



TDK Dolgozat

Lisztkekacok (*Tenebrio molitor*) emésztőrendszerének mikrobiológiai vizsgálata

Témavezető: Dr. Szabó István

egy. docens, tanszékvezető

Pályázó: Vajnai Zoltán

MSc 2. évfolyam

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai tanszék

**Gödöllő
2021**

1. Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	4
2.	Szakirodalmi áttekintés	6
2.1.	Hulladék piramis – Hulladék hierarchia	6
2.2.	Hulladékok fajtái.....	7
2.2.1.	Biohulladék és biológiailag lebomló hulladék	8
2.2.2.	Települési vagy kommunális hulladék	9
2.2.3.	A települési hulladék szerves része	10
2.2.4.	Élelmiszer hulladék – élelmiszer pazarlás, globális kitekintés	11
2.3.	A lisztbogár-lisztukac bemutatása	11
2.3.1.	Rendszertani besorolás és általános jellemzők.....	11
2.3.2.	A Lisztukac felhasználása	14
2.3.3.	A lisztukac beltartalmi tulajdonságai	15
2.3.4.	Hulladékhasznosítás lisztukaccal	16
2.3.5.	A lisztukac műanyagbontó képessége.....	17
2.4.	16S rRNS alapú baktérium faj meghatározás	19
3.	Anyag és módszer	20
3.1.	Lisztukac tenyészet	20
3.2.	Lisztukac boncolás	20
3.3.	A lisztukac bélbaktériumok kitenyésztésének folyamata	22
3.4.	A baktériumtörzsek hosszútávú tárolása -80 Celsius fokon	23
3.5.	A DNS izolálás módszerleírása.....	23
3.6.	Önellenőrzés agaróz gél elektroforézissel.....	24
3.7.	16S rDNS PCR	26
3.8.	A PCR termék tisztítása	27
3.9.	Szekvenáló PCR.....	28
3.10.	Kicsapatás	29
3.11.	Szekvenálás	29
4.	Eredmények	31
4.1.	A kiválasztott baktérium telepek morfológiai leírása	31
4.2.	A szekvenálási eredmények előkészítése.....	31
4.3.	Az eredmények értékelése	32
4.4.	Az MWGA-5 törzs teljes 16S rRNS szekvenciája.....	34
4.5.	Az identifikáció során előkerült fajok leírása	35

5.	Következtetések	38
6.	Javaslatok	40
7.	Köszönetnyilvánítás	41
8.	Irodalomjegyzék	42

1. Bevezetés

A népességnövekedéssel és a globális életszínvonal növekedésével együtt folyamatosan növekednek a Föld lakosságának különböző szükségletei, és ezzel párhuzamosan kibocsájtásai. Ilyenek többek között az élelmiszer szükséglet és az ezzel kapcsolatos hulladék termelés is. Az élelmiszer szükséglet növekedésével kapcsolatban ismert, hogy 2050-re 60-70%-kal több élelmiszerre lesz szükségünk, mint amennyit manapság előállítunk globális szinten.

Azt a szám adatot azonban már kevesebben szokták ismerni, hogy 2050-ig nagyjából ugyanekkora mértékben fog növekedni az emberiség hulladék termelése is. 2016-hoz képest.

Tehát 60%-kal több élelmiszerre lesz szükségünk és 60%-kal több hulladékot fogunk termelni. Ezek igen jelentős mennyiségű élelmiszert és hulladékot jelentenek. Különösen zavarba ejtőek ezek a számok, ha belegondolunk, hogy az emberiség az élelmiszer előteremtésének céljából már eddig is milyen hatalmas területeket formált át, hódított el a természettől, milyen mennyiségű fosszilis energiát és kemikáliát használt fel a mezőgazdaságban és ezzel milyen hatást gyakorolt a globális ökoszisztémára.

A mezőgazdaság jelenleg általánosan elterjedt eszköztárával nehezen elképzelhető, hogy kielégítsük a fent említett, jövőbeni igényeket. Az egyik nagy probléma, hogy a nagyüzemi mezőgazdaság és élelmiszeripar sok esetben nem tartalmazza a körkörös gazdálkodás jellemzőit, amelyben a különböző ágazati elemek zárt rendszerré összeállva hatékonyan tudják hasznosítani a más szereplőknél keletkező értékes és értéktelenebb outputokat, hulladékokat. A körkörös gazdálkodás gyakorlati megvalósításával minimalizálható lehet a rendszeren kívülre kikerülő hulladék mennyisége, mert szinte minden alacsony értékű output felhasználásra kerül és magasabb értékű alapanyaggá, terméké alakul át. Ezen törekvések megvalósulása esetén csökken a mezőgazdaság-élelmiszeripar rendszeréből származó hulladék, miközben növekszik az előállított termékek mennyisége.

Az ilyen típusú gazdálkodás megvalósításához azonban szükség van olyan rendszerelemekre, amelyek rendelkeznek azzal a képességgel, hogy más termelő egységeknél keletkezett, értéktelen outputokat, hulladékokat, magasabb értékű terméké képesek átalakítani. Ilyen rendszerelem lehet a jövő mezőgazdaságában a rovartenyésztés hulladékok felhasználásával. A rovarok az élővilágban sokféle feladatott töltenek be, de ami a számunkra legfontosabb, hogy jelentős szerepük van a lebontó folyamatokban, vagyis az elhalt állati és növényi szervesanyagok hasznosításában, a rendszerbe való visszaforgatásában. Emellett a rovarok

nagyon sok magasabb rendű állat számára jelentenek természetes táplálékforrást. A rovartenyésztésnek tehát a mezőgazdaság és élelmiszeripar rendszerébe való integrálásával, a növénytermesztési és állattenyésztési ágazatokból származó, növényi és állati eredetű hulladékoknak, jelentős része hasznosíthatóvá válhat, oly módon, hogy közben az állattenyésztés és az akvakultúra számára, de akár humán fogyasztási célra is tápanyagokban gazdag, rovaralapú termékeket állít elő. Az egyes rovarfajokban rejlő lehetőségek minél szélesebb körű kihasználása azonban még sok kutatómunkát igényel. Szükséges az egyes fajok és azok igényeinek minél alaposabb megismerése. Valamint szükséges a szervesanyag és hulladék hasznosító képességük feltérképezése és megértése. Ehhez többek között elengedhetetlen a rovarok tápcsatornájában élő, az emésztési folyamatokban résztvevő, mikrobiális közösség megismerése, amely valószínűleg nagymértékben hozzájárul egy-egy rovarfaj alkalmazhatóságának sikeréhez. Ezzel együtt a mikrobiális közösség akár állat és humánegészségügyi veszélyforrást is jelenthet, tovább növelve ezzel az alap kutatások szükségességét.

TDK dolgozatomban a Közöséges lisztbogár (*Tenebrio molitor*) fajt és ennek lárváját a rovartenyésztésben sokszor használt ún. lisztukacot választottam kutatásom alapjául. Célom volt, hogy a lisztukacok emésztőrendszeréből baktériumokat izoláljak, valamint, hogy az izolált törzseket molekuláris biológiai módszerekkel faji szinten identifikáljam. Mivel a lisztukacok emésztőrendszerét célzó kutatások újkeletűnek számítanak, a lisztukac bélből való mintavételnek nincsen kialakult gyakorlata. Ezért további célként tűztem ki azt is, hogy módszert dolgozzak ki a faj emésztőrendszeréből való bakteriális mintavételre.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Hulladék piramis – Hulladék hierarchia

Az Európai Unió az 2008/98 EK hulladékokról szóló keretirányelvében már hivatkozik a hulladék hierarchia rendszerére, ami megoldást kínálhat, egyes nyersanyagforrások kimerülésére. Ezen visszanyerhető nyersanyag források kimerüléséért a lineáris anyagáramlási rendszert teszi felelőssé, amelyben egy kitermelt nyersanyag útja determináltan a hulladékká válás felé mutat (Mangesh et al. 2015). A hulladék hierarchia tulajdonképpen a hulladék keletkezésének és kezelésmódjainak megoszlását írja le. A hulladék hierarchiát szemléletesen az úgynevezett hulladék piramissal lehet bemutatni. A hulladék piramist kétféleképpen is szokták ábrázolni, az egyik a jelenlegi állapotot (1.kép) mutatja be.

1.kép A hulladék piramis



forrás: zoldmatek.hu

A piramis csúcsán található hulladék kezelési mód a megelőzés, egyértelműen az a legjobb, ha eleve nem keletkezik hulladék, amit aztán valamilyen módon kezelnünk kéne. Ezt követő, második legjobb módszer, amikor egy technológiát, vagy a saját életvitelünket úgy alakítjuk, hogy azzal minimalizáljuk a keletkező hulladékok mennyiségét. Harmadik módszer az újrahasználat, amikor a hulladékká vált terméket eredeti céljának megfelelően használunk újra, ilyen legtöbb betétdíjas csomagoló, tároló eszköz, például a szódászfifon, vagy a gázpalack. Ebben az esetben az adott anyag tényleges hulladékká válás nélkül többször is, akár hosszú

időn keresztül ellátja rendeltetési feladatát. Miközben az egyes újrahasználatok között nincs jelentős mértékű idő-, vagy energiaigényű lépés. Ezzel a módszerrel már a hulladékok keletkezésének, kezelésének jelentősebb részét kezelik, de mennyiségileg messze elmarad a jelenlegi hulladék kezelési gyakorlat következő három módjának volumenétől. Az újrafeldolgozást van, ahol anyagában történő hasznosításként emlegetik. Ekkor az anyagot nem eredeti formájában eredeti rendeltetésének megfelelően használják újra. Hanem összegyűjtés után nyersanyagként használják fel és új terméket készítenek belőle. Az újrafeldolgozás már nagyobb idő és energiaigényű folyamat, mint az újrahasználat, viszont a termékeknek hulladékoknak jóval szélesebb köre hasznosítható ilyen módon. A módszer előnye, hogy a nyersanyag nem vész el, vissza kerül a fogyasztási rendszerbe. Az újbóli termék előállításra nem feltétlenül van szükség primer nyersanyag kitermelésre. Az energiavisszanyeréssel, vagy energetikai hasznosítással a hulladékoknak még nagyobb hányadát kezelik. Ez tulajdonképpen a hulladék elégetését és a keletkező hőenergia hasznosítását jelenti. Itt már az anyag elvész, de energia tartalma még hasznosul. Ebben az esetben az anyag kikerül a körforgási rendszerből, új termék előállításához, a termék anyagának előteremtéséhez természeti erőforrások kiaknázására van szükség. A legutolsó, legkevésbé szerencsés hulladékkezelési eljárás, amivel a legnagyobb mennyiségű hulladékot kezelik, a lerakás. Lerakás során a hulladék kommunális, vagy veszélyes hulladéklerakóba kerül és sem eredeti rendeltetésnek megfelelően, sem anyagában, sem energia tartalmának vonatkozásában nem hasznosul.

A jövőbe mutató cél a hulladékhierarchiát illetően az, hogy a hulladékpiramist megfordítsuk, tehát a lehető legkevesebb dolog váljon véglegesen hulladékká, vagyis minimalizáljuk a lerakásra és az energetikai hasznosításra kerülő hulladékok mennyiségét. Ezzel párhuzamosan pedig törekedni kellene a hulladékok képződésének megelőzésére.

A hulladék piramis megfordítása, egyben azt is jelentené, hogy kialakulna körforgásos gazdaság alapja, hiszen abban a lineáris anyagfolyamatokat, amelyekben az anyag a hulladékká válás útján halad, olyan cirkuláris rendszerek váltják fel, amelyek fő jellemzője az újrahasználható, anyagában hasznosítható, anyagok, valamint a megújuló energiaforrások használata (Baranyai 2018).

2.2. Hulladékok fajtái

Annak érdekében, hogy megértsük a hulladékok rendszerezését elsőként szükséges jogszabályi szinten definiálni a hulladékokat. A magyar 2012. évi CLXXXV. törvény (Hulladéktörvény) értelmező rendelkezései alapján hulladéknak tekinthető minden anyag vagy tárgy, amelytől

birtokosa megválnak, megválni szándékozik vagy megválni köteles. A különböző hulladékokat a szaknyelv és a jog több módon kategorizálja. Az első ilyen megkülönböztetés a hulladék jelleg, melynek alapján veszélyes és nem veszélyes hulladékokat különböztetünk meg. Hasonlóképpen megkülönböztethetünk hulladékfajtákat. Ez azt az anyagfajtát jelöli, amelyből a hulladék képződött, így például fa, fém, papír, üveg, kompozit, műanyag, és biológiailag lebomló hulladékokat különíthetünk el. A hulladékok pontos összetétele alapján történő precíz megnevezésre a hulladéktípusokat állapítottak meg. Ezek a hulladékjegyzékről szóló miniszteri rendeletben meghatározott hulladékjegyzék szerinti azonosító kóddal jelölt hulladékok. A 72/2013. (VIII. 27.) VM rendelet jegyzékében három szintű osztályozással, főcsoport, alcsoport és ezen belül konkrét hulladéktípus megnevezésével történik a hulladékok csoportosítása. A hulladékokat a háromszintű osztályozásban 3x2 számjegyből álló hulladék azonosító kóddal (HAK) látták el. A HAK kódok az Európai Hulladékosztályozási Statisztikarendszerben használatos EWC kódoknak megfeleltethetőek, az egységes nyilvántartás és nyomon követhetőség érdekében. Mind a HAK, mind az EWC kódok * jelölést kapnak a 6 számjegy mellé, amennyiben a kódolt hulladék veszélyes hulladéknak számít ([http1](http://1)) A Hulladéktörvény praktikusán megkülönböztet további hulladék féléseket jellemző összetételük alapján. A teljesség igénye nélkül ilyenek: a biohulladék, biológiailag lebomló hulladék, élelmiszer-hulladék, építési-bontási hulladék, háztartási hulladék, háztartási hulladékhoz hasonló hulladék, vegyes hulladék, zöldhulladék, települési hulladék, lomhulladék, építési-bontási hulladék.

