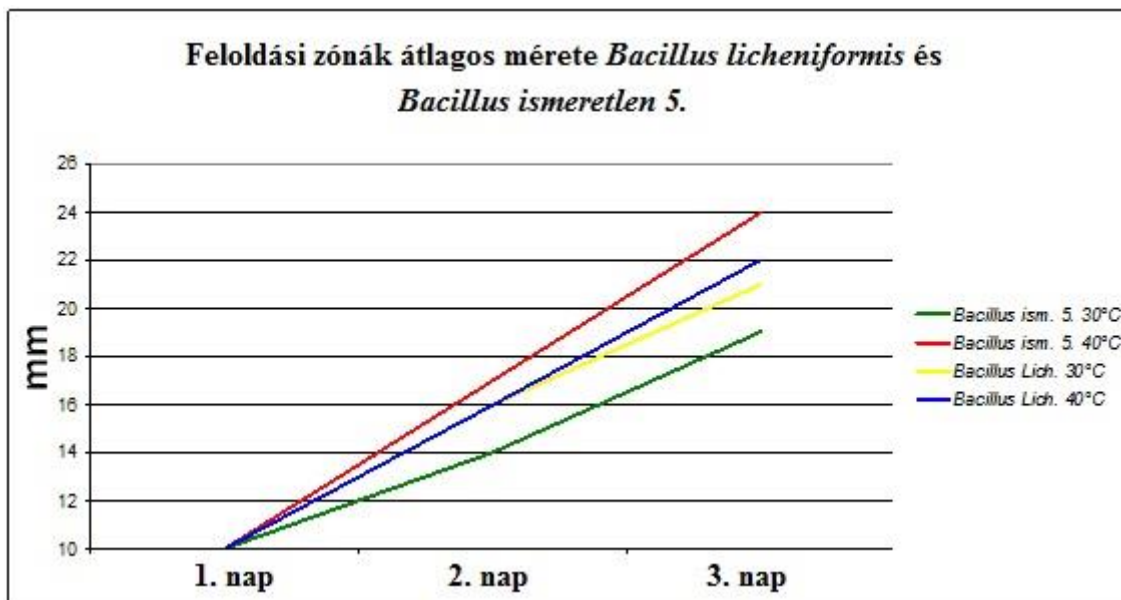


15. ábra: 1. ismeretlen baktérium oldódási zónái (SAJÁT, 2014)

Ezért úgy döntöttem a könnyebb mérhetőség miatt az 5. ismeretlen baktérium proteolitikus aktivitását a közel átlátszó színű kazeines táptalajon (3.4.3. fejezet) vizsgálom 30 és 40°C hőmérsékleten (4. melléklet). Mivel ezen a táptalajon még nem teszteltem a *Bacillus licheniformis* KK1-es törzsét, ezért ezt is elvégeztem, hogy össze tudjam hasonlítani az eredményeket (5. melléklet).

Az oldódási zónák annyira intenzíven növekedtek, hogy 3. napon már nem lehetett pontosan megmérni a zónákat annyira szétterjedtek a telepek, ebből arra következtetek, hogy a „C”

táptalaj sokkal kedvezőbb tápanyag összetétellel rendelkezik az „A” és „B” szilárd táptalajhoz képest. A 30 és 40°C fokon történő kezelésekkal igazolni tudtam, hogy a *Bacillus licheniformis* a szakirodalom szerinti 40-44°C fokon sokkal hatékonyabb, mint alacsonyabb hőmérsékleten. Az eredményeket összevetve az 5. ismeretlen baktérium értékeivel meglepő eredményt kaptam. Míg 30°C-on a *Bacillus licheniformis* proteolitikus aktivitása bizonyult nagyobbak, 40°C-on ez megfordult majdnem 10%-al bizonyult hatékonyabbnak az 5. ismeretlen baktérium (16. ábra).



