

***Fusarium graminearum*-mal fertőzött kukorica anaerob fermentációja**

Mézés Lili – Biró Györgyi – Tamás János

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet, Debrecen
mezes@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt év csapadékos időjárása miatt kedvező körülmények alakultak ki hazánkban a *Fusarium sp.* gombák számára. A fuzárium-gombák rontják a gabonafélék szemtermésének minőségét, illetve az általuk termelt mikotoxinok, mind az emberre, mind a használatokra veszélyesek (Placinta et al., 1999). A fuzárium fertőzés és mikotoxin termelés hatását teljes mértékben sehol sem sikerült kiküszöbölni. Hazánkban a leggyakoribb mezőgazdasági kórokozó a *Fusarium graminearum*. A fuzáriummal fertőzött kukorica biogáz alapanyagként történő hasznosítása hatékony és környezetbarát ártalmatlanítási módszer lehetne. Ebben az esetben azonban meg kell vizsgálni a kukorica fuzárium-, illetve toxintartalmát és hatását a biogáz-termelés folyamatára. Vizsgálataink során egy mezőgazdasági biogáz üzem adott szerves alapanyagbázisát vettük alapul. Az állandó összetételű alapanyagokhoz különböző arányban fuzáriummal szennyezett és fuzárium mentes kukoricadarát, illetve kukoricaszemet kevertünk, majd a *Fusarium gomba* kimutathatóságát elemeztük a laboratóriumi kísérleti fermentorokban a mezofil fermentáció különböző szakaszaiban. A fermentlevelekből táptalajos tenyésztést, illetve mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk a *Fusarium sp.* jelenlétének igazolására. A fuzáriumot nem lehetett kimutatni 30 nap után a fermentlében.

Kulcsszavak: biogáz, *Fusarium graminearum*

SUMMARY

Last year intense rainfalls and moisture conditions were beneficial for the *Fusarium sp.* in Hungary. *Fusarium* strains decrease cereal quality (for example maize), furthermore may cause yield loss. Due to the toxin production, the fungi have a dangerous animal and human pathogen effect (Placinta et al., 1999). The effects of the *Fusarium* infection and its mycotoxin production haven't been perfectly eliminated. *Fusarium graminearum* is the most common agricultural pathogen in Hungary. The utilization of infected maize as an alternative biogas raw material may be an efficient and environmentally friendly disposal method. In this case, *Fusarium*-, and mycotoxin-content of the maize have to be analyzed as well as the impact of these factors' on the biogas production process. Our experience was based on the raw material basis of a biogas plant. Different amount of *Fusarium* free and infected maize grits have been added to the regular raw material mixture. The detection of *Fusarium* fungi has been analyzed in experimental digesters throughout the different stages of mesophilic digestion. In the biogas liquid end product the *Fusarium* was detected by breeding and by microscope. According to our results, the *Fusarium sp.* was not detectable in the liquid end product after 30 days.

Keywords: biogas, *Fusarium graminearum*

BEVEZETÉS

Az elmúlt év csapadékos időjárása miatt kedvező körülmények alakultak ki a *Fusarium sp.* gombák számára. A fuzárium gombák rontják a gabonafélék (pl.

kukorica) szemtermésének minőségét, illetve az általuk termelt mikotoxinok, mind az emberre, mind a használatokra veszélyesek (Placinta et al., 1999). A fuzárium fertőzés és mikotoxin termelés hatását teljes mértékben sehol sem sikerült kiküszöbölni. Hazánkban a leggyakoribb mezőgazdasági kórokozó a *Fusarium graminearum*. Az Európai Bizottság 2006/576/EK rendelete, valamint az Magyar Tudományos Akadémia, Állatorvos-tudományi Bizottsága 2003-ban takarmánykeverékekre vonatkozóan, állatfajonként a 0,4–2,0 mg/kg tartományban adta meg a fontosabb mikotoxinok megengedhető határértékeit (Búza és M. Schill, 2010).