Jelen diplomadolgozat szempontjából leglényegesebb hulladék csoportok a biohulladék, a biológiailag lebomló hulladék, a települési hulladék és az élelmiszer hulladék. (2012. évi CLXXXV. törvény a hulladékról, 72/2013. (VIII. 27.) VM rendelet a hulladékjegyzékről)

2.2.1. Biohulladék és biológiailag lebomló hulladék

A biohulladék a Hulladéktörvény értelmezése szerint: „a biológiailag lebomló, kerti vagy parkból származó hulladék, háztartásban, irodában, étteremben, nagykereskedelmi, étkeztetési, vendéglátóipari és kiskereskedelmi létesítményben képződő élelmiszer- és konyhai hulladék, valamint az élelmiszer-feldolgozó üzemekben képződő hasonló hulladék”. Ennek értelmében a biohulladékban megjelenhetnek az alapvetően nem termelési tevékenységhez, tehát például nem a mezőgazdasághoz kötődő, kert gondozás, parkgondozás során keletkező, összegyűjtött jellemzően növényi részek. Ilyenek lehetnek például a hullott levél, a fűnyírásból származó vágott fű, a metszett, friss, fás részek vagy a hullott száraz fás részek, az elhasználódott

tápközegek. Továbbá ebben a hulladékcsoportban jelennek meg az élelmiszer fogyasztás különböző helyein keletkező élelmiszer és konyhai hulladékok, valamint az élelmiszerfeldolgozás helyén keletkező hasonló hulladékok.

A biológiailag lebomló hulladék fogalma a törvényben a következőképpen szerepel: „minden szervesanyag-tartalmú hulladék, amely aerob vagy anaerob úton biológiailag lebomlik vagy lebontható, ideértve a biohulladékot is” (2012. évi CLXXXV. törvény). A biológiailag lebomló hulladék tehát egy nagyobb halmazt jelöl, amelynek része a biohulladék is. Ebbe a halmazba számos olyan hulladék belefér, ami az előző értelmezés alapján nem biohulladék. Ilyenek lehetnek például a különböző állati eredetű hulladékok, mezőgazdasági termelés, vagy más termelőtevékenység során keletkező nem élelmiszer jellegű szerves hulladékok, lebomló anyagból készült használati eszközök, csomagoló anyagok, illetve adott esetben néhány fosszilizsénhidrogén eredetű, vagy szénhidrogénnel szennyezett hulladék is részét képezheti ennek a halmaznak, amennyiben azok biológiai úton lebonthatóak. Ebből kifolyólag a biohulladékok és biológiailag lebontható hulladékok anyagukban, vagy energetikai hasznosítás céljára több felhasználási területen is hasznos nyersanyagnak tekinthetők. Mahro és Timm már 2007-ben írtak arról, hogy a biohulladékokra többféle hasznosítási eljárás során is igény tarthatnak majd, de feltehetően az élelmiszer és takarmány előállítás célú felhasználás fog előnyt élvezni, a bioüzemanyag előállítással szemben (Mahro & Timm 2007). Ami tulajdonképpen meg is felel a hulladék hierarchia elveinek, hiszen az anyagában (élelmiszer és takarmány) történő hasznosítás előbbre való kedvezőbb, mint az energetikai hasznosítás (bioüzemanyag, biogáz).

2.2.2. Települési vagy kommunális hulladék

Fontos megemlíteni települési hulladékot, vagy más néven kommunális hulladékot is. Erről az 2012. évi CLXXXV. törvény értelmező rendelkezésben így olvashatunk: „a háztartási és a háztartási hulladékhoz hasonló hulladék, amely nem foglalja magában a termelésből, a mezőgazdaságból, az erdőszetből, a halászatból származó hulladékot, a nem közművel összegyűjtött háztartási szennyvizet, a szennyvízhálózatból és a szennyvízkezelő művekből származó hulladékot, így különösen a szennyvíziszapot, továbbá az elhasználódott járműveket, és az építési-bontási hulladékot”. Ez a hulladék nagy részben a háztartási, illetve a háztartáshoz hasonló hulladékból tevődik össze, melyek definíciói a következők: „háztartási hulladék: a háztartásban, ideértve a lakó-, üdülő, vagy hétvégi házas ingatlanban, valamint a háztartásokhoz tartozó közös használatú helyiségekben képződő vegyes és elkülönítetten gyűjtött hulladék,

amely magában foglalja a papír- és kartonpapír-, üveg-, fém- és műanyag hulladékot, biohulladékot, fa- és textil hulladékot, csomagolási hulladékot, elektromos és elektronikus berendezések hulladékait, elem- és akkumulátor hulladékot, továbbá a lom hulladékot, így különösen a matracokat és bútorokat”, illetve „háztartási hulladékhoz hasonló hulladék: az a vegyes, illetve elkülönítetten gyűjtött hulladék, amely a háztartáson kívül képződik, és jellegében, összetételében a háztartási hulladékhoz hasonló, így különösen a kiskereskedelemről, közigazgatásból, oktatásból, egészségügyi szolgáltatásokból, szállásadásból, étkeztetésből, valamint egyéb hasonló szolgáltatásokból és tevékenységekből származó hulladék”. Magyarországon a települési hulladék éves mennyisége nagyjából 3,7 millió tonna. A lakosságtól elszállított mennyiség 2,4 millió tonna. Ezen belül a különböző szelektíven gyűjtött hulladékok mennyisége folyamatosan növekszik, 2019-ben már meghaladta a 0,4 millió tonnát. Az összes szelektíven gyűjtött hulladék mennyisége pedig a KSH adatai szerint meghaladta az 1,2 millió tonnát (Központi Statisztikai Hivatal).

2.2.3. A települési hulladék szerves része

Azért fontos, ezekkel a hulladék csoportokkal foglalkozni, mert az összegyűjtött települési hulladéknak egy része, ahogy a törvény szövegéből is kiolvasható olyan hulladékokból tevődik össze, ami elkülönítetten gyűjtve biohulladéknak számítana. Ebből kifolyólag a települési hulladéknak ez a része valamilyen fenntartható, biológiai eljárással hasznosítható lenne ahelyett, hogy lerakásra, vagy termikus hasznosításra, azaz égetésre kerülne. A KSH adatai szerint 2006 és 2015 között a lakosságtól elszállított települési hulladékon belül a biohulladék aránya 20% körüli volt (1. táblázat), amivel az „egyéb” kategória után a második legnagyobb százalékos előfordulás tartozik hozzá, megelőzve ezzel a műanyag vagy a papír hulladékokat. Tehát a települési hulladéknak meghatározó, 1/5 részét a biohulladék teszi ki.

1. táblázat Az elszállított települési hulladék százalékos összetételét bemutató táblázat

5.5.3. A közszolgáltatás keretében elszállított települési hulladék összetétele (2006–2015)

Hulladék	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Papír	12,7	18,9	18,4	18,8	14,8	14,7	13,3	14,0	12,9	13,4
Textil	3,4	3,9	3,9	3,7	3,5	3,5	3,6	3,4	3,2	3,5
Műanyag	11,8	18,3	18,3	19,1	15,6	15,5	16,3	16,5	14,5	13,0
Üveg	3,7	4,0	4,1	4,0	4,4	4,1	4,4	4,1	3,5	3,5
Fém	2,8	2,6	2,9	2,9	3,1	3,3	3,2	3,0	2,2	1,8
Bio	22,0	20,2	21,3	20,7	19,2	19,0	20,3	21,0	22,9	22,5
Lomtalanítási	3,1	3,6	3,6	3,5	3,1	2,9	2,7	2,4	2,4	3,1
Egyéb	40,6	28,6	27,5	27,1	35,8	36,5	35,8	35,0	37,9	38,6
Veszélyes hulladék	..	..	..	0,2	0,4	0,6	0,4	0,6	0,5	0,7

forrás: Központi Statisztikai Hivatal

A KSH adatai szerint 2017-ben összesen 3,7 millió tonna települési szilárd hulladék keletkezett Magyarországon, aminek a becslések szerint nagyjából 27 százaléka, valamivel több mint 1 millió tonna volt a biohulladék. A szelektíven gyűjtött biohulladék ennek nagyjából az egy negyede. Ebből következik, hogy a biohulladék háromnegyedét elpazaroljuk, ugyanis a vegyes települési hulladék részeként 75%-ban hulladéklerakókba, 25%-ban hulladékégetőkbe kerül. A biohulladéknak nagyjából fele komposztálható, így, ha csak a komposzt formájában hasznosuló NPK növényi tápanyagok értékét vizsgáljuk, nagyságrendileg 10 milliárd forintnyi szervesanyag az, ami jelenleg a lerakókban és égetőkben végzi (Aleksza 2019).

2.2.4. Élelmiszer hulladék – élelmiszer pazarlás, globális kitekintés

A biohulladék, a fentebbi, magyar törvényi értelmezésnek megfelelően, egyrészt a különböző élelmiszer hulladékokat foglalja magában. Érdekes az élelmiszer és élelmiszeralapanyag eredetű hulladékok kapcsán globális kitekintést is tenni. Napjainkban Világ szinten az élelmiszer egyharmada kidobásra kerül (<http3>). Miközben a világ népességének 8,6 %-a éhezik és az éhezők száma évről évre növekszik (<http4>).

A megtermelt élelmiszer alapanyagokból minden feldolgozási szinten keletkezik veszteség. Először a betakarítás során pl. kombájn által elszórt szemek, majd a válogatásnál pl. nem „piacos” méretű zöldségek, később a tárolásnál pl. penészedés, a mozgatásnál és szállításnál pl. összenyomódás. Aztán az értékesítés és pulton tartás során is jelentkeznek ilyen veszteségek és végül a fogyasztók által megvásárolt élelmiszernek is jelentős része a kukában végzi. A veszteségek láncolatának első és hosszabbik sorát az angol szaknyelv „food loss”-nak nevezi, magyarul ezt úgy mondanánk élelmiszer veszteség. Ez a betakarítástól az értékesítésig keletkező veszteségeket foglalja magában. A veszteségek másik fele, ami már a fogyasztónál jelentkezik, ez a „food waste” vagyis élelmiszer pazarlás (<http5>).

2.3. A lisztbogár-lisztkukac bemutatása

2.3.1. Rendszertani besorolás és általános jellemzők

Az általam vizsgált rovarfaj a lisztbogár, illetve annak lárvája, a lisztkukac (3.kép). A közönséges lisztbogár *Tenebrio molitor*, a rovarok osztályába (*Insecta*), a bogarak rendjébe (*Coleoptera*), a mindenevőbogarak alrendjébe (*Polyphaga*) azon belül a gyászbogárfélék családjába (*Tenebrionidae*) tartozik. A családba olyan további ismertebb, hazai fajok tartoznak

még, mint a közönséges búzbogár, a kukorica kislisztbogár, a sároshátú bogár, a kékes gyászbogár és a poszogó taplóbogár.

3.kép A lisztbogár (*Tenebrio molitor*) és lárvája a lisztukac



forrás: theguardian.com

A gyászbogárfélék (*Tenebrionidae*) családja az egyik legnépesebb a rovarcsalád, melybe világszerte közel 20 ezer faj tartozik. A családra jellemző, hogy a bogarak színe matt fekete, vagy valamilyen sötét árnyalatú, ritkán fémfényű, innen ered a gyászbogár elnevezés. Több faj esetében a hátulsó pár, repülő szárny teljesen visszafejlődött vagy csökevényes. Van, hogy a szárnyfedők összenőtek, így ezek a fajok teljesen röpképtelenek. Az imágók jellemzően éjszakai állatok, ennek megfelelően a sötét helyeket kedvelik. Leggyakrabban, növényi anyagokkal, korhadó növényi részekkel, esetleg gombákkal táplálkoznak (Tóth 1999). Bogarokról lévén szó egyedfejlődésüket a holometabólia, vagyis a teljes, vagy tökéletes átalakulás jellemzi. A teljes átalakulás négy darab fejlődési szakaszból áll, ezek a pete, lárvastádium, báb és imágó alak. A *Tenebrionidae* családra jellemző lárvatípus az áldrótféreg, ez egy oligopod, azaz tor lábas, vagy kevés lábú lárvatípus (Juhász & Kozák 2009). A valódi drótféreg és az áldrótféreg közös jellemzői, hogy egész testük férgszerűen hosszúkas, egyenletesen hengeres. Kültakarójuk szklerotizált, vagyis kemény tapintású, kitines. Emellett fontos jellemzőjük, hogy három pár valódi lábbal rendelkeznek. A valódi drótféregnél a lábak hossza és vastagsága azonos, az áldrótféregnél azonban az első pár láb rendszerint hosszabb és vagy vastagabb. Ugyancsak különbség mutatkozik a szájszerveknél is, ahol a valódi drótféreg előreálló, jólfejlett rágó szájszervénél a felső ajak hiányzik, ezzel szemben az

áldrótférgék rágó szájszervénél alsó és felső ajkat is találunk. A lárvák fejlődésük során számos vedlésen mennek keresztül növekedésük ütemének megfelelően. A kemény, kitines kültakaró, a kutikula behatárolja a növekedést, mivel az nem nyújtható tetszőlegesen. Így a lárvák kutikulájukat időről-időre egyre nagyobb méretűre cserélik. Az egyes vedlések, amit idegen szóval ecdysis-nek is neveznek, a növekedés lépcsőfokainak is tekinthetők. A holometamorfózis utolsó előtti állomása a bábállapot. A lárvák az utolsó vedlésükkor levetik utolsó lárvakori páncéljukat és abból már bábingben, báb alakban bújnak elő. Jellemzően három bábtípust különböztetnek meg, ezek: a szabadbáb, a fedett báb és a tonnabáb. A bogarakra és így a gyászbogarak családjára is a szabadbáb jellemző. Ennél a bábtípusnál a bábing vékony hártyaszerű és ezen keresztül jól kivehető a későbbi imágó leendő testrészeinek alakja (Ujvárosi & Urák 2008). Egyes fajoknál, például a *Tenebrio* fajoknál a szabad bábok nem teljesen mozdulatlanok, hanem minimális „ficánkoló” mozgásra képesek. A korlátozott mozgás feltehetően a teljesen mozdulatlan bábtípusok kiszolgáltatottságával szemben, valamekkora védekezési lehetőséget biztosít az átalakulásban lévő állat számára (Bozsik 2015).

A fiatal lisztbogarak kelésüket követően még vajszerűek, aztán pár nap leforgása alatt színük előbb egyre sötétedő barnára, majd végül feketére változik. Ebből a tulajdonságukból ered az angol elnevezésük „darkling beetle”, ami sötétedő bogarat jelent (4.kép).