16. ábra: Keratinbontó baktériumok aktivitása a „C” szilárd táptalajon

5. Következtetések és javaslatok

A szilárd táptalajon végzett vizsgálatok eredményei egyértelműen rámutattak arra, hogy a keratin aktivitás mértéke, a bevitt baromfi toll mennyiségének emelésével növekszik. Dupla annyi mennyiségű aprított baromfi toll hatására a keratin aktivitás 30%-al nőtt. Továbbá egyértelművé vált, hogy a táptalajban lévő toll mennyisége pozitív hatással van a *Bacillus licheniformis* szaporodására. A folyékony táptalajon végzett kísérletek eredményei rámutattak arra, hogy a *Bacillus licheniformis* sejtszáma (szaporodása) függ a táptalajok összetételétől. Tehát a keratinbontó tevékenység eredményessége nemcsak a táptalajban lévő toll mennyiségétől függ, hanem a tollon kívüli egyéb tápanyagoktól is (3.4.1. és 3.4.2. bekezdések). A „B” táptalaj kálium-foszfátból több mint másfélszer annyit tartalmazott, míg di-kálium foszfátból közel háromszor annyit tartalmazott, nátrium-kloridból viszont negyed annyit. Nem lehet egyértelműen megállapítani, hogy a kálium-foszfát, illetve a dikálium-foszfát többlete okozta-e, a nagyobb keratin aktivitást, vagy a nátrium-kloridban szegényebb összetétel. Ahhoz, hogy ezeket meg lehessen állapítani további célzott vizsgálatokra lenne szükség, olyan táptalajokat kellene összeállítani, melyek ezekre a paraméterekre adnának választ.

Azért fontos, hogy a *Bacillus licheniformis* számára megtaláljuk az ideális táptalaj összetételt, mert a minél magasabb hatásfok és az alacsony üzemeltetési költségek fontosak a nagyüzemi technológiába való átültetéshez. A gazdaságosság nemcsak az előkezelési eljárás során fontos szempont, hanem a biogáz előállítása során is. Alternatív energia forrásként csak úgy lehet versenyképes a fosszilis energiahordozókkal szemben, ha legyőzi őket az árversenyben.

Továbbá szükségesnek tartom, hogy a *Bacillus licheniformis* összehasonlítsuk más keratinbontó baktériumok hatékonyságával. Az általam vizsgált 1. és 3. ismeretlen baktérium törzs a szilárd táptalajon alacsonyabb keratin aktivitási hatékonysággal bírt, mint a *Bacillus licheniformis* KK1 törzs. Az 5. ismeretlen baktérium törzs viszont közel 10%-al nagyobb keratin aktivitást mutatott a „C” szilárd táptalajon. További kutatások szükségesek ezen eredmény igazolására, javaslok folyékony táptalajon történő vizsgálatokat. Amennyiben továbbra is hatékonyabbnak bizonyul a *Bacillus licheniformis* KK1 törzsnél, mindenképpen javaslom a baktérium beazonosítását.

Összefoglalás

Vizsgálataimat a Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Víz- és Környezetgazdálkodási Intézetének mikrobiológiai laboratóriumában végeztem. A vágóhídról származó baromfi toll hulladék mikrobiológiai feltárását vizsgáltam, abból a célból, hogy minél hatékonyabban lehessen beilleszteni ezt a fajta állati eredetű hulladékot a biogáz termelés technológiájába. A baromfi toll keratin-tartalmának bontására a *Bacillus licheniformis* baktériumot használtam oltóanyagként. A keratin aktivitás vizsgálata a baromfi toll esetében nem rendelkezik egységes szakirodalommal, meghatározása drága és összetett. Szilárd táptalajon gomba esetében *Krizsán K. (2012)*, baktérium esetében *Okoroma et al., (2012.)* végzett hasonló vizsgálatokat, melyeknek módszertanát adaptáltuk az alkalmazott baktériumra. Kazeines táptalajon *Marasabessy et al. (2011)* végzett vizsgálatokat a *Bacillus licheniformis* BK21-, BK22- és BK23-as törzseivel, az általa használt táptalajt alkalmaztam a vizsgálataim során.

