Magas fehérjetartalmú ipari hulladékok anaerob fermentációjának fokozása adaptált mikrobaközösség segítségével

Ph.D. értekezés

Kovács Etelka

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél

Dr. Bagi Zoltán

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem TTIK

Biotechnológiai Tanszék

2014

Szeged

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés 8
2 Szakirodalmi áttekintés 11
2.1 Hidrolízis 13
2.2 Acidogenezis 14
2.3 Acetogenezis 14
2.3.1 Monoszacharidok fermentációja 15
2.3.2 Aminosavak fermentációja 15
2.3.3 Lipidek hidrolízise 17
2.4 Metanogenezis 19
2.5 Az acetogén és metanogén mikrobák közötti együttműködés 21
2.6 A mikroba konzorcium együttműködéséhez szükséges optimális körülmények 22
2.7 A fehérje alapú hulladékokról 23
2.8 A fehérje feldolgozásakor jelentkező problémák 24
2.9 Metagenomika 29
3 Célkitűzés 31
4 Anyagok és módszerek 32
4.1 Tápoldatok, táptalajok 32
4.2 Kevert természetes kultúra (oltóiszap) 33
4.3 Növényi eredetű konyhai hulladék 33
4.4 Mikroorganizmus törzsek 33
4.4.1 Pseudomonas fluorescens (DSM50090) típus törzs 33
4.4.2 Bacillus coagulans (DSM1) típus törzs 34
4.4.3 Bacillus subtilis (DSM10) típus törzs 34
4.5 Szárazanyag-tartalom meghatározás 34

4.6 Szervesanyag-tartalom meghatározás ... 35
4.7 Illékony szerves savak (VFA) mennyiségi meghatározása ... 35
4.8 Biogáz minőségi összetételének vizsgálata ... 35
4.9 Kénhidrogén-tartalom meghatározása ... 35
4.10 Ammóniumion tartalom meghatározás ... 35
4.11 Proteáz-aktivitásmérés ... 36
4.12 Szubsztrátként felhasznált anyagok tulajdonságai ... 37
4.13 DNS izolálás ... 37
4.14 DNS mennyiségi meghatározása qPCR segítségével ... 38
4.15 Szakaszos fermentáció ... 38
4.16 Rátáplálásos fermentáció ... 39
4.17 Folyamatos üzemű fermentáció ... 40
4.18 Metagenomikai analízis ... 41
5 Kísérleti eredmények és értékelésük ... 43
5.1 Szakaszos adaptációs kísérletek ... 44
5.1.1 Kazein szubsztrát vizsgálata ... 44
5.1.2 Sertésvér lebontása ... 46
5.1.3 Húskivonat ... 46
5.1.4 Növényi eredetű konyhai hulladék ... 46
5.2 Adaptált mikrobaközösség előállítása 5 literes rátáplálásos fermentorokban ... 47
5.2.1 Kazein lebontása 5 literes rátáplálásos üzemű fermentorokban ... 47
5.2.2 Sertésvér lebontása 5 literes rátáplálásos üzemű fermentorokban ... 54
5.3 Biogáztermelés fenntartása rátáplálásos üzemű fermentorokban ... 57
5.4 Léptéknövelő kísérlet ... 58
5.5 Folyamatos üzemű fermentációk ... 59
5.5.1 Húskivonat folyamatos üzemű fermentációja ... 59

5.5.2 Biogáztermelés fenntartása folyamatos üzemű fermentorokban - Fenntartási kísérletek húskivonattal 63
5.5.3 Növényi eredetű konyhai hulladék folyamatos üzemű fermentációja 64
5.6 Metagenomikai analízis 65
5.6.1 A metagenomika kivitelezése 65
5.6.2 A metagenomikai vizsgálatok eredménye a kiindulási mintákban 66
5.6.3 A metagenomikai vizsgálatok eredménye kazein alapanyagon 67
5.6.4 A metagenomikai vizsgálatok eredménye sertésvéren 70
5.6.5 A metagenomikai vizsgálatok eredménye húskivonat alapanyagon 72
5.6.6 A metagenomikai vizsgálatok eredménye növényi eredetű konyhai hulladékon 74
5.7 Fehérje bontó mikroba keverék elősegíti a biogáz termelést 76
5.7.1 Hozzáadott mikroba keverék hatásai a gázhozamra 77
5.7.2 Hozzáadott mikroba keverék hatása a szerves sav összetételre 78
5.7.3 Hozzáadott mikroba keverék hatása a proteáz aktivitásra 78
5.7.4 qPCR eredmények 79
5.8 Ipari alkalmazhatóság 81
6 Összefoglalás 83
7 Köszönetnyilvánítás 86
8 Irodalomjegyzék: 87