Biogáz alapanyagként történő hasznosítása így optimális ártalmatlanítási módszer lehetne. Ebben az esetben azonban meg kell vizsgálni a kukorica fuzárium-, illetve toxintartalmát és hatását a biogáz-termelés folyamatára. Kacz és Neményi (1998) szerint ugyanis a szerves anyagból kinyerhető metángáz mennyisége nagyban függ a kiindulási szerves anyag összetételétől és minőségétől. Vizsgálataink során egy mezőgazdasági biogáz üzem adott szerves alapanyagbázisát vettük alapul. Az állandó összetételű alapanyagokhoz különböző arányban fuzáriummal szennyezett és fuzáriummentes kukoricadarát, illetve kukoricaszemet kevertünk, majd a *Fusarium gomba* kimutathatóságát elemeztük a Debreceni Egyetem Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet (DE VKI) laboratóriumának kísérleti modellreaktoraiban a mezofil fermentáció különböző szakaszaiban. Laboratóriumi körülmények között teszteltük a takarmányok *Fusarium sp.* gomba fertőzöttségének mértékét.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokhoz a DKC4372 kukorica hibridet választottuk ki, melyet az adott biogáz üzemben legnagyobb arányban használnak fel takarmányozási célra. A minták előkészítése során WARING® márkájú SNIJDERS ANALYSEER aprítógépet használtunk a kukoricadara készítéséhez, a pontos mennyiség kimérésére pedig OHAUS gyártmányú PIONEER PA4101C típusú analitikai mérleget.

***Fusarium sp.* gomba fertőzöttség megállapítása**

A kukorica *Fusarium sp.* fertőzöttségének megállapítására az MSZ 6383:1998 számú szabványt alkalmaztuk, illetve mikroszkópos (Alpha BIO-3CCD) vizsgálatot végeztünk.

A *Fusarium sp.* gombák kimutatására a fermentléből Petri-csészés tenyésztést végeztünk NÜVE LN 120 típusú lamináris steril fülkében [85%-os hatékonyságú előszűrő (részecskék:>0,5µm) és 99,999%-os haté-

konságú HEPA (High Efficiency Particulate Air) szűrő (részecskék: $>0,3 \mu\text{m}$]. Fuzárium specifikus Papanovias (pH: 5,2, 1000 ml ioncserélt víz, 15 g pepton, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g epesó, 20 g agar, 0,5 g PCNB (pentaklórnitrobenzol), 50 mg klór-tetraciklin HCl, 100 mg sztreptomycin-szulfát) táptalajon tenyésztettük ki a gombákat (Szécsi és Mesterházy, 1998).

A táptalajok összeállítása után (OHAUS Explorer E14130 Balances analitikai mérleg, OHAUS gyártmányú PIONEER PA4101C táramérleg) a homogenizálást VELDARED típusú fűthető mágneses keverővel végeztük. A pH-t minden esetben a megadott értékre állítottuk be [Hanna gyártmányú, HI 255 típusú kombinált mérőműszer: pH/ORP/hőmérséklet/EC/TDS/NaCl (méréshatár: 0–16pH \pm 0,01, (-20)-(120) $^{\circ}\text{C}\pm$ 0,4 $^{\circ}\text{C}$)]. A táptalajokat Raypa típusú mikroprocesszor-vezérelt szárítós és elővákuumos sterilizáló autoklávban gőzzel (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 perc), túlnyomáson (1,5–2,5 bar) sterilizáltuk. A lamináris boxban Petri-csészékbe töltöttük ki a táptalajokat, melyeket szilárdulás után használtunk fel. Következő lépésként történt a leoltás a fermentléből a szilárd táptalaj felszínére. A különböző összetételű fermentlevekkel 1 ml-t mértünk a Petri-csésze közepére, amit egyenletesen eloszlattunk. A Petri-csészéket ezután a 25 $^{\circ}\text{C}$ -ra beállított VWR gyártmányú, INCULINE típusú 10 literes digitális mini inkubátorba (inkubálási tartomány: +5–70 $^{\circ}\text{C}\pm$ 0,5 $^{\circ}\text{C}$) helyeztük. 1 hét inkubációt követően szabad szemmel és fénymikroszkóp (Alpha BIO-3CCD) felhasználásával ellenőriztük a kifejlődött gombatelepeket.