Szilárd és folyékony táptalajon folytattam a keratin aktivitás meghatározásával kapcsolatos vizsgálataim. A szilárd táptalajon végzett kísérleteim célja a baktérium szaporodási képessége, keratinbontási képessége és a táptalaj aprított baromfi toll-tartalmának összefüggését hivatott vizsgálni. A kísérlet során kétféle szilárd táptalajon Petri-csészékben figyeltem meg a baktériumok által létrehozott feloldási zónák méretét három napon keresztül. Megállapítottam, hogy a táptalajban a megkétszerezett mennyiségű baromfi toll hatására a *Bacillus licheniformis* baktérium 30%-al nagyobb feloldási zónákat, illetve oltóköröket produkált, tehát a keratinbontó képessége jelentősebbnek bizonyult.

A folyékony táptalajokon folytatott kísérletek célja az volt, hogy szűkítsem a *Bacillus licheniformis* baktérium számára szükséges tápanyagok körét, illetve elemezzem fehérjebontó képességét a két különböző táptalajban. Mindkét táptalajba azonos mennyiségű egész baromfi toll és azonos mennyiségű folyékony táptalaj került az „A” és „B” táptalajból. Három napon keresztül mértem a táptalajokban lévő oldott fehérje koncentrációt, és figyelemmel kísértem a baktériumok sejtszámának alakulását. A vizsgálatok eredménye megmutatta, hogy ahhoz, hogy a *Bacillus licheniformis* sikeresen bontsa a baromfi toll keratin-tartalmát, a toll mellett egyéb tápanyagokra is szüksége van. A tápanyagokban gazdagabb táptalajon a *Bacillus licheniformis* 17%-al hatékonyabban bontotta a toll keratin-tartalmát. A *Bacillus licheniformis* baktérium

sikeresnek bizonyult a vágóhídi baromfitoll keratin tartalmának bontásában. Indokoltnak vélem, hogy további kutatások tárgya legyen a jövőben. Továbbá szükségesnek tartom, hogy a *Bacillus licheniformis*-t összehasonlítsuk más keratinbontó baktériumok hatékonyságával. Az általam vizsgált 1. és 3. ismeretlen baktérium törzs a szilárd táptalajon alacsonyabb keratin aktivitási hatékonysággal bírt, mint a *Bacillus licheniformis* KK1 törzs. Az 5. ismeretlen baktérium törzs viszont közel 10%-al nagyobb keratin aktivitást mutatott a „C” szilárd táptalajon. Szükségesnek tartom ezen ismeretlen baktérium további vizsgálatát, hogy pontosan fel tudjuk mérni a hatékonyságát. Amennyiben továbbra is hatékonyabbnak bizonyul a *Bacillus licheniformis* KK1 törzsnél, mindenképpen javaslom a baktérium beazonosítását.