4.kép A lisztbogár (*Tenebrio molitor*) angol elnevezése sötétedő bogarat jelent



forrás: beardeddragonsworld.com

Egy hét elteltével a kifejlett bogarak már párosodnak és napokon belül a nőivarú egyedek lerakják az első petéiket. Egy átlagos nőstény egyszerre 100 - 200 petét is képes lerakni, egész élete során pedig összesen körülbelül 500 petét rak. A peték 1 - 2mm méretűek és ezekből 7-10 nap elteltével kelnek ki a nagyjából 3mm hosszú szabad szemmel alig látható vastagságú lárvák. A lárvák színe kezdetben egészen világos, majd pár hét elteltével előbb világos majd egyre sötétebb barnás-vöröses színűre változnak. Mivel a rovarok poikliotherm élőlények, vagyis

testhőmérsékletük a környezet hőmérsékletével együtt változik, így aktivitásuk, fejlődési sebességük nagyban függ ettől az abiotikus tényezőtől. Nagyjából 10 és 40°C fok között aktívak, de hő optimumuk, amikor a leggyorsabb fejlődésre képesek, valamivel 20°C fok felett kezdődik és 30°C fokig tart. Ezen a hőmérsékleten mennek végbe leggyorsabban a négy életsiklus fejlődési folyamatai. 25°C-on a teljes életsiklus nagyjából 5-6 hónapig tart a peték lerakásától, a lárva, majd bábállapoton át az imágók pusztulásáig. 10-15°C közötti hőmérsékleten ez a folyamat akár egy évet is igénybe vehet (Bjorg 2018). Hőoptimumuk közelében és megfelelő táplálék ellátottság mellett a lisztkukacok 3 hónapig növekednek, miközben akár 20-szor is vedlenek, mielőtt bebábozódnának. A bábállapotban történő átalakulás megfelelő körülmények között 7-10 napot vesz igénybe, de akár 3 hétig is eltarthat. A lisztkukacoknál, minden életszakaszra elmondható, hogy a fejlődési idő a populáción belül azonos környezeti tényezők mellett is egy harang görbének megfelelően alakul. Vagyis mind a peték kelésekor, mind a lárvák fejlődésekor és a bábállapotban, mind pedig a kifejlett imágóknál elmondható, hogy vannak olyan egyedek, amik a többségnél jóval rövidebb és vannak, amelyek a többségnél jóval hosszabb idő alatt mennek végig az adott fejlődési szakaszon (http2).

2.3.2. A Lisztkukac felhasználása

Európában már régóta jelen van a lisztkukac, de főként a hobbi állattartók körében ismert, akik eleségállatként élve, vagy egészben szárítva adják, madaraknak, hüllőknek, halaknak. Az utóbbi években azonban fejlődésnek indult a rovarliszt alapú tápok piaca is (Beynen 2018). A lisztkukac (*Tenebrio molitor*) és más ehető, vagy takarmányalapanyagként hasznosítható rovarfajok kutatására, valamint termelési célú tartására és hasznosítására egyre nagyobb érdeklődés irányul. 2017-ben az EU-ban engedélyezték a feldolgozott rovarfehérje termékek haltakarmányokban és házikedvencek eledelében (5.kép) való felhasználását is (EU 2017).

5.kép Magyar cég terméke a Cricksy Dog rovarfehérje alapú száraz kutyatáp



forrás:cricksydog.hu

A Föld sok országában hétköznapi dolognak számít a rovarfogyasztás. A FAO már 2013-ban tett ajánlásokat a rovartenyésztés és rovarfogyasztás témájában (FAO 2013). Új áttörésnek számított, hogy 2021 elején az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság emberi fogyasztásra alkalmasnak nyilvánította a lisztukacot (EU 2021a). A téma aktualitását mi sem jelzi jobban, mint hogy az EU-ban a nem oly régen, 2021. szeptember 7-én lépett hatályba az a jogszabály, amely engedélyezi a rovarfehérje takarmányozási célú felhasználását a sertés és baromfi ágazatban (EU 2021b). A trendek szerint tehát a rovartenyésztés elterjedése és intenzitása várhatóan jelentősen növekedni fog az elkövetkezendő évtizedekben.

2.3.3. A lisztukac beltartalmi tulajdonságai

A lisztukac és más rovarok étkezési vagy takarmányozási célú felhasználását az indokolja, hogy rendkívül magas zsír és fehérjetartalommal bírnak és ezek a legértékesebb tápanyagoknak számítanak, mivel a növényekben, néhány kivételtől eltekintve, jellemzően kis százalékban találhatóak meg. Zhao és társai 2016-ban a lisztukac fehérje táplálkozási célú felhasználási lehetőségeit vizsgálták. Alap adatokara vonatkozó eredményeik szerint a liofilizált lisztukac zsírtartalma 33% míg fehérjetartalma 51% volt. A lárvákból készült fehérjekivonat fehérjetartalma pedig elérte a 75%-ot. A lisztukac esetében a zsírtartalom igen széles skálán 23-47% között változhat (Siow 2021). A lisztukac beltartalmi értékei főként a már említett hőmérséklet és a takarmányellátottság, valamint takarmányösszetétel függvényében változnak (Zhang 2019). 2020-ban Rodjareon és munkatársainak kutatása alapján a lisztukac lárvák betakarítási idejének, vagyis, hogy a kelést követően hány napig nevelték a lárvákat (30-90 napig vizsgáldtak), nem volt hatása a rovarliszt emészthetőségére az *in vitro* haltakarmányozási kísérletük során. A fehérje és zsírtartalom mellett fontos megemlíteni ezek

összetételét, továbbá fontos a különböző elemek előfordulása is. Egy szintén 2020-as kutatásban szárazanyagra vonatkoztatva 29%-os zsír és 52%-os fehérjetartalom mellett, 4,3% hamu és 11,2% szénhidrát tartalmat mértek. A fehérjeösszetétel vizsgálatakor 19 aminosavat találtak. A lisztukacfehérje glutaminból tartalmazott a legtöbbet, esszenciális aminosavak közül pedig a valin, leucin és a lizin voltak a leggyakoribbak. A leggyakoribb zsírsav az olajsav volt, de meglehetősen magas volt az össze telítetlen zsírsavak aránya is 79%. Ez részletesebben 47% egyszeresen és 32% többszörösen telítetlen zsírsav tartalomból származott. Nyomelemek közül vasat 184, cinket 99, rezet 20, mangánt 19, krómot 1,9, káliumot 8914, kalciumot 320, magnéziumot 2333, nátriumot 437, szelént 0,13 mg/kg koncentrációban tartalmazott. Érdekes összehasonlítás, hogy a vasban gazdagnak tartott nyers marhahús 11,15 mg/kg-os vastartalmával szemben a lisztukac vastartalma egy nagyságrenddel nagyobb 184,17 mg/kg (Wu 2020).

2.3.4. Hulladékhasznosítás lisztukaccal

A különböző rovarok így például a lisztukac takarmányozási célú felhasználása nem csupán a beltartalmi tulajdonságaik miatt érdekes téma, hanem azért is, mert a rovartenyésztés input anyagaként, vagyis rovertakarmányként, különböző hulladékokat és melléktermékeket is használhatunk, ezzel hasznosítva azok szervesanyag tartalmát. Természetesen a különböző anyagokon eltérő ütemben növekednek a lisztukacok és a beltartalmi értékeik is változhatnak ennek függvényében. Egy 2019-es kutatásban 5 féle növénytermesztési mellékterméket hasonlítottak össze az elterjedt lisztukac takarmánynak számító búzakorpával. A rizs szalmán, rizs korpán, rizs ocsún, búzaszalmán, és kukorica szalmán nevelt lisztukacok túlélési aránya a búzakorpán neveltekhez hasonlóan alakult, a 32 napos nevelési időszak alatt, minden esetben 90% körüli, vagy afeletti volt a megmaradás. Az elfogyasztott melléktermék mennyiségében már szembeötlőbb különbségek voltak. Míg az egységnyi tömegű búzakorpa adag teljes mennyiségét elfogyasztották a kukacok, addig az egységnyi rizs szalma, rizs korpa és kukorica szalma mennyiségének csak 90-93%-át, a búzaszalmának 34%-át, a rizs ocsúnak pedig csak 25%-át fogyasztották el. Testtömegnövekedésben egyértelműen a búzakorpa szerepelt a legjobban a 6,5%-kal, ezt követte rizs szalma 3,6, a rizs korpa 2,9 és kukorica szalma 2,6 százalékkal. Feltételezésük szerint mérsékelt fejlődési sebesség a melléktermékek alacsony (3-4%) fehérjetartalmának következménye, ezért tisztán nem, csak keverékben javasolják őket lisztukac takarmánynak. Ugyanez a kutatás rámutatott arra is, hogy a lisztukacok emésztőrendszerükben képesek bontani a cellulózt, hemicellulózt és a lignint (Yang 2019). Egy

másik 2012-es kutatásban bomló zöldség hulladékon neveltek lisztkukacokat. Itt a 9 hetes vizsgálati időszak alatt, a lárvák az 5 kg takarmányt 704 gramm lárvabiomasszává alakították, miközben testtömegük 1000%-kal növekedett (Zheng 2012).

Vannak, akik úgy tartják, hogy az igazi körforgásos gazdálkodásnak a rovarok egy eddig hiányzó elemét képviselik, hiszen a több különböző ágazat alacsony értékű outputját, akár hulladékait tudják hasznosítani és ezek átalakításával értékes outputokat termelnek. Egy olasz kutatócsapat szerint a jelenlegi lisztkukac termelési technológiákkal egyelőre gazdaságilag nem éri meg, kiváltani a hagyományos fehérjehordozókat. Ugyanakkor vizsgálatuk kifejezetten arra irányult, hogy a jövőben milyen alacsonyértékű agár-élelmiszer ipari hulladékokon lehetne lisztkukacot termelni és ennek a folyamatnak milyen hasznos outputjai lehetnek még a rovarbiomasszaán kívül. Értékként jelenhet meg már maga a hulladék hasznosítás ténye, a hulladék mennyiségének csökkentése, állagának megváltozása, emellett a visszamaradt rovartrágya, idegenszóval frass, talaj kondicionálóként használható. A rovar „betakarításkor” jelentkező rovarbiomasszaán túl, a lisztkukacok egy másik, innovatív lehetőségeket magában hordozó outputot is termelnek, a külön gyűjthető kitint, amit vedlések után hagynak hátra. A kitin felhasználási lehetőségeinek kiaknázása még a modern biotechnológia, de használható például, különböző lebomló bevonatok, ragasztók, biopolimerek előállításához. Mindezekén túl a kutatócsoport foglalkozik azzal is, hogy a lisztkukacok képesek bizonyos műanyagok lebontására is, a bélrendszerükben található összetett mikrobaközösségnek köszönhetően (Sangiorgo 2021).

2.3.5. A lisztkukac műanyagbontó képessége

Az utóbbi években számos kutatás végeztek arra vonatkozóan, hogy a lisztkukac képesek-e, illetve milyen mértékben képesek lebontani különböző műanyagokat. Az egyik első nagy nyilvánosságot kapott tudományos cikk a témában 2015-ből származik. A kutatásban a Pekingi Egyetem és a Stanford Egyetem kutatói vettek részt, akik a polisztrén lisztkukacokkal történő biodegradációját vizsgálták. A kutatás során három csoportot alakítottak ki, az egyik csoport sztenderd búzakupát kapott táplálékként, a második csoport polisztrént sztirofoam formájában, a harmadik csoportot pedig semmit nem kapott. A 16 napos vizsgálati időszak alatt a korpán nevelt csoport szárazanyagra vonatkoztatott átlagos testtömege 33,6%-kal növekedett. A koplaltatott csoport testtömege 24,9%-kal csökkent, míg a műanyaggal etetett csoport testtömege 0,2%-kal növekedett, vagyis jóformán stagnált. Ebből tehát az következik, hogy bár a lisztkukacok nagy mértékben nem növekednek a polisztirol „takarmányon”, ugyanakkor

testtömegük nem is csökkent úgy mintha egyáltalán nem kaptak volna táplálékot. Vagyis korlátozott mértékben képesek voltak az emésztőrendszerükben hasznosítani a műanyagot és 16 napon keresztül megtartani az eredeti súlyukat (Yang 2015a). Ugyanez a kutatócsapat még 2015-ben pár hónappal később kiadott egy második tanulmányt is, amiben kifejezetten azt vizsgálták, hogy a műanyagbontó képesség a bélbaktériumoknak köszönhető-e? Itt Gentamicin antibiotikummal etették a kukacokat 10 napig, ami gyakorlatilag minimálisra csökkentette a baktériumok hozzájárulását az emésztési folyamathoz. Azt tapasztalták, hogy az inhibitorral etetett állatok elvesztették a polisztrén (PS) bontó képességüket. Tehát beigazolódott, hogy a különleges műanyagbontóképesség a bélbaktériumoknak köszönhető, nem pedig a rovar saját, például különleges enzimmészletének, tulajdonsága. Sikerült is egy baktérium fajt izolálniuk, egy *Exiguobacterium sp.* fajt, amely képes volt a PS felületén biofilmet képezni. Ez a baktérium in-vitro körülmények között, szuszpenzióban 60 nap alatt a jelenlévő PS 7,4%-át volt képes lebontani (Yang 2015b). A polisztrén bontás sikereit követően más műanyagok lisztukac általi lebontásával is elkezdtek kísérletezni. 2016-ban egy kutatócsoport polisztrén (PS) és kis sűrűségű polietilén (LDPE) biológiai bontásával (biodegradáció) kísérletezett. Azt találták, hogy a lisztukacok az elfogyasztott PS akár 48%-át képesek voltak átalakítani 12-14 órán belül. A LDPE-t is fogyasztó csoportnál valamivel alacsonyabb volt a „takarmány” bevitel, mint a tisztán PS-t fogyasztó csoportnál. A korpával való keverés pedig egyértelműen növelte a felvett műanyag mennyiséget. A mikrobiológiai vizsgálatok alapján a lisztukacok bélflórájának összetétele egyértelműen megváltozott a műanyagtakarmányozásra való átállítás után (Wu 2018). Egy 2018-as amerikai kutatásban polietilén (PET), illetve PS és PET-PS keverék etetésével, valamint ezek búzakupával való keverésével próbálkoztak. A kontroll csoport itt is tiszta búzakupát kapott. Azt találták, hogy a PET lisztukacokkal való biodegradálhatósága a PS-hez hasonlóan alakul, az elfogyasztott műanyagnak 49% feltehetően CO₂-vé alakul. A lisztukacok emésztő rendszerének mikrobiológia vizsgálata során találtak két mikroba csoportot (*Citrobacter sp.* and *Kosakonia sp.*), amelyek feltehetően mindkét műanyag bontásához erősen hozzájárultak. Emellett voltak olyan mikrobák is, amelyek csak az egyik műanyag bontása során voltak jellemzőek. A kutatás tehát arra enged következtetni, hogy a lisztukac emésztőrendszer mikrobiológiai összetétele magas alkalmazkodóképességgel bír és ennek köszönhetően különböző, kémiaiilag eltérő műanyag típusok bontására is alkalmas lehet (Brandon 2018). Kulcsfontosságú tehát a lisztukacok emésztőrendszerében található mikrobiális közösség legalább faji szintű megismerése. Ennek ma legmodernebb módszerei a molekuláris biológiai módszerek.