Ábrajegyzék

1. ábra: A biogázképződés vázlata 12
2. ábra: Példák az anaerob aminosav lebontásra 16
3. ábra: Az acetogenezis és metanogenezis jellemző reakciói 17
4. ábra: A ’modell’ növényi eredetű konyhai hulladék összetétele 33
5. ábra: A kísérletek során alkalmazott alapanyagok összetétele 37
6. ábra: 5 literes folyamatos üzemű fermentorok sematikus felépítése 40
7. ábra: Relatív enzimaktivitás változása a kazein fermentációja során 45
8. ábra: A különböző alapanyagok fermentációja során mért biogázhozamok, valamint az átlagos metánkoncentrációk 47
9. ábra: Az adaptáció során alkalmazott kazein mennyisége és a heti beadagolás ismétlésszáma 48
10. ábra: A hetente adagolt kazein fermentáció során keletkezett napi gázhozamok fluktuációja 48
11. ábra: Az 1 gramm fehérjéből termelt biogáz hozamok és a beadott fehérje mennyiség változása 49
12. ábra: A proteázaktivitás változása a bevitt kazein mennyiségének függvényében 51
13. ábra: Az összes szerves sav és a pufferkapacitás arányának változása a bevitt kazein mennyiségének függvényében 52
14. ábra: A szerves savak koncentrációinak változása a kazein fermentáció során 53
15. ábra: Az ammóniumion-koncentráció változása a fermentáció során 53
16. ábra: 1 gramm oTS vérből előállított biogáz mennyisége a beadott vér mennyiségének függvényében 55
17. ábra: Az enzimaktivitás változása a beadott vér mennyiségének függvényében 56
18. ábra: Az összes szerves sav és a pufferkapacitás arányának változása a beadott vér mennyiségének függvényében 56
19. ábra: Átlagos heti gázhozam-értékek a bevitt vér mennyiségének függvényében a fenntarthatósági kísérletek során 58
20. ábra: Biogázhozam-értékek 5 és 50 literes fermentorok esetében a bevitt vér mennyiségének függvényében 59
21. ábra: Átlagos heti gázhozam-értékek a bevitt húskiv. menny. függvényében 61
22. ábra: A szerves savak koncentrációinak változása a húskivonat fermentáció során 61

23. ábra: Az összes szerves sav és a pufferkapacitás arányának változása a húskivonat adaptálás és terhelés szakaszában 62
24. ábra: Az ammóniumion-koncentráció változása a húskivonat fermentáció folyamán 62
25. ábra: A heti átlagos biogázhozam értékek változása a beadott szubsztrát mennyiségének függvényében 64
26. ábra: A heti biogázhozam értékek változása a beadott szubsztrát mennyiségének függvényében 65
27. ábra: A kiindulási populáció leggyakoribb fajai és abundanciaértékeik 67
28. ábra: A kazein adaptáció során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten a Bacteria doménben 68
29. ábra: A kazein adaptáció során Archaea doménen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten 69
30. ábra: A vér adaptáció során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten 71
31. ábra: A vér adaptáció során az Archaea doménen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten 72
32. ábra: A húskivonathoz való adaptáció során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten 73
33. ábra: A húskivonat fermentációja során Archaea doménen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten 74
34. ábra: A növényi eredetű konyhai hulladék fermentációja során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten 75
35. ábra: A növényi eredetű konyhai hulladék anaerob lebontása során Archaea közösségen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten 76
36. ábra: A heti biogázhozam-változások a baktérium-keverék nélküli, valamint a baktérium-keverékkel leoltott fermentorokban 77
37. ábra: A proteáz aktivitás változása a baktérium-keverék nélküli, valamint a baktérium-keverékkel leoltott fermentorokban 79
38. ábra: A *Ps. fluorescens* sejtszám változása a fermentáció során 80
39. ábra: A *B. subtilis* sejtszám változása a fermentáció során 80
40. ábra: A *B. coagulans* sejtszám változása a fermentáció során 81
41. ábra: A kísérletek során vizsgált alapa. paraméterei szakaszos fermentáció során 83

Rövidítések jegyzéke

CTAB: cetil-trimetilammónium-bromid

DNS: dezoxiribonukleinsav

DSMZ: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

EJ: exajoule (10^{18} J)