Szakirodalom jegyzék

1. ÁDÁM I.: 2001. A toll. A baromfitoll és feldolgozása. Scriptor Bt.. Budapest. 10-125.p.
2. BARÓTFI I.: 2000. Környezettechnika. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 5-55.p.
3. BITTON G.: 1994. Anaerobic digestion of wastewater and sludge. Wastewater Microbiology. Wiley-liss. New York. 229-245.p.
4. COHLBERG J. A.: 1993. The strukture of L-keratin. Trends Biochem. Sci. 40, 331-335.p.
5. DEÁK T. - MARÁZ A. - MOHÁCSINÉ FARKAS CS. - KISKÓ G.: 2006 Élelmiszer-mikrobiológia, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 250-263p.
6. DEUBLEIN D., STEINHAUSER A. 2008. Biogas from Waste and Renewable Resources. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA.
7. ELŐDI P.: 1980. Biokémia. Akadémia Kiadó. Budapest. 72-128., 543-621.p.
8. FAKHFAKH N. - GARGOURI M. - DAHMENI I. - SELLAMI-KAMOUN A. -, EL FEKI A. – NASRI M.: 2011. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Université de Sfax, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax. Sfax-Tunisie.
9. FEKETE-KERTÉSZ I. – PUSKÁS A.: 1993. Ipari mikrobiológiai gyakorlatok. BME Vegyészmérnöki Kar Tanszéki Munkaközösség. Műegyetemi Kiadó, Budapest
10. HALÁSZ J. - HANNUS I. - KIRICSI I.: 2007. Környezetvédelmi Technológia. JATE Press kiadó. Szeged. 113-124.p.
11. HEGYI GY. - KARDOS J. - KOVÁCS M. - MÁLNÁSI-CZIZMADIA A. - MICSONAI A. - NYITRAY L. - PÁL G. - RADNAI L. - REMÉNYI A. - VENEKEI I.: 2013. Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet. Eötvös Loránd Tudományegyetem. Budapest. 12.p.
12. HERBERT D.: 1964. Multistage continuous culture. Continuous Cultivation of Microorganisms 2nd Symposium, Prague, Academic Press, New York and London.
13. KEVEI F. - KUCSERA J.: 2002. Mikrobiológia I.. JATE Press Kiadó. Szeged. 174-178.
14. KŐMÍVES J.: 2001. Környezeti Analitika. Műegyetemi Kiadó. 62-103.p.
15. KRIZSÁN K.: 2012. Opportunista Patogén *Cochliobolus* Izolátumok Jellemzése. Doktori értekezés. Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék. Szeged. 1-64.p.

16. LOCH J. - KISS SZ.: 1982. Mezőgazdasági kémia gyakorlat III. Debreceni Agrártudományi Egyetem. 10-40.
17. MARASABESSY A. - MOEIS M.R. - SANDERS J. P. M. - WEUSTHUIS R. A.: 2011 Enhancing Jatropha oil extraction yield from the kernels assisted by a xylan-degrading bacterium to preserve protein structure. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 2027–2036p.
18. MÉZES L.: 2007. Hogyan termelhető állati hulladékból biogáz? Mindentudás egyeteme előadássorozat X. szemeszter. 2007.03.19.
20. MÉZES L. - BÍRÓ T. - TAMÁS J. - PETIS M.: 2007. Baromfi toll feltárhatóságának vizsgálata biogáz célú hasznosításhoz. Acta Agraria Debreceniensis. 26. ISSN: 1587-1282. 113-118.p.
19. MÉZES L.: 2009. A vágóhídról származó baromfi toll fizikai és kémiai kezelése. Debreceni Egyetem, Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma, Víz- és Környezetgazdálkodási Tanszék. 1-5.p.
21. MILLER J.H.: 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
22. OKOROMA E. A. - GARELICK H. - ABIOLA O. O. – PURCHASE D.: 2012. Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather. Department of Natural Sciences, School of Health and Social Sciences, Middlesex University, The Burroughs, London. 74. 54-60. p.
23. ONIFADE A.A. - SANE N.A. - MUSSALLAM A.A. - AL-ZARBAM S.: 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources, Biores. Technol. 66. 1-11.p.
24. STEINERT P.M.: 1993. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments, J. Invest. Dermatol. 100. 729-734.p.
25. SZABÓ J. – KERESZTÚRI P. – SZIGETI ZS. – PELES F. Á.: 2008. Mikrobiológiai Praktikum (általános, mezőgazdaság, élelmiszeripar, takarmányozás) Debreceni Egyetem, Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma, Mezőgazdaság tudományi Kar Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai Intézet. Debrecen 1-68. p.
26. SZENTIRMAI A.: 1996 Mikrobiológia alapjai (egyetemi jegyzet). Kossuth Lajos Tudományegyetem. Debrecen.