2.4. 16S rRNS alapú baktérium faj meghatározás

Napjainkban a modern mikrobiológiában a baktériumok megbízható fajszerinti meghatározásának legelterjedtebb módja a 16S riboszómális RNS alapú fajmeghatározás. Szintén egyre elterjedtebb módszer a teljes genomi szekvencia (WGS) meghatározás, de ez egyelőre nehezebb és sokkal drágább eljárás, ezért még kevésbé általános. Bár a 16S alapú fajmeghatározás sokkal pontosabb eredményt ad, mint a korábbi klasszikus mikrobiológiai módszerek, napjainkban az új fajok leírásánál már a teljes genom elemzése válik általános követelménnyé. Míg a teljes genom elemzésnél az elnevezésnek megfelelően a genom teljes terjedelmében meghatározzák a bázis sorrendet, addig a 16S eljárásnál csak ennek az adott riboszómális génszakasznak a bázis sorrendje kerül meghatározásra, melynek hossza nagyjából 1400-1550 bázispár (base pairs). A baktériumok genomja igen nagy mérettartományban változik, legjellemzőbb tízezres és a milliós nagyságrendek közötti bázis pár hosszúság. Ehhez képest a 16S 1550 bp hosszúsága rövidnek tűnhet, mégis alkalmas a fajszerinti azonosításra. Ennek egyik oka, hogy egy nagyon konzervatív génszakaszról van szó, ami azt jelenti, hogy taxonómiailag egymástól távol álló fajokban is közel azonos felépítést mutat, így általánosan alkalmazható. Másik oka pedig, hogy eltérések viszont nagyon specifikusak, ebből következően identifikációra alkalmasak. Az általánosan elfogadott közértelmezés szerint a 16S szekvencia esetében 95%-os egyezés esetén azonos nemzetségről beszélhetünk (Johnson 2019). Az új kutatási eredmények alapján a 16S rRNS szekvenciaelemzés alapján új faj jelöltről beszélhetünk 98,65%-os egyezés alatt (Kim et al., 2014)

3. Anyag és módszer

3.1. Lisztkukac tenyészet

Kísérleteimet saját nevelésű lisztkukacokon végeztem. A 0. generáció lisztkukacot 2021 márciusában vásároltam a Pet King Store Kft. (Budapest) üzletében. A teljes lisztkukac és lisztbogár állományt gabona alapú takarmányon tartottam. A takarmány térfogat szerinti összetétele: 70% búzakorpa, 15% kukoricadara, 15% zabpehely volt. Emellett a rovaroknak folyamatosan rendelkezésükre állt valamilyen lédús zöldség vagy gyümölcs, leginkább a vízpótlás céljából. Erre a célra almát, uborkát, illetve a nyári időszakban dinnyehéjat használtam. A lisztkukacok április második felében kezdtek el bebábozódni, ez első lisztbogarak már április végén kikeltek, de bogarak nagy többsége május elején-közepén kelt. A legelső nálam kelt lisztkukacokat május 11-én dokumentáltam. A lisztkukacok boncolása június 15. és augusztus 17. között történt.

3.2. Lisztkukac boncolás

Az első próba boncolást június 15-én végeztem a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében. A boncolás előtt a lisztkukacokat 10 percre -20 °C-ra fagyasztóba helyezve készítettem elő a boncolásra. A boncolást mikroszkóp alatt, óraüvegen, borotvapengével és boncoló csipesszel végeztem. A cél a lisztkukac tápcsatornájának kipreparálása volt. A tápcsatornát sikerült kipreparálni de közben a következő problémákkal szembesültem: a folyamat nagyon lassú a lisztkukac rögzítése nem volt megoldott és a testüregben található nagymennyiségű zsíros szövetet nehezen lehetett elválasztani a béltől. Továbbá a 10 percig tartó hűtés csak tetszhalott állapotot eredményezett, és az óraüvegen, lámpa alatt felmelegedve újra aktivizálódtak a lárvák.

A második boncolás június 30-án történt. Szakirodalmi kutatás során egy 1986-ból származó The Science Teacher című USA-béli lap Nadin Petersentől származó cikkében találtam hasznos információkat a boncolásához. Ezeket az információkat és a korábbi tapasztalatokat felhasználva, terveztem meg a második módszer lépéseit. A kukacokat boncolás előtt egy órával fagyasztóba raktam. A műanyag petricsészéket paraffinnal öntöttem ki és a parafinba a lisztkukacok méretének megfelelő, hosszúkás rovátkákat olvasztottam. Az elpusztult lisztkukacokat hasi oldalukkal lefelé a rovátkába helyezve, egy-egy bonctűvel fej és farok irányból rögzítettem a parafinon. Ezt követően a fej és a tor ízesülésénél egy bemetszést

ejtettem, majd drozálisan végig vágtam a kitin páncélt. Egy boncoló csipesz segítségével a kitinpáncélt kétfelé nyitva, további bonctűkkel rögzítettem, így jól hozzáférhetővé váltak a rovar belső szövetei. Két bonctűvel dolgozva a testőregben megkerestem a tápcsatornát majd először a garati részen elcsípve azt hátrafelé haladva elválasztottam a zsírszövetektől, majd a végbélnyílás belső oldalán is elcsípve a belet, kiemeltem az emésztőszervrendszert. Új, üres petricsészébe áthelyezve TWEEN 20 oldatban megtisztítottam a rajta maradt zsírszövet daraboktól. Amikor a csipesszel eltávolítható részeket sikerült megtisztítani, egyik végénél felemelve a fonál szerű szervet, pipettából rácsepegtetett TWEEN 20 oldattal tisztítottam meg az utolsó zsírszennyeződésektől. Majd ismét új petricsészére helyeztem a fotózásra szánt preparátumot (6.kép). A boncolást ezúttal is mikroszkóp alatt, illetve szabad szemmel végeztem. Ez az eljárás jól működött így gyakorlás céljából többször megismételtem az elejétől a végéig.

6.kép Az általam kipreparált és megtisztított lisztukac tápcsatorna (Saját készítésű kép)



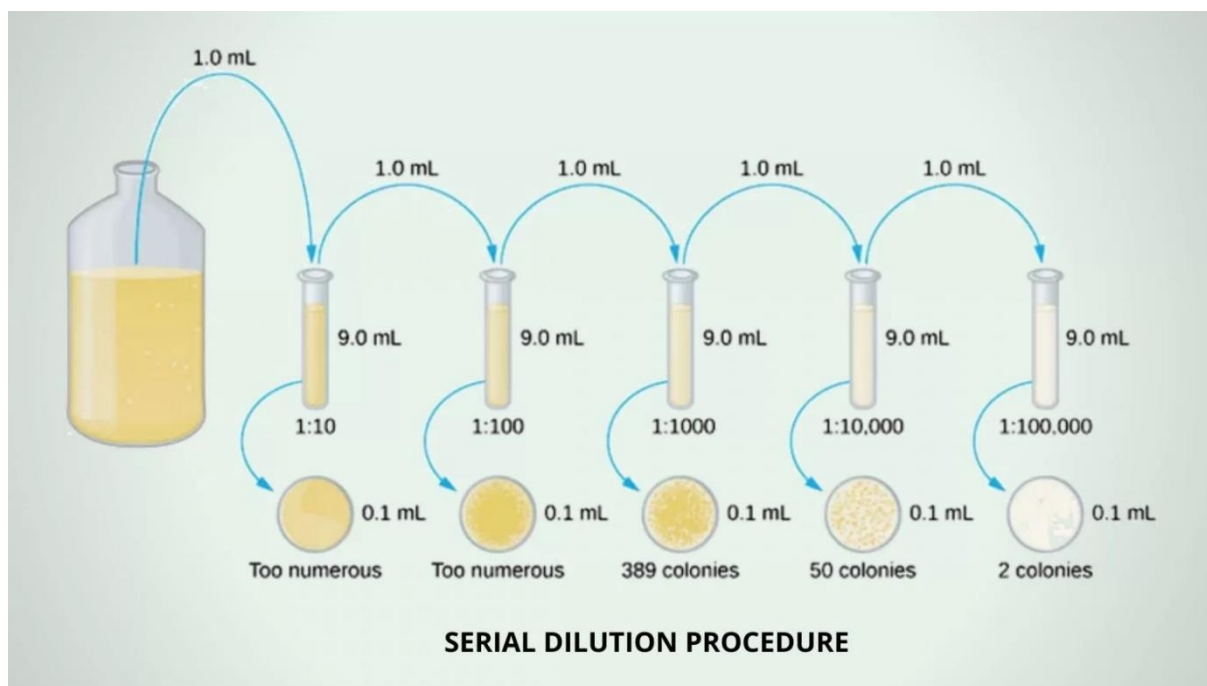
A harmadik boncolásra augusztus 17-én került sor. Ekkor a cél már az emésztőrendszerből történő mintavétel volt. A lisztukacokat és a parafinos petricsészéket az előzőekben bevált eljárás szerint készítettem elő a boncoláshoz. A boncolás menete is nagyrészt az előbb leírtak szerint történt a következő néhány kiegészítéssel. A boncoláshoz ezúttal nem használtam mikroszkópot, mert a boncolást laminárisboks alatt, steril légáramban végeztem el. A

boncoláshoz használt eszközöket 70% etanollal áttörölve és lelángolva sterilizáltam a boksban. Az elpusztult lisztkezacot először 70% etanol oldatba merítettem, majd onnan kiemelve, megvártam amíg elpárolog a felületéről az alkohol és ez után helyeztem a rovátkába. A lisztkezac felnyitása és nyitott állapotban történő rögzítése után új, steril csipesszel folytattam a munkát. Az emésztőrendszert a kipreparálás, a tisztítása és steril TWEEN 20-val történő zsírtalanítása után 6ml-es kémcsőbe, 1ml steril fiziológiás sóoldatba helyeztem.

3.3. A lisztkezac bélbaktériumok kitenyésztésének folyamata

Az oldatba helyezett preparátumot steril üvegbottal szét dörzsölve, majd pedig 5 percig vortexelve homogenizáltam. Az így kapott szuszpenzióból 10-es alapú hígítási sort csináltam: sterilizett 9 ml fizsó oldathoz 1 ml-t mértem az előző hígítási fok szuszpenziójából (7.kép). A hígítási sort 10^8 hígítási fokig készítettem el.

7.kép A hígítási sor elkészítésének menete



forrás: microbiologynote.com

A hígítási sorból lemezt öntöttem LB (Luria-Bertani) táptalaj felhasználásával. (LB táptalaj: 10g tripton, 5g élesztő kivonat, 9g NaCl, 18g agar, 1000ml H₂O). A minták a MWGA (Meal Worm Gut A), plusz hígítási fok, mintajelet kapták. Feliratozás után a mintákat 28°C-ra inkubátorba tettem. A mintákat nagyjából 12 óránként vizsgálva, végül 48 óra elteltével vettem ki azokat az inkubátorból. A táptalajon kinőtt baktérium telepek sűrűsége alapján további munkára a 10^3 és a 10^4 hígításból készült tenyészeteket választottam ki. A nyolc jól

elkülöníthető, jellemző kinézetű baktériumtelepet, a petricsészén bekarikázva jelöltem és MWGA 1-8 nevekkal láttam el. Az egyes kiválasztott, névvel ellátott telepekről elkészítettük az elsődleges morfológiai leírásokat. Ezt követően a kiválasztott telepekből tisztító szélesztéssel tiszta törzstenyészeteket hoztam létre. Ehhez újra sterilen LB táptalajt öntöttem 8 darab petricsészébe, majd pedig a már megszilárdult agarra lánggal sterilizett oltókaccsal külön-külön petricsészébe kiszélesztettem az egyes (bekarikázott) baktérium telepeket. Az MWGA 1-8 mintajelekkel feliratoztam a tenyészeteket és ismét 48 órára 28 °C-ra inkubátorba tettem őket.

3.4. A baktériumtörzsek hosszútávú tárolása -80 Celsius fokon

Mivel a baktériumtörzsek növekedése 48 óra elteltével is közel azonos ütemben folytatódik tovább, pár nap alatt a képesek beborítani a táptalaj teljes felületét, miközben az idő előrehaladtával egyre nő a befertőződés és kiszáradás kockázata. Ezért, ha rövidtávon még használni szeretnénk az adott tenyészetet, akkor a baktériumok tovább oltása, újbóli steril táptalajra történő kiszélesztése szükséges, vagy valamilyen hosszabb távú tárolás. A baktériumok hosszútávú eltárolása én a glicerol oldatban -80 °C hőmérsékleten történő krio-fagyasztást választottam. A minták fagyasztásának előkészítéséhez először a szilárd táptalajon kitenyésztett baktériumokból folyékony tenyészeteket készítettem. Ehhez folyékony, agar nélküli LB táptalajt használtam. 15 ml-es, csavaros tetejű, Falcon csövekbe 5 ml táptalajt mértem, majd minden tenyészetből egy-egy telepet, lelángolt, steril oltókaccsal felszedve, belemostam az adott csőben lévő folyadékba. A csöveget lezártam, állványba helyzettem, és rögzítettem, majd a mintákat vízszintesen eldöntve 48 órára, 28 °C-ra rázógépre tettem. Két nap elteltével a mintákat kivettem a gépből és előkészítettem a fagyasztva tároláshoz használt cryo csöveket. A csövekbe először 700 µl 30% glicerol oldatot mértem, aztán hozzámértem szintén 700 µl-t a friss folyékony tenyészetből. A csöveget lezártam és a folyadékokat finoman összeráztam, majd pedig egy óráig szobahőmérsékleten inkubáltam. Egy óra elteltével a feliratozott cryo csövek, feliratozott tároló dobozban, a -80 °C-os fagyasztóba kerültek.