Laboratóriumi fermentációs kísérletek

A DE VKI laboratóriumában található hőszigetelt termosztát szekrényekben (4 db) 6 liter térfogatú rozsdamentes acéltartályban végeztük az anaerob fermentációs kísérleteket. A reaktorból távozó gázelegy esetleges szerves sav-tartalmának elnyelésére vízzel töltött gázmosó palackokat, míg víztelenítésére hűtőberendezést használtunk. A biogáz egy kettős szeleprendszeren át vagy a detektorba, vagy a kivezető csőbe távozott. A

gázmosó és a hűtőberendezés után a gázkeverék összetételének meghatározása folyamatos üzemmódú Fisher-Rosemount NGA 2000 típusú (CH_4 , CO_2 , (0–100 tf%), O_2 (0–25 tf%)) gáz-analizátorral történt adott hullámhosszakon való abszorbancia és potenciometria elve alapján. A kénhidrogén és az ammónia [H_2S , NH_3 (cm^3/m^3)] mérését Oldham gyártmányú, MX42A típusú gázelemzővel végeztük szakaszos üzemmódban, mely előtt nem szükséges gázmosó-palackot alkalmazni (Mézés et al., 2007).

A rendszer irányítástechnikai vezérlését (hőmérséklet szabályozása: mezofil (38 $^{\circ}\text{C}$), termofil (55 $^{\circ}\text{C}$), biogáz koncentráció (tf%) adatok tárolása, gázmennyiség mérése [átalakított Brooks gyártmányú, 5850 E tömegáram szabályozó (mérési tartomány: 20 ml/perc–20 l/perc, pontosság: 0,001 ml/perc)], szelepek vezérlése, valamint a mérési adatok rögzítését (pontosság: 0,001 dm^3), feldolgozását az erre a célra kifejlesztett szoftver, az ADVANTECH GENIE 3.0 verziója tette lehetővé. A technológia fejlődésével a szoftver elavulttá vált, illetve az alkatrészek meghibásodása is szükségessé tette a vezérlésirányítási rendszer teljes cseréjét. 2010-ben az Intézet laboratóriuma új irányítástechnikai rendszert alkalmazott a fermentációs kísérletek lefolytatásához. A rendszer vezérléséről Linux platformon (Debian) futó CView SCADA (Supervisory Control and Data Acquisition) szoftver implementáció gondoskodik (Biró et al., 2011).

Kísérleti beállítások a biogáz modell reaktorokban

A vizsgált biogáz üzem alapanyagbázisát vettük alapul a laboratóriumi beállítások esetén, mely szarvasmarha hígtrágyára, silókukoricára, sterilizált vágóhídi húslére és szilárd fermentált végtermékre (ún. szeparált anyag) épült. Az alkalmazott alapreceptúrához kontroll és fuzáriummal fertőzött kukoricaszemeket adtunk meghatározott mennyiségben. A beállított arányok a következők voltak: 5,26%, 10%, 26,3% fertőzött kukorica (g/kg szá.%) (1. táblázat). A nem fertőzött kukoricaszemek *Fusarium sp.*-től való mentességét előzetes mikrobiológiai vizsgálatokkal igazoltuk.

1. táblázat

A felhasznált input anyagok mennyisége (5%, 10% és 26% kukoricadarával beállított kísérlet)

Alapanyag (1)	Mennyiség 5 l-re (g)(2)	Szárazanyag-tartalom (%) (3)
Húslé(4)	220	30
Silókukorica(5)	160	38
Szeparált anyag(6)	43	35
Hígtrágya(7)	500	4
Fermentlé(8)	4000	0,9
	5,26 g/kg szá. % kukoricadara(11)	
Kontroll kukoricadara(9)/Fuzáriumos kukoricadara(10)	11,4	87,6
	10 g/kg szá. % kukoricadara(11)	
Kontroll kukoricadara(9)/Fuzáriumos kukoricadara(10)	22	87,6
	26,3 g/kg szá. % kukoricadara(11)	
Kontroll kukoricadara(9)/Fuzáriumos kukoricadara(10)	57	87,6

Table 1: The amount of input materials (experimental settings with 5%, 10% and 26% maize-grits)

Raw material(1), Quantity in 5 l volume (g)(2), Dry material-content (%) (3), Abattoir effluent(4), Silage(5), Dry biogas end product(6), Pig slurry(7), Liquid biogas end product(8), Control maize-grits(9), *Fusarium* infected maize-grits(10), Maize-grits(11)