27. SZUNYOG I.: 2008 Magyarország elméleti biogáz potenciálja. Egy európai uniós kutatási projekt szemszögéből. Energoinfo. Energia Ügynökség Kht. 4-5. p.
28. TAMÁS J.: 1998. Szennyvíztisztítás és szennyvíziszap elhelyezés. Debreceni Agrártudományi Egyetem.
29. TIWARY E. - GUPTA R.: 2012. Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus Licheniformis* ER-15. J. Bioprocess Biotech. Volume 2. Issue 4:123 doi. 1-5. p.
30. WALKER J. M.: 2002. The Protein Protocols Handbook. Humana Press Inc.. Totowa, NJ 1-16.p.
31. WILLIAMS C.M. - RICHESTER C.S. - MACKENZI J.M. - SHIH J.C.H.: 1990. Isolation, identification and characterization of feather-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 56. 1509-1515.p.

Internetes források

- I1. KSH: 2011. Élő állatok és állati termékek termelése, felhasználása (2009-2011)
In: http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_oma001c.html, 2014.10.23. 14.40 h
- I2. EPA: 1997. *Bacillus licheniformis* Final Risk Assessment
In: <http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra005.htm>, 2014.10.22. 15.40 h
- I3. ALEXAY Z.: 2004. Mikrobiológia Környezetemérnök Hallgatók részére. Győr.
In: <http://gyorijegyzet.uw.hu/mikrobiol2.pdf>, 2014.10.20. 19.20 h
- I4. Az autokláv műszaki leírása
In: <http://www.dialab.hu/dok/12/Raypa%20Autoklav%20AES.pdf>, 2014.10.21. 19.00 h

Jogszabályok

1. 2148/2008. (X.31.) Kormány határozat
2. 1774/2002/EK Rendelete a nem emberi fogyasztásra szánt állati melléktermékekre vonatkozó egészségügyi előírások megállapításáról
3. 71/2003 FVM rendelet az állati hulladékok kezelésének és a hasznosításukkal készült termékek forgalomba hozatalának állat-egészségügyi szabályairól

Mellékletek

1. melléklet Az „A” szilárd táptalaj mérési eredményei

Táptalaj	Hígítás	1. nap	2. nap	3. nap
1/1.	1x	19,5	21,0	25,0
	10x	11,0	12,0	14,5
	100x	-	-	-
	1000x	-	-	-
1/2.	1x	18,5	20,5	22,0
	10x	11,5	12,5	14,0
	100x	-	-	11,0
	1000x	-	-	-
1/3.	1x	19,5	20,5	22,0
	10x	10,5	12,0	15,0
	100x	-	-	11,5
	1000x	-	-	-
1/4.	1x	21,0	22,5	26,0
	10x	11,0	12,5	13,5
	100x	-	-	11,0
	1000x	-	-	-
1/5.	1x	19,0	20,5	24,0
	10x	11,5	12,5	15,0
	100x	-	-	11,0
	1000x	-	-	-
1/6.	1x	19,5	21,0	23,5
	10x	12,0	13,0	15,0
	100x	-	-	12,0
	1000x	-	-	-
1/7.	1x	22,0	23,5	25,5
	10x	12,5	13,5	15,5
	100x	-	-	11,0
	1000x	-	-	-
1/8.	1x	22,0	24,0	26,0
	10x	12,0	14,0	15,5
	100x	-	-	11,0
	1000x	-	-	-
1/9.	1x	20,0	22,5	24,5
	10x	11,5	12,5	14,0
	100x	-	-	-
	1000x	-	-	-
1/10.	1x	19,0	20,5	22,0
	10x	11,5	12,5	13,5
	100x	-	-	-
	1000x	-	-	-
„A” táptalaj átlaga	1x	20,0	21,7	24,1
	10x	11,5	12,8	14,4
	100x	-	-	11,2
	1000x	-	-	-