3.5. A DNS izolálás módszerleírása

Az MWGA 1-8 névvel ellátott baktériumok nemzetség, illetve fajszerinti meghatározásához elsőként DNS-t kellett izolálnom az egyes baktériumtörzsekből. A DNS izolálás a 48 órás tisztatenyészetekből történt a Zymo Research cég Quick DNA Miniprep Plus Kit DNS izoláló kitjének felhasználásával. Első lépésként 1,5 ml méretű eppendorf csöveket feliratoztam a

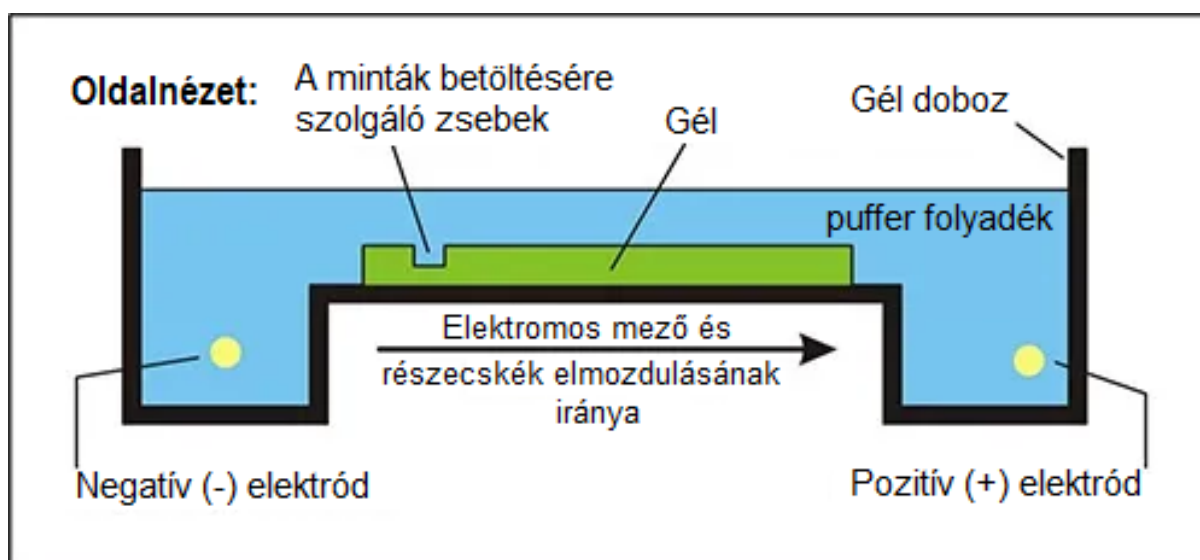
mintajeleknek megfelelően, majd ezekbe egyenként 200 µl, DNA Elution Buffer, puffer folyadékot mértem. Ezt követően a laminárisboksban a tiszta tenyészetek mindegyikéből egy-egy jól elkülönülő telepet kiválasztva, azokat lelángolt oltókaccsal lekaparva, külön a megjelölt eppendorf csövekbe pufferfolyadékba helyeztem sterilen. A következő lépésben a minden tételhez 200 µl, Biofluid and Cell Buffer, pufferfolyadékot és 20 µl, Proteinase K enzimet adtam. 10-15 másodperc vortexelés után a szuszpenziót 55°C-on, 10 percig inkubáltam. Ez idő alatt az enzim lebontja a bakteriális sejtfalat és hozzáférhetővé válnak a további sejtalkotók, pl. a örökítőanyag. A harmadik lépésben 420 µl, Genomic Binding Buffer, pufferfolyadékot adtam a mintákhoz, majd ismét 10-15 másodperc vortexelés következett. Ezt követően 8 darab gyűjtőcsőbe megszámozott Zymo-Spin column membrános szűrőcsöveket helyeztem és ezekbe átpipettáztam az eppendorf csövek tartalmát, majd 12.000-es fordulatszámon 1 perces centrifugálás után eldobtam a gyűjtőcsöveket a benne lévő folyadékkal és a membrános szűrőket, amelyek szűrőmátrixában megtapadt a DNS, új gyűjtőcsőbe helyeztem. Következő lépésként 400 µl DNA Pre-Wash Buffer folyadékot mértem a mintákra, majd ismét 1 perc centrifugálás következett 12.000-es fordulatszámon, végül pedig kiöntöttem a gyűjtőcső tartalmát. A következő lépésben 700 µl DNA Wash Buffer folyadék újabb centrifugálás és ürítés következett. A hatodik lépésben már csak 200 µl az előző DNA Wash Buffer folyadékot mértem a mintákra, amit ismét centrifugálás, majd a gyűjtőcső eldobása követett. Ekkora szűrő mátrixban már tényleg csak a DNS maradt a felülethez kötődve, az egyéb szennyezők kimosásra kerültek a különböző puffer folyadékokkal. Befejező lépésként a membrános szűrőcsöveket új, steril, a megfelelő mintanévvel feliratozott, eppendorf csövekbe helyeztem és 50 µl DNA Elution Buffer, pufferfolyadékot mértem a mintákhoz, pontosan a szűrőmátrixra csepegtetve. 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után a mintákat 1 percig maximum fordulatszámon (13.500 rpm) centrifugáltam. Ebben az utolsó lépésben a mátrixhoz kötött DNS kioldódott a pufferfolyadékba és a centrifugálás hatására a folyadék az új eppendorf csövekben gyűlt össze, a szűrőcső pedig eldobásra került. Az így kapott tisztított DNS azonnal felhasználható molekuláris biológiai eljárásokhoz, vagy -20 Celsius fokon eltárolható későbbi felhasználás céljából. A DNS izolálási folyamat során VWR MicroStar12 centrifugát, VELP Scientifica kémcsőrázót (vortex) és Eppendorf automata pipettákat használtam.

3.6. Önellenőrzés agaróz gél elektroforézissel

A DNS tisztítás eredményességét ellenőrizendő, a minták tisztított DNS tartalmát gél elektroforézissel vizsgáltam. A folyamat során használt puffer folyadék, valamint gél folyadék

komponense a következőkből állt: 0,4g NaOH; 3,044g H₃BO₄; 1000 cm³ H₂O. A gél készítése során 70 ml-t használtam ebből a pufferfolyadékból, agarózból 0,7 grammot, Eco Safe nukleinsav festő oldatból pedig 3,5 µl került a gélbe. Először Erlenmeyer lombikba öntöttem az adott mennyiségű pufferfolyadékot és belemértem az agart, elkevertem, majd pedig teljes oldódásig, forrás kezdetéig melegítettem, miközben többször megkevertem a folyadékot. Miután az agar maradéktalanul feloldódott, a folyadékot folyamatosan kevergetve, folyóvíz alatt, kézmeleg hőmérsékletig visszahűtöttem, ezt követően adtam hozzá a 3,5 µl Eco Safe oldatot, amit szintén elkevertem. Végül a még kézmeleg folyékony gél a megfelelő mintába öntöttem és elhelyeztem benne a zsebek kialakítására használatos „fésűket”. A gél kihülése és teljes megszilárdulása nagyjából 1 órát vett igénybe. Először a fésűket távolítottam el, majd óvatosan kiemelttem a gél a mintából és gépbe helyeztem. A gél körüli térrészt a gép oldalán jelölt szintig pufferfolyadékkal töltöttem fel (8.kép).

8.kép A gélelektroforézist bemutató oldalnézeti ábra

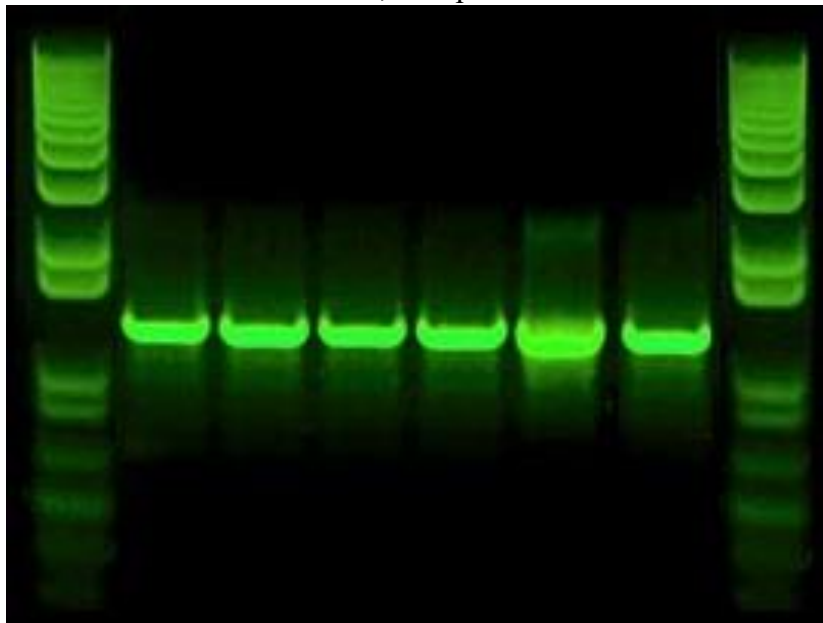


(forrás:OrbitBiotech.com, saját fordítás)

Parafilm fóliára automata pipettával 1 µl-es cseppeket mértem a ThermoFisher Scientific cég DNA loading dye oldatából. Az előzőekben elkészült tisztított DNS mintákból 4 µl mennyiséget pipettahegyben összekevertem a kimért loading dye oldattal, majd ezt követően a mintákat a gélben található zsebekbe töltöttem. A legelső zsebbe, az előbb említett cég GeneRuler DNA Ladder Mix névre hallgató molekulamarkert töltöttem. Ezt követően a gépet 100 Volt egyenáramú feszültségen 40 percig üzemeltettem, amely idő alatt, a nukleinsavak és molekulamarkerben található ismert hosszúságú részecskék a pozitív elektród felé mozdultak el a gélben. A „megfuttatott” mintát ultraibolya fénybe helyezve a DNS és a marker különböző bázispár hosszúságot jelölő részecskéi jól látható, határozott vonalat és kissé elmosódott csóvát

mutattak (9.kép). A gélelektroforézis eredménye alapján sikeres volt a DNS kivonási folyamat, hiszen mind a 8 minta esetében világító vonal jelezte a gélben a DNS jelenlétét. A identifikáció során minden készültségi fokon a futtattam gélét önellenőrzés céljából, minden alkalommal ugyanezen eljárás szerint, így ezt a folyamat a későbbiekben nem részletezem.

9.kép A gél elektroforézis eredményének UV fény alatti értékelését illusztráló kép
Kétoldalt a DNS létra látható, középen a zsebekbe töltött minták elmozdulása



forrás: vilber.com

3.7. 16S rDNS PCR

Mivel az identifikáció a 16S riboszómális RNS-t kódoló gén szakasz alapján történik, ezért a következő lépésben ennek a kiválasztott génszakasznak a felszorzosítása (amplifikáció) történt polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR) segítségével. A génszakasz sokszorozásához a tisztított és ellenőrzött DNS-ből mintánként 1 µl mennyiségre, mint templátra volt szükségem. Először összeállítottam a „Mastermixet”, azt a keveréket, ami a templáton kívül mindent szükséges összetevőt tartalmaz a PCR reakció lefutásához. Ezt követően a Mastermixből a szükséges mennyiséget steril, feliratozott 0,5 ml-es eppendorf csövekbe pipettáztam, majd pedig hozzá mértem a templátot. A Mastermix összetétele mintánként 50 µl végtérfogatra számolva a következőképpen alakult: 32,75 µl MQ water (különlegesen nagy tisztaságú ioncserélt víz), 10 µl dNTP (szabad beépíthető nukleinsav bázisok), 0,25 µl Taq polimeráz (a komplementer szálak átírását, a bázisok beépítését végző enzim), 5 µl Taq puffer (az enzim működését biztosító pufferfolyadék), 0,5 µl 8f forward primer (a 16S szekvencia elejét kijelölő primer, ahonnan a

DNS szálon előrefelé haladva az enzim beépíti a bázisokat), 0,5 µl 1492r reverse primer (a 16S szekvencia végét jelölő primer, az enzim innen DNS szálon visszafelé haladva építi be a bázisokat. Ezen összetevők összterfoglata 49 µl, ezt a mennyiséget mértem ki mind a 8 darab kis eppendorf csőbe, végül pedig minden csőbe belemértem 1 µl templátot, vagyis az egyes baktériumoktól származó, tisztított DNS-t. Az eppendorf csöveket lezártam és elhelyeztem a PCR készülék (Eppendorf Mastercycler epgradient PCR) erre kialakított hűtő-fűtő foglalatjába. A készüléken beállítottam a kívánt láncreakció lefolyásához szükséges hőprofil, vagyis az egyes szakaszok hőmérsékletét és azok idejét, valamint a ciklus ismétlődésének számát.

A hőprofil:

1. szakasz	95 °C	-	3 perc
2. szakasz	94 °C	-	30 másodperc
3. szakasz	52 °C	-	30 másodperc
4. szakasz	72 °C	-	1 perc
5. szakasz	72 °C	-	10 perc
6. szakasz	4 °C	-	∞

A 2-4 szakaszokból álló ciklusra 32x ismétlődés számot állítottam be. A folyamat lefutása után a gép a mintákat 4°C-ra hűti és ezen a hőmérsékleten korlátozatlan ideig tárolja. A PCR folyamat után a minták újabb, gélelektroforézissel történő, vizsgálata következett, amiből az derült ki, hogy 2 darab minta esetében a sikertelen volt az eljárás. Így az MWGA-1, valamint az MWGA-7 jelű minták kiestek a további vizsgálati folyamatokból.

3.8. A PCR termék tisztítása

A PCR folyamat eredményeként keletkező terméket, bár DNS eredetű, már nem nevezzük DNS-nek, mivel csak egy arról átíródott szakaszt, a 16S szekvenciát tartalmazza nagy kópiaszámban. Innentől kezdve a PCR termék megnevezés használatos.

A folyamat során a mastermixnek nem minden összetevője épül be maradéktalanul a kópiákba, így a folyadékban innentől kezdve, számunkra zavaró szennyező anyagokként jelennek meg, amik akadályozzák a további munkát. Ezért tehát a PCR termék tisztítása szükséges, amihez ismét egy kittet, a Macherey-Nagel cég NucleoSpin Extract II DNA Clean-up kittjét használtam. A kitt az előzőhöz hasonló elven működik, egy membránszűrős csőből és hozzátartozó gyűjtőcsőből, valamint különféle tisztító oldatokból, pufferfolyadékból áll. Mivel a gélfuttatás eredményeként két minta kiesett, így ezt a folyamatot, már csak 6 darab mintán végeztem el. Elsőként feliratoztam a membránszűrős csöveket és egy-egy gyűjtőcsőbe

helyeztem őket. Ezt követően a 45 µl PCR terméket és 90 µl NT(I) pufferfolyadékot mértem a szűrőcsövekbe. A mintákat 1 percig 11.000 rpm fordulatszámon centrifugáltam, majd kiürítettem a gyűjtőcsöveket. Következőnek 650 µl NT3 pufferfolyadékot mértem a csövekbe, amit ismét 1 perc centrifugálás és a gyűjtőcsövek ürítése követett. Ezután még egy centrifugálás 2 perc hosszan, hogy az utolsó csepp pufferfolyadék is eltávozzon a membránszűrőből. Új, steril 1,5 ml-es eppendorf csöveket készítettem elő, feliratoztam őket, majd áthelyeztem beléjük a membránszűrős csöveket. Végül 30 µl NE puffer folyadékot csepegtettem közvetlenül a membránszűrőre és szobahőmérsékleten 1 percig állni hagytam a mintákat, majd ismét 2 percig 11000 rpm fordulatszámon centrifugáltam őket. Ebben az utolsó lépésben, a szűrőmátrix felületén megkötődött, tisztított PCR termék leoldása történt, valamint terméket tartalmazó oldat összegyűjtése az új eppendorf csövekben.