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

LB: Luria-Bertani táp

Nm^3: normál m^3

Nml: normál ml

oTS: szerves szárazanyag

PCR: polimeráz láncreakció

ppm: megadja a rendszer millió (10^6) egységében az illető komponens mennyiségét ugyanazon egységben

qPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

TAE: Tris-ecetsav-EDTA puffer

VFA: illékony szerves sav

1 Bevezetés

A XXI. századi jóléti társadalmak energiafogyasztása rohamosan növekszik és ezzel egyidejűleg a környezet szennyezése kritikus méreteket öltött, a probléma megoldásán, illetve a szennyező anyagok jelentős csökkentésén komolyan el kell gondolkodnunk. A világ energiafelhasználása jelenleg éves szinten mintegy 220 EJ (DOE/EIA-0484, 2013). Ennek a hatalmas energiamennyiségnek napjainkban 78 %-át fosszilis energiahordozók felhasználásával fedezzük. A gazdaságosan kitermelhető készletek kimerülése azonban belátható időn belül bekövetkezik, ezért új lehetőségek után kell néznünk (Energia a Napból, 2013). A megújuló energia felhasználása előreláthatóan közel 50%-kal fog növekedni a következő 35 évben, azonban a jóslatok szerint ebből a biomassza-eredetű energia csupán 3 EJ/év lesz (DOE/EIA-0484, 2013). Jelenleg a biomassza-növények és a növényi alapú anyagok használata kerül előtérbe, amelyek ha nem is csökkentik a légkörbe jutó CO_2-ot, de legalább nem növelik a körforgásban lévő szén mennyiségét (Reményi, 2007). A biomassza energetikai hasznosítása segíthet a fosszilis energiahordozóktól való függés csökkentésében, azonban jelenlegi tudásunk alapján nem tudja azt teljesen kiváltani (Biomass Program, 2010). Az utóbbi húsz évben jelentősen mérséklődött ugyan a szén-dioxid kibocsátás, de a bázisévekhez képest a csökkenés éppen csak eléri a 6 %-ot (Reményi, 2007). Az Európai Unió 2020-ra előirányozta az üvegházhatást okozó gázok kibocsátásának 20 %-kal történő csökkentését, eközben a megtermelt energia szintén 20 %-t megújuló forrásokból kívánja fedezni (Federal waste management plan, 2006). Magyarország 14,65 % CO_2 emissziócsökkentést vállalt. Jelenleg ez a szám 7 % körül mozog, tehát sok tennivaló vár ránk a következő években.

Az 1970-es évektől ismétlődő energiaválságok rendszeresen figyelmeztetik az emberiséget, hogy új energiahordozók felé kell fordulnunk. Évtizedes, egyes esetekben évszázados múltra tekint vissza az alternatív energiahordozók kutatása és az ezek felhasználására módot adó technológiák kifejlesztése. Hazánkban a teljes energiafelhasználás összetételének alakulása kedvezőtlenebb az uniós átlagnál (2010. évben EU 27 átlag 20 %, Magyarország 17,4 %). Magyarország energiafüggősége az utóbbi években nőtt, hazánk a 62,5 %-os függőségi mutatója meghaladja az uniós átlagot (Nemzetgazdasági Tervezési Hivatal, 2013). Az oxigéntől elzárt körülmények között zajló lebontás és az ehhez kapcsolódó biogáz előállítás egy, a környezetvédelem szempontjából

kifejezetten vonzó módja a szerves hulladékok ártalmatlanításának. A biogáz előállítása számos környezetvédelmi probléma megoldásában nyújthat segítséget, így a hulladékkezelésben, a környezetszennyezés csökkentésében, valamint a széndioxid-semleges megújuló energia előállításában és a mezőgazdasági gyakorlatban a tápanyagok talajba való visszajuttatását tudja elősegíteni (Tafdrup, 1995). Az így előállított nyers biogáz – amelynek 1 m^3-e megközelítőleg 0,5 liter gázolajjal egyenértékű – tisztítás és dúsítás után számos felhasználási lehetőséget kínál, például használhatjuk fűtésre, elégethetjük gázmotorban és ezáltal elektromos áramot és hőt termelhetünk, vagy tisztítás után földgázhálózatba vezethetjük, ezt követően pedig járműveinket tankolhatjuk vele, vagy bármely olyan célra felhasználhatjuk, amire ma földgázt használnak (Tamás és Blaskó, 2008; Kovács és mtsai., 2014).