2. melléklet A „B” szilárd táptalaj mérési eredményei

Táptalaj	Higitás	1. nap	2. nap	3. nap
2/1.	1x	21,0	30,0	35,0
	10x	11,5	14,0	19,5
	100x	-	11,0	12,5
	1000x	-	-	-
2/2.	1x	20,5	22,5	26,5
	10x	12,0	14,0	20,5
	100x	-	11,5	13,0
	1000x	-	-	11,5
2/3.	1x	22,0	28,0	32,5
	10x	13,0	15,5	21,0
	100x	-	12,5	13,5
	1000x	-	-	11,0
2/4.	1x	18,5	20,5	26,0
	10x	11,0	13,5	18,5
	100x	-	11,0	12,0
	1000x	-	-	-
2/5.	1x	19,5	21,0	28,5
	10x	12,0	14,0	19,5
	100x	-	11,5	13,0
	1000x	-	-	11,0
2/6.	1x	22,0	27,5	34,5
	10x	14,5	17,0	21,5
	100x	-	12,0	14,0
	1000x	-	-	12,5
2/7.	1x	23,5	29,5	36,5
	10x	14,5	18,5	23,0
	100x	-	12,0	14,5
	1000x	-	-	12,0
2/8.	1x	22,5	26,5	33,5
	10x	13,0	16,0	20,5
	100x	-	11,5	12,5
	1000x	-	-	11,0
2/9.	1x	20,0	24,5	29,5
	10x	13,0	15,5	19,0
	100x	-	11,5	13,0
	1000x	-	-	-
2/10.	1x	21,5	25,5	31,5
	10x	14,0	17,5	23,0
	100x	-	12,5	14,0
	1000x	-	-	12,0
„B” táptalaj átlaga	1x	21,1	25,6	31,4
	10x	12,9	15,6	20,6
	100x	-	11,7	13,2
	1000x	-	-	11,6

3. melléklet Az 1. 3. ismeretlen baktérium keratin aktivitása „A” és „B” táptalajokon

			2014. 04. 16.				2015. 04. 17.				2016. 04. 18.			
			1x	10x	100x	1000x	1x	10x	100x	1000x	1x	10x	100x	1000x
B. ism. 1.	1%	1	18,0	15,5	12,5		22,5	20,0	15,5	13,0	25,0	22,0	18,5	15,5
		2	16,5	14,0	12,0		23,5	20,0	15,5	13,0	25,5	22,5	20,5	16,0
		3	17,0	15,0	12,5	11,0	23,0	18,5	15,0	12,5	27,0	22,0	18,5	15,5
	2%	1	20,5	17,5	13,0		23,0	19,0	16,5	14,5	26,0	23,5	21,5	17,0
		2	20,0	18,0	13,5	11,0	24,0	21,5	16,5	14,0	26,0	23,0	21,0	17,0
		3	19,5	17,0	13,5	11,0	24,5	22,5	17,0	15,0	25,5	25,0	18,5	16,0
B. ism. 3.	1%	1	18,5	15,5	14,0		22,5	21,0	18,5	12,5	28,0	25,0	22,0	15,0
		2	16,5	13,5	12,5		20,5	19,5	15,0	11,5	23,0	21,5	17,5	14,0
		3												
	2%	1	18,5	17,5	14,5		24,0	20,5	17,0	13,5	27,0	22,5	18,5	14,5
		2	20,0	17,0	14,0		23,0	22,5	17,0	15,0	25,0	26,0	23,0	16,5
		3	21,0	18,0	14,5		24,5	21,0	18,0	14,5	25,5	24,0	19,5	16,5