A tisztítási folyamat után újabb önvizsgálatot tartottam, ami visszaigazolta, hogy mind a 6 tisztított minta tartalmazza a kívánt PCR terméket, így azokon végrehajtható a következő, szekvenáló PCR folyamat.

3.9. Szekvenáló PCR

A szekvenáló PCR-hez ugyanazt a PCR gépet használtam (Eppendorf Mastercycler epgradient PCR), de más hőprofil és ciklus szám beállítása mellett. A PCR-re szánt mixet ugyanúgy steril, feliratozott, 0,5 ml-es eppendorf csövekbe készítettem elő és szintén egy Mastermixet állítottam össze, csak más elemekből és kisebb végtérfogatra, mint az előzőekben.

A Mastermix összetevői a következők voltak: 3 µl MQ water, 1 µl Big Dye (fluoreszcens terminális nukleotidok, a 4 féle nukleotid eltérő színnel világít), 1,5 µl Big Dye puffer, 0,5 µl 8f forward primer. Ezek össztérfogata 6 µl volt, ehhez jött hozzá mintánként 4 µl templát a tisztított PCR termékből, ami így összesen 10 µl végtérfogatot eredményezett a szekvenáló PCR eljáráshoz.

A szekvenáló PCR során használt hőprofil következő volt:

1.szakasz	96 °C	-	1 perc
2. szakasz	96 °C	-	10 másodperc
3. szakasz	51 °C	-	5 másodperc
4. szakasz	60 °C	-	4 perc
5. szakasz	4 °C	-	∞

A 2-4. szakaszokból álló ciklus 28x ismétlődött, így a teljes program lefutása nagyjából 2 órát vett igénybe. A szekvenáló PCR folyamat eredményként a 16S szekvencia különböző hosszúságú fragmentjei jöttek létre, melyek mindegyikét egy specifikusan (nukleotidnak megfelelően) és fluoreszcensen jelölt terminális nukleotid zárja le.

3.10. Kicsapatás

A szekvenáló PCR után a szintén nemkívánatos alkotók is visszamaradnak a folyadékban, mint például a puffer folyadék, a fel nem használt primerek és nukleotidok. A fluoreszcensen jelölt szekvencia szakaszok elválasztására acetát mix-el történő kicsapatást alkalmaztam. Ehhez először is elkészítettem az acetát mixet, ami mintánként 3 µl Nátrium-acetátot, 62,5 µl 95%-os etanolt és 14,5 µl MQ water-t tartalmazott. A mintákat a PCR folyamat során használt 0,5 ml-es eppendorf csövekben hagytam. A 10 µl szekvenáló PCR termékhez hozzáadtam az összesen 80 µl térfogatnyi acetát mixet, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam a mintákat. Ez idő alatt kell megtörténnie a szekvencia fragmentumok kicsapásának. Mindeközben a temperált centrifugát 4 Celsius fokra előhűtöttem. Az inkubáció utána a mintákat 4 fokon, 30 percig, 3220 g fordulaton centrifugáltam. Ekkor kell megtörténnie a fragmentumok leülepedésének és a cső belső falára történő kitapadásának, ám ez szabad szemmel nem látható. Centrifugálás után a folyadék fázist egy határozott mozdulattal kiöntöttem, és a csövecskékbe 180 µl 70-os etanolt mértem. Ezt újabb centrifugálás követte 20 perc időtartammal, majd ismét kiöntöttem a folyadékfázist. Egy perc nedvszívópapírra helyezett, fordított helyzetű, tető nélküli, centrifugálással eltávolítottam a legapróbb cseppeket is a csövecskéből. Végül 20 µl Hi-Di formamide (Highly Deionized formamide, a minták szekvenálás előtti reszuszpenzálására használt oldat) oldatot mértem minden egyes mintára, majd a csövecskéket újra lezártam 4 Celsius fokos inkubációra hűtőszekrénybe tettem. Az inkubációt alatt a specifikus terminális nukleotidokkal lezárt 16S fragmenteknek a csövecske faláról leoldódnak és a folyadékban lebegve alkalmassá válnak a szekvenálásra.

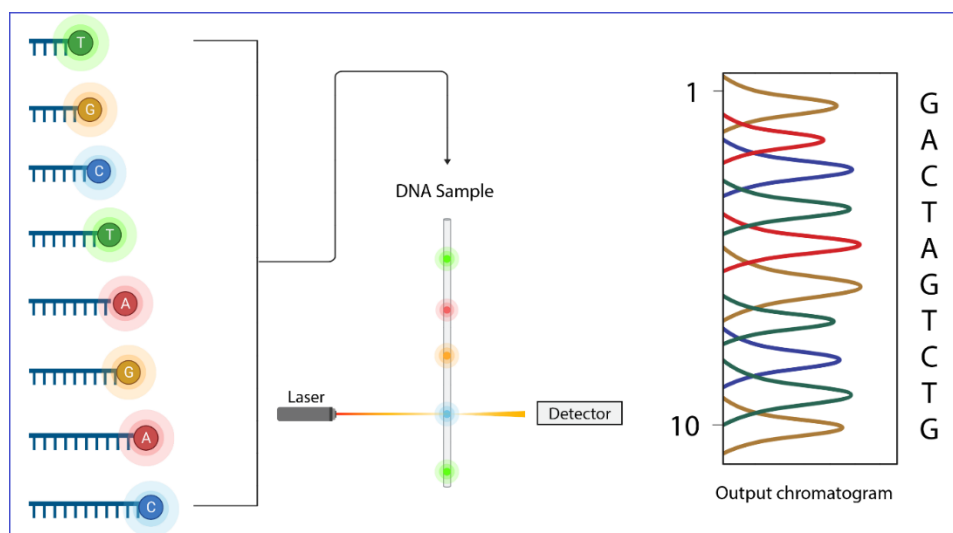
3.11. Szekvenálás

A szekvenáló PCR-t követő kicsapatással az általam végzett laboratóriumi eljárások sora véget ért. A szekvenáló PCR során kapott és kicsapatott mintákat egy külsős céghez a gödöllői Biomi Kft.-hez vittük el szekvenálásra. 6 darab mintát adtunk le szekvenálásra. Ezek a következők voltak:

MWGA-2; MWGA-3, MWGA-4; MWGA-5; MWGA-6; MWGA-8

A Sanger féle szekvenálás során a mintában található szekvencia darabok, méretüktől függően eltérő sebességgel haladnak keresztül egy kapilláris gélben. A gél egy adott pontján egy lézer gerjeszti a fluoreszcens nukleotidokat. A típusok alapján specifikus, különböző színekkel világító nukleotidok egy érzékelő panel előtt haladnak el, amely a színeket dekódolva rögzíti a nukleotidok sorrendjét. Az ebből kapott adat, az azonos helyen kezdődő, viszont különböző hosszúságoknál megszakadó, szekvencia szakaszok végén található terminális bázisok minőségét (adenin, citozin, guanin, timin) és sorrendjét mutatja meg. Az így összeálló bázis sorrend pedig a vizsgált baktériumok örökítőanyagának 16S szekvenciája, vagyis annak egy darabja (10.kép).

10.kép A szekvenálás folyamatát bemutató ábra



forrás: AAT Bioquest

Az ábra bal oldalán láthatóak az azonos primerrel (a mi esetünkben 27f) kezdődő, de különböző hosszúságú fragmentek, amelyeket egy-egy specifikus, fluoreszcens, termináns nukleotid zár le. Középen látszik, ahogyan az egy-egy nukleotiddal egyre hosszabb fragmentek a kapilláris gélben egymást követve haladnak el a gerjesztő fényforrás és az érzékelő panel előtt. A az egyre hosszabb fragmentek végén felvillanó fluoreszcens nukleotid színe az adott bázis minőségét (adenin, citozin, guanin, timin) kódolja. Így ezeket sorba rendezve megkapjuk az adott szekvencia bázis sorrendjét (ábra jobb széle).

4. Eredmények

4.1. A kiválasztott baktérium telepek morfológiai leírása

Az alábbiakban a 10^3 és 10^4 hígításifokból készült 28 fokon 48 óráig inkubált tenyészetekből, tisztításra kiválasztott telepek elsődleges morfológiai leírása következik.

10^3 hígítási fokról:

MWGA-1: áttetsző, kerek, fényfelé fordítva enyhén barnás(-kékes) színű, ép szélű, 3mm átmérőjű telep.

MWGA-2: sárgás fehér színű, matt, sugaras, hullámos szélű, 2mm átmérőjű telep

MWGA-3: áttetsző, fényfelé fordítva barnás színű, halvány, kerek, ép szélű, 2mm átmérőjű telep.

MWGA-4: áttetsző, zöldes sárga, fényfelé fordítva üveges, barnás sárga színű, ép szélű 3mm átmérőjű telep.

MWGA-5: piszkos fehér színű, matt, nem átlátszó, csúcsos, szeldelt szélű 2mm átmérőjű telep.

10^4 hígítási fokról:

MWGA-6: zavaros fehér, fényfelé fordítva barnás-rezes színű, fényes felszínű, ép szélű 4mm átmérőjű telep.

MWGA-7: áttetsző, fehér színű, sugaras, hullámos szélű, 2mm átmérőjű telep.

MWGA-8: piszkos fehér színű, matt, virágszirom szerű, sugaras, hullámos szélű, 2mm átmérőjű telep.

4.2. A szekvenálási eredmények előkészítése

A 27f primerrel végzett szekvenálás eredményként a hat minta nagyjából 600 bázispárig futott el. A szekvenciákat megvizsgálva és szerkesztve, szubjektív, de konzervatív módon eltávolítottuk a szekvenciák elején és végén található zavaró, fals részeket. A visszamaradt használható 16S szekvenciák kis szórással, de eltérő hosszúságúak voltak. Az identifikációra használható minőségű szakaszok hosszát, kezdetét és végét, valamint a teljes (1400-1550 bázispár) hosszúságú 16S-hez viszonyított lefedettséget az 1.táblázat tartalmazza.

1.táblázat A használható minőségű szekvenciák méretét adatait megjelenítő táblázat

Mintajel	Szekvencia kezdete	Szekvencia vége	Szekvencia hossza	Lefedettség
MWGA-2	70 bp	689 bp	620 bp	42,30%
MWGA-3	55 bp	685 bp	631 bp	43,10%
MWGA-4	52 bp	638 bp	587 bp	40,10%
MWGA-5	55 bp	702 bp	648 bp	44,20%
MWGA-6	52 bp	638 bp	587 bp	40,10%
MWGA-8	46 bp	688 bp	643 bp	43,90%

4.3. Az eredmények értékelése

Következő lépésként a kész szekvenciákat összevetettük az EZBioCloud online adatbázis szekvenciáival. A 6 darab vizsgált mintából 2-2-2 ugyanazzal az adatbázisban lévő szekvenciával mutatott egyezést, vagyis az eredmények alapján, a véletlenszerűen izolált törzsekkel 3 baktériumfajt sikerült azonosítani (2. táblázat).

2.táblázat A EZBioCloud adatbázis alapján, a 6db mintához tartozó legközelebbi rokon törzsek

Minta neve	Legközelebbi rokon baktériumfaj/törzs	Hasonlóság (%)	Lefedettség (%)
MWGA-2	CP028271_s	99,56	46,7
MWGA-3	<i>Intestinirhabdus alba</i>	99,51	43,1
MWGA-4	<i>Pseudocitrobacter vendiensis</i>	99,15	40,1
MWGA-5	CP028271_s	99,54	44,2
MWGA-6	<i>Pseudocitrobacter vendiensis</i>	99,15	40,1
MWGA-8	<i>Intestinirhabdus alba</i>	100	43,9

Az MWGA-4 és MWGA-6 minták a *Pseudocitrobacter vendiensis* fajjal mutattak nagy arányú, mindkét esetben 99,15%-os, hasonlóságot. A jelentős szekvenciaazonosság alapján nagy a valószínűsége annak, hogy a két törzs valóban ehhez a fajhoz tartozik.

Az MWGA-8 szekvenciája 100%-os egyezést mutatott az *Intestinirhabdus alba* fajjal. Vagyis a 8-as számú mintánk esetében biztosnak mondható, hogy az *Intestinirhabdus alba* fajt sikerült izolálnunk. Az MWGA-3 jelű minta ugyan ezzel a fajjal mutatta a legnagyobb mértékű egyezőséget az adatbázisban, ám ezzel a fajjal mindössze 96,51%-os egyezőséget mutatott. A legközelebbi rokon faj egyértelmű tisztázásához a teljes 16S rRNS szekvenciára lenne szükség.

Az adatbázissal történő összevetés során tehát a fenti négy mintánál a szekvenciák már leírt, ismert fajokkal mutatták a legnagyobb mértékű egyezőséget. Azonban kettő minta, az MWGA-2 és az MWGA-5, esetében az adatok egy korábban feltöltött, de nem identifikált szekvenciával mutattak nagymértékű, 99,5%-os, egyezést. Ez tehát egy még nem leírt fajhoz tartozik. A szóban forgó minta egy koreai kutató csoporttól származik, akik CP028271 néven töltötték fel a szekvenciát és azt a *Mixta intestinalis* baktériumfajjal azonosították. Ám a mi mintánk ez utóbbi a fajjal csak 96,76%-os egyezőséget mutat (3.táblázat), ami fajszerinti azonosítás esetén meglehetősen alacsony értéknek számít, vagyis fennáll a valószínűsége, hogy egy még le nem írt fajjal, vagyis új faj jelölten van dolgunk.

3.táblázat Az MWGA-5 (és MWGA-2) jelű mintá(k)hoz hasonló szekvenciájú baktérium típusú törzsek, köztük a *Mixta intestinalis* való szekvencia egyezőségét bemutató táblázat

Hasonló törzsek neve	Hasonló törzsek mintajele	Hasonló törzsek kódja	Hasonlóság(%)	Különbözőségi arány	Lefedettség(%)
CP028271_s	SRCM103226	CP028271	99,54	3/648	100,00
Mixta tenebrionis	BIT-26(T)	MK722097	97,22	18/648	96,40
Mixta intestinalis	29Y89B(T)	KP326384	96,76	21/648	100,00
Pluralibacter gergoviae	JCM 1234(T)	AB004748	96,75	21/647	99,00
Superficieibacter electus	BP-1(T)	PQGD01000069	96,45	23/648	100,00
Citrobacter farmeri	CDC 2991-81(T)	AF025371	96,44	23/646	100,00
Trabulsiella odontotermitis	Eant 3-9(T)	DQ453129	96,37	23/633	95,30
Citrobacter amalonaticus	CECT 863(T)	FR870441	96,14	25/648	100,00
Erwinia pyrifoliae	DSM 12163(T)	FN392235	96,14	25/647	100,00
Mixta theicola	QC88-366(T)	AB907776	96,14	25/647	100,00

Fontos megemlíteni, hogy a koreai kutatócsapat a 2017-ben töltötte fel a CP028271-et és a leírásban megadták, hogy a baktériumot hozzájuk hasonlóan lisztkekacából izolálták.