A mezofil fermentációs kísérlet folyamán a CH_4 , CO_2 , O_2 gázelegy összetételét és mennyiségét, a H_2S , az NH_3 mennyiségét (cm^3/m^3), illetve a hőmérsékletet [Jumo gyártmányú PT 100 szonda (hőmérséklet-tartomány: $-50\text{ }^\circ\text{C}$ – $+300\text{ }^\circ\text{C}$)] folyamatosan mértük. A pH-t hetente vizsgáltuk mind a négy fermentor esetén. A szárazanyag-, szén-, kén- és nitrogén-tartalom elemzésére az alapanyag és a végtermék esetében került sor. A vizsgálatokat a BátorTrade Kft. központi laboratóriumában (C-, N-tartalom) és a Debreceni Egyetem Műszerközpontjában (S-tartalom) Dumas-féle égetéses eljárás elvén működő Elementar VARIO EL® univerzális elemelő (mérési pontosság: $\leq 0,1\%$) segítségével határozták meg. A fermentált végterméket a vizsgált biogáz üzemben szeparálják, ezért laboratóriumi körülmények között is szilárd és folyékony frakciókra osztottuk fel a fermentleveket. Hettich Rotofix 32 típusú centrifuga [30 perc, 6000 RPM (fordulat/perc)] segítségével választottuk szét felülúszó és szilárd fázisra, majd a minta megfelelő homogenitásának biztosítása után meghatároztuk a szárazanyag-tartalmukat (MSZ 318-3:1979) $105\text{ }^\circ\text{C}$ -on, tömegállandóságig történő szárítással.

EREDMÉNYEK

Fusarium sp. fertőzöttség kimutatása kukoricában

A kukorica *Fusarium sp.* fertőzöttségének szabvány szerinti meghatározása során nagymértékű *Fusarium* fertőzöttséget tapasztaltunk, melyet mikroszkópos vizsgálattal is sikerült igazolni. Az 1. képen jól felismerhetők a *Fusarium sp.*-re jellemző többsejtű, sarlóalakú makrokonídiumok.

1. kép: A kitenyészett *Fusarium sp.* makrokonídiumainak mikroszkópos felvétele (40x)



Picture 1: Microscopic view of *Fusarium sp.* macroconidia breed (40x)

Anaerob fermentációs kísérletek eredményei

A kísérletek kezdeti pH értéke $7,0 \pm 0,4$, míg a 4 hetes fermentációs időszak végén $8,2 \pm 0,3$ volt. A fermentlé felülúszó fázisának szárazanyag-tartalma $0,82\%$

$2,82\%$ között változott valamennyi receptúra esetén. A fermentlé szilárd fázisának vizsgálata során $10,78\%$ – $15,38\%$ közötti értékeket mértünk. Az input anyagok szárazanyag-tartalma jelentősen csökkent a fermentáció időtartama alatt. A fermentlé szárazanyag-tartalmát a *Fusarium* kukoricadara bekevert mennyiségének függvényében (5%, 10%, 26%) vizsgáltuk (1., 2. ábra). A felülúszó fázis esetén 5%-tól a 26%-os kezelésekig növekvő tendenciát mutattak (1. ábra), ellenben a szilárd fázisban mért eredményekkel, melyek a kontroll és a fertőzött alapanyagok esetén nem mutattak szignifikáns különbséget (2. ábra).

1. ábra: Fermentlé felülúszó fázisának szárazanyag-tartalma az egyes receptúra variánsok esetén

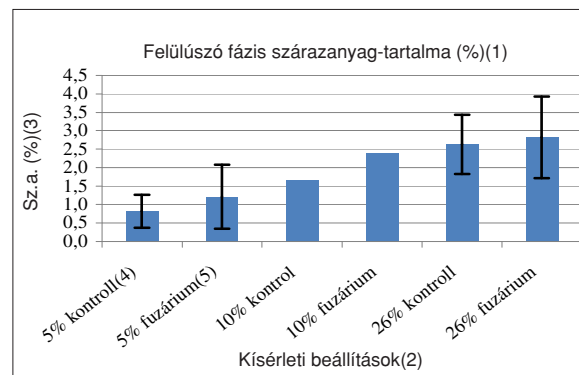


Figure 1: Dry material-content of the liquid biogas end product in case of other raw material variants

Dry material-content of the liquid biogas end product(1), Experimental settings(2), Dry material content(3), Control(4), *Fusarium* infected(5)

2. ábra: Fermentlé szilárd fázisának szárazanyag-tartalma az egyes receptúra variánsok esetén