4. melléklet *Bacillus* ismeretlen 5. mérési eredményei a „C” táptalajon

		<i>Bacillus</i> ismeretlen 5.		
		Feloldási zóna mérete (mm)		
Hőmérséklet	Higitás	0. nap	1. nap	2. nap
30°C	1x	-	14,0	19,0
	10x	-	-	18,0
	100x	-	-	13,0
	1000x	-	-	11,0
40°C	1x	-	17,0	24,0
	10x	-	10,5	20,0
	100x	-	-	16,0
	1000x	-	-	13,0

5. melléklet *Bacillus licheniformis* mérési eredményei a „C” táptalajon

		<i>Bacillus licheniformis</i>		
		Feloldási zóna mérete (mm)		
Hőmérséklet	Higitás	0. nap	1. nap	2. nap
30°C	1x	-	13,5	22,0
	10x	-	-	20,0
	100x	-	-	17,0
	1000x	-	-	14,0
40°C	1x	-	16,0	21,0
	10x	-	13,0	19,0
	100x	-	10,5	16,0
	1000x	-	-	15,0

6. melléklet A spektrofotométeres vizsgálatok eredményei

1. nap				
Táptalaj	Minta	Abs (2perc)	Abs (1 óra)	Abs átlag
A1	A1/1	0,060	0,065	0,063
	A1/2	0,063	0,064	
A2	A2/1	0,056	0,058	0,055
	A2/1	0,053	0,054	
B1	B1/1	0,075	0,076	0,079
	B1/2	0,083	0,081	
B2	B2/1	0,071	0,073	0,071
	B2/2	0,068	0,071	
2. nap				
Táptalaj	Minta	Abs (2perc)	Abs (1 óra)	Abs átlag
A1	A1/1	0,108	0,110	0,108
	A1/2	0,105	0,108	
A2	A2/1	0,107	0,109	0,110
	A2/1	0,110	0,112	
B1	B1/1	0,129	0,134	0,130
	B1/2	0,124	0,131	
B2	B2/1	0,122	0,125	0,124
	B2/2	0,125	0,124	
3. nap				
Táptalaj	Minta	Abs (2perc)	Abs (1 óra)	Abs átlag
A1	A1/1	0,192	0,194	0,195
	A1/2	0,196	0,199	
A2	A2/1	0,202	0,204	0,203
	A2/1	0,199	0,205	
B1	B1/1	0,211	0,210	0,214
	B1/2	0,215	0,218	
B2	B2/1	0,219	0,223	0,218
	B2/2	0,214	0,217	
5. nap				
Táptalaj	Minta	Abs (2perc)	Abs (1 óra)	Abs átlag
A1	A1/1	0,231	0,233	0,234
	A1/2	0,234	0,237	
A2	A2/1	0,229	0,235	0,232
	A2/1	0,228	0,235	
B1	B1/1	0,258	0,262	0,258
	B1/2	0,253	0,259	
B2	B2/1	0,241	0,244	0,241
	B2/2	0,238	0,240	

Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki konzulensemnek **Dr. Mézes Lili** egyetemi tanársegédnek, valamint **Bíró Györgyi** Ph.D. hallgatónak, szakmai és minden olyan jellegű támogatásért, amellyel dolgozatom elkészítését segítették, továbbá köszönöm a Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Víz- és Környezetgazdálkodási Intézetének, és az intézet igazgatójának **Prof. Dr. Tamás János** Úrnak, hogy lehetővé tették tudományos diákkori dolgozatomhoz szükséges vizsgálataim elvégzését.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Kovács L. Kornélnak és Dr. Bagi Zoltánnak (SzTE TTIK, Biotechnológiai Tanszék) a kutatás során nyújtott szakmai segítségükért. A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

NYILATKOZAT

Alulírott.....MOLNÁR SZABOLCS.....büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy a tudományos diákköri dolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a tudományos diákköri dolgozatra vonatkozó jogszabályokat betartottam.

Debrecen, ..2014.10.27......

.....Molnár Szabolcs.....

Aláírás

Születési idő: 1986.02.11.