Mivel az MWGA-5 (és MWGA-2) minta, 44,2% lefedettség mellett egy feltehetően le nem írt faj korábban izolált törzsével mutatott legközelebbi rokonságot, ezért további vizsgálat elvégzését tartottam szükségesnek. A korábban már említett Biomi Kft. elkészítette a két minta teljes 16S szekvenciájának elemzését. A szekvenálás eredményeként egyrészt az is bebizonyosodott, hogy a két minta azonos baktériumfaj, így a továbbiakban egyként kezelve őket MWGA-5-ként hivatkozok rájuk. Másrészt a rendelkezésre álló teljes 16S rRNS szekvencia összevetése az online adatbázissal megbízhatóbb információval szolgált, mint a részleges, ~700 bp hosszúságú, szekvencia vizsgálata. Az MWGA-5 minta teljes 16S szekvenciája, 93,4% lefedettség mellett, valamivel nagyobb egyezőséget mutatott legközelebbi rokon törzsekkel, mint amit a korábbi részleges szekvencia vizsgálatkor tapasztaltam. A koreai kutatók által feltöltött CP028271 jelű törzs szekvenciájával mutatott egyezés 99,71%-ra, a *Mixta tenebrionis* 98,25%-ra, a *Mixta intestinalis* 97,15%-ra emelkedett. Ezen eredmények alapján már kijelenthető, hogy az MWGA-5 jelű törzshöz legközelebb álló, leírt

rokon faj a *Mixta tenebrionis* és nem pedig a *Mixta intestinalis*.

2014-ben publikáltak egy cikket, ami a DNS-DNS hibridizációs tesztek teljes 16S szekvencia általi helyettesíthetőségét vizsgálta, azzal a céllal, hogy felgyorsítható legyen az új fajok felismerésének folyamata. A szerzők szerint a teljes 16S rRNS szekvenciák 98,65% feletti egyezősége esetén állítható két baktériumtörzsről, hogy egy fajba tartoznak (Kim 2014). Ezek alapján megállapítható, hogy az MWGA-5 jelű baktériumtörzs nagy valószínűséggel egy új, még le nem írt baktériumfajhoz tartozik. Ez valószínűleg ugyanaz a faj, amelyet korábban a koreai kutatók is izoláltak.

4.4. Az MWGA-5 törzs teljes 16S rRNS szekvenciája

Az MWGA-5 törzs teljes 16S rRNS szekvenciáját a MEGA5 program segítségével illesztettük össze. Az 1369 bázisból álló szekvencia:

```
AGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGC
CCGATGGAGGGGGATAACCACTGGAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCTTC
GGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGA
TTAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG
TATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGATGAG
CCTTAATACGGTTCGTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC
CCGGGAACTGCATCCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAAT
TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAACGGTGGCGAAGG
CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTGACTTGGAGGCTGTGAG
CTTGACTCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGA
AGACTGCAGAGATGCGGTTGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTGATGGCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGA
TAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGG
```

GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAA
GCGGACCTCACAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGT
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGG
TAGCTTAAC

4.5. Az identifikáció során előkerült fajok leírása

Az MWGA-4 és MWGA-6 mintáink a legnagyobb egyezőséget (99,15%) a *Pseudocitrobacter vendiensis* fajjal mutatták, de nagymértékű egyezőséget (98,98%) mutattak a *Pseudocitrobacter faecalis* fajjal is. A *Pseudocitrobacter vendiensis*-t 2019-ben írták le (Kampfer P. 2019), ezzel a 2014-ben leírt nemzetség legfrissebb, harmadik tagja. A *Pseudocitrobacter* baktériumok Gram-negatív, fermentáló baktériumok, amelyek néhány morfológiai tulajdonságukban és biokémiai jellemzőikben különböznek egymástól. A nemzetség minden tagját humán egészségügyi esetek kezelése során izolálták. A *Pseudocitrobacter vendiensis* egy dán páciens, feltehetően nő, perinális kenetéből származik. A mintát 12 óráig LB táptalajon, majd 5%-os ló vér agaron tenyésztették. Az primér identifikáció során nem sikerült sem a faj, sem a nemzetség szintű beazonosítás. Így tovább vizsgálták a CPO20170097 jelű minta 16S rRNS génjét és az adatbázissal összevetve azt találták, hogy *P. faecalis* és *P. anthropi* fajokkal mutatja legnagyobb mértékű (99,2%) egyezőséget. A fillogenetikai vizsgálatok bebizonyították, hogy a *Pseudocitrobacter* genus-ba tartozó, azon belül azonban még le nem írt, új fajról van szó, amely a *Pseudocitrobacter vendiensis* sp. nov. nevet kapta. A *Pseudocitrobacter faecalis* 2014-ben került leírásra új fajként, de a hozzá tartozó sejtvonalak izolálása még 2010-ben történt Pakisztánban, kórházban kezelt páciensek székletmintájából. A mintavétel eredetileg karbapenemáz aktivitás vizsgálatának céljával történt. A három sejtvonal mindegyike jól tenyésztethető az általánosan használt agarokon. A morfológiai vizsgálatok alapján először *Citrobacter*-ként azonosították őket, de részletesebb vizsgálatok során kiderült, hogy új genus-ról és új fajról van szó. Fontos megemlíteni a sejtvonalak eredeti vizsgálatának eredményét, mely szerint a *Pseudocitrobacter faecalis* képes lebontani az igen erős számító karbapenem antibiotikumokat (Kampfer 2014). Az MWGA-3 és MWGA-8 törzseket *Intestinirhabdus alba* fajként határoztuk meg. Ezt a fajt 2020-ban írták le és egyben ez a faj az Enterobacteriaceae családon belül egy új nemzetség elsőként leírt képviselője. A baktériumot műanyaggal, polisztirénnel etetett bogár lárvából izolálták. A konkrét bogár faj a *Zophobas atratus*, amely a lisztkukachoz hasonlóan a *Tenebrionidae* (Gyászbogárfélék) családba tartozik

és a lisztukaccal (*Tenebrio molitor*) sok hasonlóságot mutat. Magyar neve nincsen, de az angolban „giant mealworm”, „óriás lisztukacként” emlegetik. A baktérium Gram-negatív, fakultatív anaerob, rövid pálcika alakú, terminális flagellumokkal, amely LB táptalajon sima szélű, kerek, fehér, konvex, 3,0-3,5mm átmérőjű telepeket képzett. Növekedési képességet mutatott 16-40 °C között, 4,5-10 pH értékig, 0-6% sótartalomig. Növekedési optima 23 °C, 4,5-9 pH, és 0% NaCl volt. A típusörzs rezisztens volt sztreptomycinre, de érzékeny volt a következő 8 antibiotikumra: karbenicillin, ampicillin, klóramfenikol, kanamicin, tetraciklin, spektinomycin, rifampicin, gentamicin (Xzu et al. 2020).

AZ MWGA-2 és MWGA-5 minták tehát a koreai kutatók által *Mixta intestinalis*-ként azonosított CP028271 szekvenciával mutatták a legnagyobb egyezést. Bár saját adatelemzésünk alapján a mi mintánk a *Mixta tenebrionis*-al nagyobb egyezőséget mutat, az elsőre 97,22%, az ismétléskor 98,25%, mint a *Mixta intestinalis*-al, elsőre 96,76% az ismétléskor 97,15%, viszont az előbbi a fajt csak két évvel CP028271 feltöltése után írták le, tehát koreai csapat még nem is azonosíthatta volna *M. tenebrionis*-ként. A *Mixta tenebrionis* fajt 2019-ben írták le Xia M. és társai. A baktériumfajt műanyaggal etetett lisztukac beléből izolálták. A baktérium fakultatív anaerob, Gram-negatív, pálcika formájú teljes felületén flagellumokkal borított. A 16S rRNS-t kódoló gén hosszúsága 1412 bp. A baktérium zsírsav készlete is a *Mixta* nemzetség más fajaihoz hasonlított. Viszont a DNS-DNS hibridizáció teszt során a típusörzs szignifikánsan különbözött a többi már leírt fajtól. Így új faj jelöltként a *Mixta tenebrionis* nevet kapta. Az lisztukac bélből vett izolátumot hozzánk hasonló módon LB táptalajon, 28 Celsius fokon inkubálták és 5 nap után kezdték meg a random módon kiválogatott telepek tisztító szélesztését. A baktérium LB táptalajon 12-41 °C hőmérsékleten, 4,5-9 pH kémhatású és 0-7,5% sótartalmú közegben volt képes növekedni. Az optima 20-40 °C, 6-7,5 pH, 1-1,5% sótartalom volt.

A *Mixta intestinalis* fajt 2015-ben Parkash O. és társai írták le először, akkor még *Pantoea Intestinalis* néven. Az eredetileg 29Y89BT névvel ellátott típusörzset egészséges embertől származó fekális mintából izolálták. A baktériumot tripton szója agaron (TSA) tenyésztették, ahol 2mm-es krémszínű telepeket képzett 24 órás, 35 °C inkubációt követően. A baktérium Gram-negatív, nem spóráképző, pálca formájú. Képes volt tolerálni akár 10%-os sótartalmat, valamint 15-45°C-os hőmérséklet tartományt, de optimális növekedést 35 fokon 0,5% NaCl tartalom mellett produkált. A vizsgált baktérium sejtek pozitív teszteredményt adtak a kataláz, nitrát redukáz, celluláz és Voges–Proskauer reakciókban, és negatív eredményt adtak az oxidáz, ureáz, zselatináz és amiláz teszteken. A filogenetikai vizsgálatok alapján az izolált baktérium egyértelműen egy *Pantoea* faj. Mivel a 29Y89BT törzsl DNS-DNS hibridizációs

tesztben történő összehasonlítása más, már leírt *Pantoea* fajokkal, alacsony értéket mutatott, és mivel ez volt az első, vélhetően ebbe a nemzetségbe tartozó, humán eredetű baktérium törzs, így új fajnak jelölték, amely a *Pantoea intestinalis* sp. nov. nevet kapta. Később, 2018-ban Palmer M. és társaink munkája eredményként, az Erwiniaceae családon belüli új nemzetség elkülönítését követően kapta a *Mixta* nemzetség nevet. Ekkortól tehát a helyes elnevezés a *Mixta intestinalis*.

5. Következtetések

Az általam izolált baktériumok szekvenciáinak az online adatbázissal történő összevetése során egytől-egyig olyan fajok neve került elő a legnagyobb egyezőséget mutató kategóriában, amelyeket az emésztőrendszerrel összefüggésben, két esetben lisztkukac félék emésztőrendszerével összefüggésben írtak le. Tehát az általam kidolgozott módszer a bélrendszer feltárására megfelelő, vagyis tényleg a lisztkukacből származó baktériumokat sikerült kitenyésztenem, azokból izoláltam DNS-t, tehát kizárható a tenyészetek más forrásból való befertőződésének lehetősége. Sikerült elvégezni egy számomra új „környezeti” mintából származó baktériumközösség kitenyésztését, tisztítását, DNS kivonását és végül a 16S rDNS alapú identifikációra való előkészítését. Másrészt egyértelműen kiderült, hogy a lisztkukacok emésztőrendszerében jelenlévő mikroba közösség nagyon változatos és még alig feltérképezett. Mi sem mutatja ezt jobban, minthogy már az első próbálkozás alkalmával legalább egy olyan baktériumtörzset sikerült izolálni, amely még le nem írt taxonra utal (MWGA-2, MWGA-5). Valamint van még egy törzs, az MWGA-3, amely csak 96,51%-os egyezést mutat a legközelebbi rokon fajjal, ami szintén akár le nem írt fajra utalhat.

A második körben az MWGA-2 és MWGA-5 esetében elvégzett, kibővített teljes 16S szekvencia elemzése során bebizonyosodott, hogy a két minta megegyezik, vagyis ugyanahhoz a baktériumtörzshöz tartoznak. Kim és társai 2014-es cikkére és a teljes 16S szekvencia legközelebbi rokonnal való egyezőségére alapozva feltehetően az MWGA-5 jelű törzs egy új faj. A feltevés igazolásához, vagy cáfolásához az új faj leírásához szükséges összes vizsgálat elvégzése szükséges. Ezek közül kettő már rendelkezésre áll, a törzs teljes 16S rDNS szekvenciája, valamint a baktérium morfológiai leírása. Hiányzik azonban a legközelebbi rokon fajjal, ez esetben a *Mixta tenebrionissal* összevetésben elvégzett, DNS-DNS hibridizáció eredménye, a teljes genomi DNS guanin-citozin arányának megállapítása. Hiányoznak a szubsztrát hasznosítási (API) és érzékenységi (pl. pH, hőmérséklet) tesztek, a sejtmembrán zsírsav analízis, a respiratorikus kinon analízis és a poláros lipid tartalom vizsgálat eredményei. Továbbá az új faj leírásához hiányzik még a baktériumtörzsről készített elektronmikroszkópos felvétel. Mindezek megléte esetén igazolható, hogy új fajjal van-e dolgunk és az eredmény akár publikálható is.