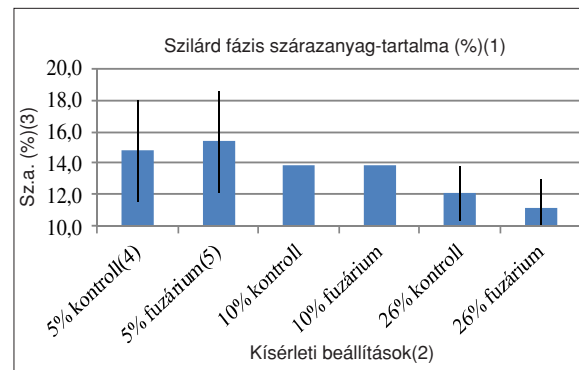


Figure 2: Dry material-content of the dry biogas end product in case of other raw material variants

Dry material-content of the dry biogas end product(1), Experimental settings(2), Dry material content(3), Control(4), *Fusarium* infected(5)

A felülúszó és szilárd fázis C-tartalma között nem volt kimutatható szignifikáns eltérés, míg a N-tartalom és S-tartalom a folyékony fázisba nagyobb arányban volt kimutatható (3. ábra).

A különböző kísérleti beállítások esetén vizsgáltuk a termelődött gázhozamokat. A kontroll és a *Fusarium* kukoricával beállított kísérletek gázhozam adatai között szignifikáns különbség volt (az 5%-os 2. kísérleti beállítás kivételével) (2. táblázat). A kontroll kísérletek $150\text{--}250\%$ -kal magasabb gázhozam adatokat produkáltak. A kapott eredmények alapján a *Fusarium*,

vagy az általa termelt toxinok gátló hatására következ-tethetünk. Az alkalmazott kukoricadara mennyisége nem befolyásolta a gázhozam adatokat.

3. ábra: Fermentlé S-tartalma az egyes receptúra variánsok esetén

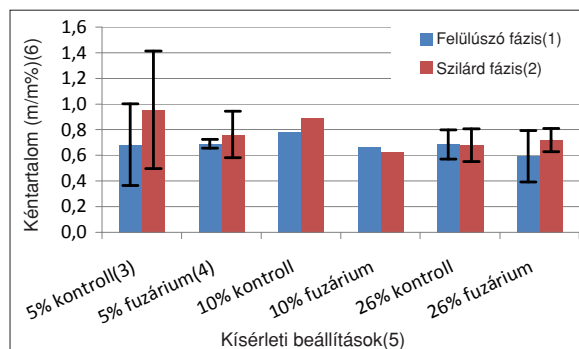


Figure 3: S-content of the biogas end product in case of other raw material variants

Liquid end product(1), Dry end product(2), Control(3), *Fusarium*(4), Experimental settings(5), S-content(6)

2. táblázat

A termelődött biogáz mennyisége

Kísérleti beállítások(1)	Gázhozam adatok (l/30 nap)(2)	
5%-os kontroll(3)	456,87	700,18
5%-os fuzáriumos(4)	201,18	700,45
10%-os kontroll	500,06	605,30
10%-os fuzáriumos	300,78	370,47
26%-os kontroll	568,00	700,29
26%-os fuzáriumos	298,43	200,96

Table 2: Biogas yields

Experimental settings(1), Biogas yields (liter/30 days)(2), Control(3), *Fusarium* infected(4)

A biogáz CH₄-tartalma a 26%-os (sza.%) fuzárium-mal fertőzött kukoricadarával beállított kísérlet esetén volt a legmagasabb (63 tf%), melyet elsősorban magasabb szárazanyag-tartalmának lehet tulajdonítani. A kén-hidrogén mennyisége követte ezt a tendenciát (3. táblázat). A termelődött ammónia mennyiségében nem mutatkozott szignifikáns különbség a kezelések hatására.

3. táblázat

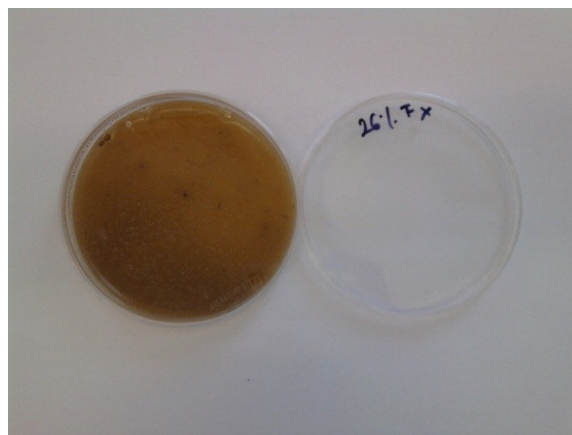
A biogáz átlagos minősége a laboratóriumi kísérletek során