Ha figyelembe vesszük, hogy az identifikáció során előkerült fajok között két olyan is felmerült, amelyeket műanyaggal etetett lárvák beléből írtak le és ha hozzá vesszük a szakirodalomból származó azon információt, hogy az egyes anyagok etetés esetén más-más baktérium fajok

szaporodhatnak fel az emésztőrendszerben, akkor ez arra enged következtetni, hogy a lisztukacok belében élő mikroba közösség és annak alkalmazkodó képessége sokféle biológiailag lebomló, vagy akár eddig le nem bomlónak vélt hulladék hasznosíthatóságának lehetőségét hordozza magában. Ebből kifolyólag az élelmiszerpazarlásra, a biológiailag lebontható hulladékok fenntartható kezelésére hatékony módszer lehet a jövőben a lisztukac és más rovarok általi hulladék hasznosítás. Ha a rovartenyésztés lehetőségeit azzal az ellentmondásos helyzettel összevetve vizsgáljuk, hogy a Föld népességének 8,6%-a éhezik, miközben világszinten az élelmiszerek és az élelmiszer alapanyagok egy harmada hulladékká válik, akkor az látható, hogy a rovartenyésztés mindkét oldalnak kínál megoldási lehetőséget. Hiszen a hulladékhasznosítással egyidejűleg értékes állati fehérjét, takarmányt, vagy akár állati eredetű élelmiszert is termel, ami iránt világszinten egyre növekvő kereslet mutatkozik. Ezzel párhuzamosan azonban, azt is fontos szem előtt tartani, hogy az előzőekben tárgyalt baktériumfajok közül kettő is rendelkezett antibiotikum rezisztencia képességgel, ezek közül az egyik egy kifejezetten erős antibiotikum csoporttal, a karbapenemmel szemben volt ellenálló. Ebből következik, hogy a rovarokkal való munkavégzés, valamint a belőlük történő baktérium izolálás, akár súlyos bakteriális fertőzés lehetőségét is magában hordozhatja. Továbbá az egész lisztukac felhasználásából származó takarmány komponens vagy élelmiszer alapanyag fogyasztása takarmány- és élelmiszerbiztonsági kérdéseket vethet fel. Az alapanyagok felhasználása valószínűleg csak hőkezelést követően javasolható.

6. Javaslatok

Saját kutatásomat tovább gondolva javasolnám, a folyamat elején kiesett két minta, az MWGA-1 és MWGA-7 esetében a DNS kivonás megismétlését és az identifikációs munkafolyamat újbóli elvégzését. Javasolnám az MWGA-3 törzsnél is elvégezni a teljes 16S génszakasz szekvenálását, hogy pontosabb következtetést lehessen levonni annak faji hovatartozásáról. Az MWGA-5 jelű törzs esetében az új faj leírás előkészítéséhez szükséges és még hiányzó, a következtetésekben felsorolt vizsgálatok elvégzését javasolnám.

Azoknál a mintáknál, amelyeknél a szakirodalom alapján felmerült valamilyen antibiotikum rezisztencia lehetősége, mindenképpen szükséges lenne a saját törzseink ilyen jellegű tulajdonságainak tesztelése. Ezzel párhuzamosan újabb boncolásokat és mintavételeket végeznék, hogy minél alaposabban feltérképezhessük a lisztkekacsból található bakteriális közösséget, az abban rejlő lehetőségeket és esetleges veszélyeket. Az izolált baktériumok megismerésére további vizsgálati irányok kijelölése lenne szükséges pl. in vitro bontási, biodegradációs tesztek, illetve ezek hatása a bakteriális közösségre. Az új preparátumokból akár közösségi DNS is izolálható lenne, hogy a komplex mikrobiális közösség egészéről nyerjünk információkat.

Mindezek mellett javasolnám vizsgálni a szennyezett, hagyományos állattenyésztésben toxikusnak tartott, hulladékokon tenyésztett rovarok felhasználási lehetőségét, valamint a rovartermékek bio állattartásban történő felhasználási lehetőségeinek elemzését. Gyakorlati szempontból is érdekes lehet a bio rovartermék előállítás technológiájának és követelményrendszerének kidolgozása. Ez a téma azért tűnik különösen érdekesnek, mert az abrakfogyasztó állatoknál, bio tartásban sokszor fejtörést okoz a megfelelő fehérjehordozó kiválasztása, hiszen a világpiacon szarmazó szója nem jöhet számításba. Továbbá több állatfajnál, baromfiknál, de sertésnél is a rovarfogyasztás, a természetes étrend részét képezi. Ráadásul, ha a rovarlárvákat élve kínáljuk az állatoknak, az további ökológiai igényeket elégít ki, amely szempont a bio állattartásban mindig nagy hangsúlyt kap.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm szépen Dr. Szabó Istvánnak, konzulensemnek a TDK Dolgozatom elkészítéséhez nyújtott szakmai segítségét, tudományos iránymutatását és mindig jókedélyű, segítőkész hozzáállását!

Köszönettel tartozom Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak, aki az apró laboratóriumi teszthalak, a zebradániók és lárváik boncolásában szerzett komoly tapasztalatával segített engem a lisztkukac boncolás első lépéseinél.

Köszönetemet szeretném kifejezni továbbá az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet minden munkatársának, akik valamilyen formában hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez, kiemeltképpen: Dr. Kaszab Editnek, Benséné Fekete Ildikónak, Szaniszló Tímeának, valamint Sebők Rózsának és Tischner Zsófiának.

8. Irodalomjegyzék

- Aleksza L (2019): Kihívások a hazai komposztálásban előadás anyag. ProfiComp Kft. - Innovációs és Technológiai Minisztérium, 37 dia.
- Baranyai G. (2018): Paradigmaváltás az európai hulladékjogban? – Észrevételek a kiterjesztett gyártói felelősség intézményesüléséhez. Európai Tükör, 21(3): 93-115.
- Beynen, A. (2018): Insect-based petfood. Creature Companion, 2018 (September): 40-41.
- Bjorge, J. D., Overgaard, J., Malte, H., Gianotten, N. & Heckmann, L.-H. (2018): Role of temperature on growth and metabolic rate in the tenebrionid beetles *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*. Journal of Insect Physiology, 107: 89-96.
- Bozsik A. C. (2015): A rovarok (Insecta) poszttembrionális fejlődése és lárvalakjai. Tudományos értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, 28 p.
- Brandon, A. M., Gao, S.-H., Tian, R., Ning, D., Yang, S.-S., Zhou, J., Wu, W.-M. & Criddle, C. S. (2018): Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome. Environmental Science & Technology, 52(11): 6526–6533.
- EFSA Journal (2021): Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. Folyóirat. 29 p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021): Looking at edible insects from a food safety perspective. Kiadvány. Róma. 108 p.
- Gharfalkar, M., Court, R., Campbell, C., Ali, Z. & Hillier, G. (2015): Analysis of waste hierarchy in the European waste directive 2008/98/EC. Waste Management, 39: 305-313.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E. & Weinstock, G. M. (2019): Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. Nature Communications, 10: 5029.
- Juhász L. & Kozák L. (2009): Állattani alapismeretek. Bástyá Kiadó, Debrecen, 167 p.
- Kämpfer, P., Glaeser, S. P., Raza, M. W., Abbasi, S. A., & Perry, J. D. (2014): *Pseudocitrobacter* gen. nov., a novel genus of the Enterobacteriaceae with two new species *Pseudocitrobacter faecalis* sp. nov., and *Pseudocitrobacter anthropi* sp. nov, isolated from fecal samples from hospitalized patients in Pakistan. Systematic and Applied Microbiology, 37(1): 17-22.
- Kämpfer, P., Fuglsang-Damgaard, D., Overballe-Petersen, S., Hasman, H., Hammerum, A. M., Fuursted, K., Blom, J., Glaeser, S. P. & Hansen, F. (2019): Taxonomic reassessment of the genus *Pseudocitrobacter* using whole genome sequencing: *Pseudocitrobacter anthropi* is a later heterotypic synonym of *Pseudocitrobacter faecalis* and description of *Pseudocitrobacter vendiensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(2).

- Kim et al. (2014): Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 346-351
- Mahro, B. & Timm, M. (2007): Potential of Biowaste from the Food Industry as a Biomass Resource. *Engineering in Life Sciences*, 7(5): 457-468.
- Official Journal of the European Union (2017): Commission Regulation (EU) 2017/893. *Folyóirat*. 25 p.
- Prakash, O., Nimonkar, Y., Vaishampayan, A., Mishra, M., Kumbhare, S., Josef, N., & Shouche, Y. S. (2015): *Pantoea intestinalis* sp. nov., isolated from the human gut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65:10.
- Rodjaroen, S., Thongprajukaew, K., Khongmuang, P., Malawa, S., Tuntikawinwong, K., & Saekhow, S. (2020): Ontogenic Development of Digestive Enzymes in Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor*) and Their Suitable Harvesting Time for Use as Fish Feed. *Insects*, 11(6): 393 p.
- Sangiorgio, P., Verardi, A., Dimatteo, S., Spangnoletta, A., Moliterni, S. & Errico, S. (2021): Valorisation of agri-food waste and mealworms rearing residues for improving the sustainability of *Tenebrio molitor* industrial production. *Journal of Insects as Food and Feed*, 0(0): 1-16.
- Siow, H. S., Sudesh, K., Murugan, P. & Ganesan, S. (2021): Mealworm (*Tenebrio molitor*) oil characterization and optimization of the free fatty acid pretreatment via acid-catalyzed esterification. *Fuel*, 299: 120905.
- Tóth J. (1999): *Erdészeti rovartan*. Agroiinform Kiadó, Budapest, 527 p.
- Ujvárosi L. & Urák I. (2008): *Állattani ismeretek*. Ábel Kiadó, Kolozsvár, 259 p.
- Wu, R. A., Ding, Q., Yin, L., Chi, X., Sun, N., He, R., Luo, L., Ma, H. & Li, Z. (2020): Comparison of the nutritional value of mysore thorn borer (*Anoplophora chinensis*) and mealworm larva (*Tenebrio molitor*): Amino acid, fatty acid, and element profiles. *Food Chemistry*, 323: 126818.
- Wu, W., Yang, S., Brandon, A. M., Yang, Y., Flanagan, J. A., Fan, H. Q., Cai, S. Y., Wang, Z. Y., Din, L. Y., Daliang, N., Yang, J., Ren, J., Tao, H. C., Phillips, D., Ren, N. Q., Zhou, J., Waymouth, R. & Criddle, C. S. (2016): Rapid biodegradation of plastics by mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) brings hope to solve wasteplastic pollution. (abstract #H24A-03) American Geophysical Union.
- Xia, M., Wang, J., Huo, Y.-X. & Yang, Y. (2019): *Mixta tenebrionis* sp. nov., isolated from the gut of the plastic-eating mealworm *Tenebrio molitor* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(2).
- Xu, Z., Xia M., Huo Y.-M- & Yang, Y. (2020): *Intestinirhabdus alba* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Enterobacteriaceae, isolated from the gut of plastic-eating larvae of the Coleoptera insect *Zophobas atratus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(9).

Yang, S.-S., Chen, Y., Zhang, Y., Zhou, H.-M., Ji, X.-Y., He, L., Xing, D.-F., Ren, N.-Q., Ho S.-H. & Wu, W.-M. (2019): A novel clean production approach to utilize crop waste residues as co-diet for mealworm (*Tenebrio molitor*) biomass production with biochar as byproduct for heavy metal removal. *Environmental Pollution*, 252: 1142-1153.

Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R. & Jiang, L. (2015): Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Environmental Science & Technology*, 49(20): 12080–12086.

Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R. & Jiang, L. (2015): Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 49(20): 12087–12093.

Zhang, X., Tang, H., Chen, G., Qiao, L., Li, J., Liu, B., Liu, Z., Li, M. & Liu, X. (2019): Growth performance and nutritional profile of mealworms reared on corn stover, soybean meal, and distillers' grains. *European Food Research and Technology*, 245: 2631–2640.

Zhao, X., Vázquez-Gutiérrez, J. L., Johansson, D. P., Landberg, R., & Langton, M. (2016): Yellow Mealworm Protein for Food Purposes - Extraction and Functional Properties. *Plos One*, 11(2): e0147791.

Zheng, L., Hou, Y., Li, W., Yang, S., Li, Q. & Yu, Z. (2013): Exploring the potential of grease from yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) as a novel biodiesel feedstock. *Applied Energy*, 101: 618-621.

http1: <http://hulladekok.hu/> (2021 október)

http2 Breedinginsects. <https://www.breedinginsects.com/yellow-mealworm-life-cycle/> (2021 október)

http3 FAO <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/flw-data> (2021 október)

http4 Action Against Hunger <https://www.actionagainsthunger.org/world-hunger-facts-statistics> (2021 október)

http5 FAO <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/indicators/12.3.1/en> (2021 október)

Lisztukacok (*Tenebrio molitor*) emésztőrendszerének mikrobiológiai vizsgálata

Microbiological research on mealworm (*Tenebrio molitor*) guts

Készítette: **Vajnai Zoltán** Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő, Környezetgazdálkodási agrármérnök, MSc, 2.évfolyam

Témavezető: **Dr. Szabó István** egy. docens, tanszékvezető, Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék, Gödöllő

Diplomadolgozatomban az emberiség és az agrárium előtt álló feladat, a növekvő élelmiszer igény és növekvő hulladék termelésre adható egyik innovatív megoldás a rovartenyésztés integrálásával kapcsolatos alapkutatást végeztem. Kutatásom a rovartenyésztésben széleskörben alkalmazott egyik fajra a lisztbogár (*Tenebrio molitor*) lárvájára a lisztukacra irányult. Célom volt, hogy baktériumokat izoláljak a lisztukac emésztőrendszeréből és azokat faj szinten identifikáljam, majd pedig szakirodalmi információt gyűjtssek az identifikált fajokról. Ehhez olyan mintavételi módszert dolgoztam ki, amely segítségével a tápcsatorna kiperarálható és biztonsággal mintázható.

A kidolgozott módszer során a lisztukac tápcsatorna kiperarálást követően a teljes emésztőrendszert steril fizsó oldatban homogenizáltam, majd a szuszpenzióból határhígítást készítettem 10^8 hígításig. Ezt követően lemezöntéssel LB táptalajon, 28 fokon, 48 óráig inkubálással törzseket izoláltam. Következő lépésben 8 telepet kiválasztva tiszta tenyészeteket készítettem, majd DNS-t izoláltam belőlük. Az izolált DNS jelentlétét a mintákban agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, majd 27f és 1492r primerekkel PCR készülékben amplifikáltam a minták 16S rDNS szakaszát. A PCR terméket megtisztítottam, majd szekvenáló PCR-rel készítettem elő a Sanger féle szekvenálásra, amit külsős cég (Biomi Kft.) végzett el. A kapott szekvenciák hossza ~600bp, volt, ezeket az EZBioCloud online adatbázisával vettem össze. A 6 darab mintából négyet tudtam faji szinten identifikálni, ezeket korábban bélrendszerből, vagy konkrétan lisztukacból írták le. Két minta esetében a legközelebbi rokon egy még le nem írt fajhoz tartozik. A le nem írt fajhoz tartozó 2 mintából, kibővített, több primerrel megfuttatott teljes 16S rRNS szekvenálás történt, ennek eredménye már megbízhatóan mutatta, hogy a legközelebbi rokon fajjal való egyezés a szakirodalom által meghatározott határ (98,85%) alatt van, vagyis feltételezhetően egy új fajjal van dolgunk. Ennek bizonyításához tovább tesztek szükségesek.