Kísérleti beállítások(1)	Gázhozam adatok (l/30 nap)(2)	
5%-os kontroll(3)	456,87	700,18
5%-os fuzáriumos(4)	201,18	700,45
10%-os kontroll	500,06	605,30
10%-os fuzáriumos	300,78	370,47
26%-os kontroll	568,00	700,29
26%-os fuzáriumos	298,43	200,96

Table 3: The average biogas quality in case of laboratory experiments

Experimental settings(1), Biogas yields (l/30 days)(2), Control (average)(3), *Fusarium sp.*(4)

A biogáz kísérletek végén valamennyi fermentléből végeztünk táptalajos tenyésztést (2. kép) és mikroszkópos vizsgálatokat a *Fusarium sp.* jelenlétének igazolására. A gomba azonban egyik esetben sem volt kimutatható, illetve *Fusarium graminearum*ra jellemző makrokonídiumok és micéliumok jelenlétét nem sikerült igazolni.



2. kép: Papavisas táptalaj (26% fuzáriumos fermentlé)

Picture 2: Papavisas medium (*Fusarium* infected (26%) end product)

KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Fusarium graminearum-ra jellemző makrokonídiumok és micéliumok jelenlétét a fermentlé felülúszó és szilárd fázisában nem sikerült igazolni sem táptalajos tenyésztéssel sem mikroszkópos vizsgálatokkal. A kontroll és a fuzáriumos kukoricával beállított kísérletek eddigi gázhozam adatai között viszont szignifikáns különbség mutatkozott. Ezen megállapítások igazolására további kísérleteket állítunk be. A fermentorokban a hőáramlás és a felszálló buborékok miatt aktív keverés nélkül is kialakul bizonyos keveredés. Ez a passzív keveredés azonban nem minden alapanyag esetén elegendő, így szükséges speciális keverőegységek beépítése, mely biztosítja az alapanyagok minél hatékonyabb homogenizálását, ezáltal a gázképződés folytonosságát. A mérési eredmények és a kísérleti beállítások módosításából levont következtetések eredményeként egy FUZZY algoritmuson alapuló szabályozó (FLC-Fuzzy Logic Controller), szakértői szoftver modulal bővítjük a rendszert. Lényege, hogy egyrészt a fermentációs folyamat különböző fázisaiban biztosítsuk a mikroorganizmusok számára megfelelő kémhatást, másrésztől biztosítsuk az optimális hőmérsékletet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a Baross Gábor Program segítségével (REG_EA_KFI_09-POTOABIT) valósult meg. A laboratóriumi biogáz fermentációs rendszer vezérléstechnikai fejlesztéséért köszönetet mondunk Nyírcsák Miklósnak (Compair I st. Kft.).

IRODALOM

- Bíró Gy.–Mézes L.–Nyírcsák M.–Tamás J.–Borbély J. (2011): Anaerob fermentációs folyamatok automatizálási és vezérlési megoldásainak fejlesztése, Informatika a felsőoktatásban 2011 Konferencia. Debrecen. CD Kiadvány.
- Búza L.–M. Schill J. (2010): A mikotoxinok vizsgálati módszerei, eredményei, előfordulásuk a hazai takarmányokban. [In: Kovács M. (szerk.) Aktualitások a mikotoxin kutatásban.] MTA Állattenyésztési és Állathigiéniai Kutatócsoport. Kaposvár. 13–20.
- Kacz K.–Neményi M. (1998): Megújuló energiaforrások. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó. Budapest. 10. 144: 153.
- Mézes L.–Bíró T.–Hunyadi G. (2007): Sertésletelek biogáz-ellátásának egy lehetséges technológiai alternatívája. Országos Környezetvédelmi Konferencia és Szakkiállítás. 2007. 10. 15–17. Balatonfüred. Tanulmánykötet. MTESZ. Székesfehérvár. 68-76.
- Placinta, C.M.–D’Mello, J.P.F.–Macdonald, A.M.C. (1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 78. 1: 21–37.
- Szécsi Á.–Mesterházy Á. (1998): Szelektív táptalaj alkalmazása Fusariumok izolálására és azonosítására gabona- és kukoricaszemekből. *Növényvédelem*. 34. 2: 61–66.
- MSZ 6383:1998: Az élelmezési közönséges búza (*Triticum aestivum*) és a durumbúza (*Triticum durum*), valamint minden takarmányozási célú búza minőségi követelményei.
- MSZ 318-3:1979: Szárazanyag-tartalom meghatározása.