Az anaerob fermentációt alkalmazva azonos szinten tarthatjuk a szénkörforgásban jelenlevő anyagmennyiséget nem növelve ezáltal az üvegházhatású gázok kibocsátását, valamint a szaghatás is csökken ezáltal, mindeközben a növények számára fontos mikroelemek szabadulnak fel és válnak felvehetővé számukra, továbbá nem elhanyagolható előny, hogy a folyamat során megújuló energia hordozót tudunk előállítani. A megújuló energiahordozók számos előnyös tulajdonságuk miatt komoly előretörést mutatnak. Előállítási költségeik az utóbbi években nagymértékben csökkentek, de még így sem versenyképesek a fosszilis energiahordozókkal szemben (Reményi, 2007). A biogáz előre láthatóan jelentős bioüzemanyaggá fog válni a következő években, noha az ágazat még támogatásra szorul (DOE/EIA-0484, 2013). Az egész világnak, de különösen az olyan nagy fogyasztóknak érdeke a bioüzemanyagok kutatása és fejlesztése, mint az Európai Unió és az Amerikai Egyesült Államok (The Biomass Economy, 2002). A kutatások olyan technológiák kifejlesztésére irányulnak, melyekkel a biomasszát üzemanyaggá és értékes vegyipari alapanyagokká alakítják (Biomass Program, 2010).

Az anaerob lebontási folyamatok fő alapanyaga az állati trágya, közel egy milliárd tonna keletkezik évente csak az Egyesült Államokban (Kellogg és mtsai., 2000). A trágyához köthető üvegházhatású gázok kibocsátása jelentősen hozzájárul az USA mezőgazdasági szektorából származó összes üvegházhatású gázok mennyiségéhez, a teljes antropogén metán kibocsátás közel 8 %-át teszi ki (USEPA, 2000). Az anaerob fermentorban lejátszódó mikrobiológiai eseményeket csupán általánosságban ismerjük, de az esetek többségében kézben tudjuk tartani. A termofil és hipertermofil mikroorganizmusok a gyorsabb és alaposabb lebontás mellett az elfolyó anyag higiéniás

szempontból történő kezelését is elvégzik. A fermentációs maradék így könnyebben elhelyezhető és mezőgazdasági hasznosításra alkalmasabb formában kerül ki a fermentorból (Demirbas, 2008).

A kommunális szilárd hulladékok szerves részét szintén e folyamatok során lehet hatékonyan lebontani, ártalmatlanítani. Főként Európában folyamatosan növekszik azon biogázüzemek száma, amelyek energianövényeket is felhasználnak szubsztrátként. Ezekben az üzemekben az elsődleges cél a biogázelőállítás, csak másodlagos a szerves hulladékok ártalmatlanítása. A legtöbb biogáz fermentorban kofermentáció zajlik, az állati eredetű hulladékkal együtt számos szerves szubsztrátot bontanak le (Németországban átlagosan 4-7 alapanyag kofermentációja zajlik minden biogáz üzemben). Mindez számos előnnyel jár: stabilizálja a biogáztermelő konzorcium működését, nem lépnek fel „hiánybetegségek", ezzel magasabb biogázhozam és metántartalom érhető el. Az előnyök ellenére a potenciálisan felhasználni kívánt alapanyagok keverékeinek a fermentációra gyakorolt hatását nehéz előre meghatározni. A szubsztrátok anaerob átalakítása egy dinamikus, többlépéses folyamat, amely során fizikokémiai és biokémiai reakciók futnak párhuzamosan a biológiai rendszert felépítő mikrobák között lezajló kölcsönhatások eredményeként. A komponensek közötti nagyon kényes egyensúly határozza meg a fermentor stabilitását és végső soron a teljes energiamérlegét, valamint a rendszer lebontási hatékonyságát. Napjainkban még gyakran előfordul, hogy nem rendelkezünk elegendő információval a legalapvetőbb szubsztrátok hatásáról sem. Ez a helyzet a fehérjékkel, illetve a fehérjében gazdag komplex alapanyagokkal is. Ezek az energiagazdag anyagok évtizedek óta mellőzöttek a biogáz kutatásban és előállításban, mivel anaerob ártalmatlanításukhoz a rendszer folyamatos monitorozására, nyomonkövetésére van szükség.

Dolgozatomban az alternatív energiatermelési módok egyik lehetőségét – és ezzel egy időben a világszerte egyre nagyobb mennyiségben keletkező szerves hulladékok környezetbarát ártalmatlanításának egyik fajtáját, az anaerob biodegradációt és a fehérje alapú biomasszából való biogáz előállítást kívánom bemutatni.

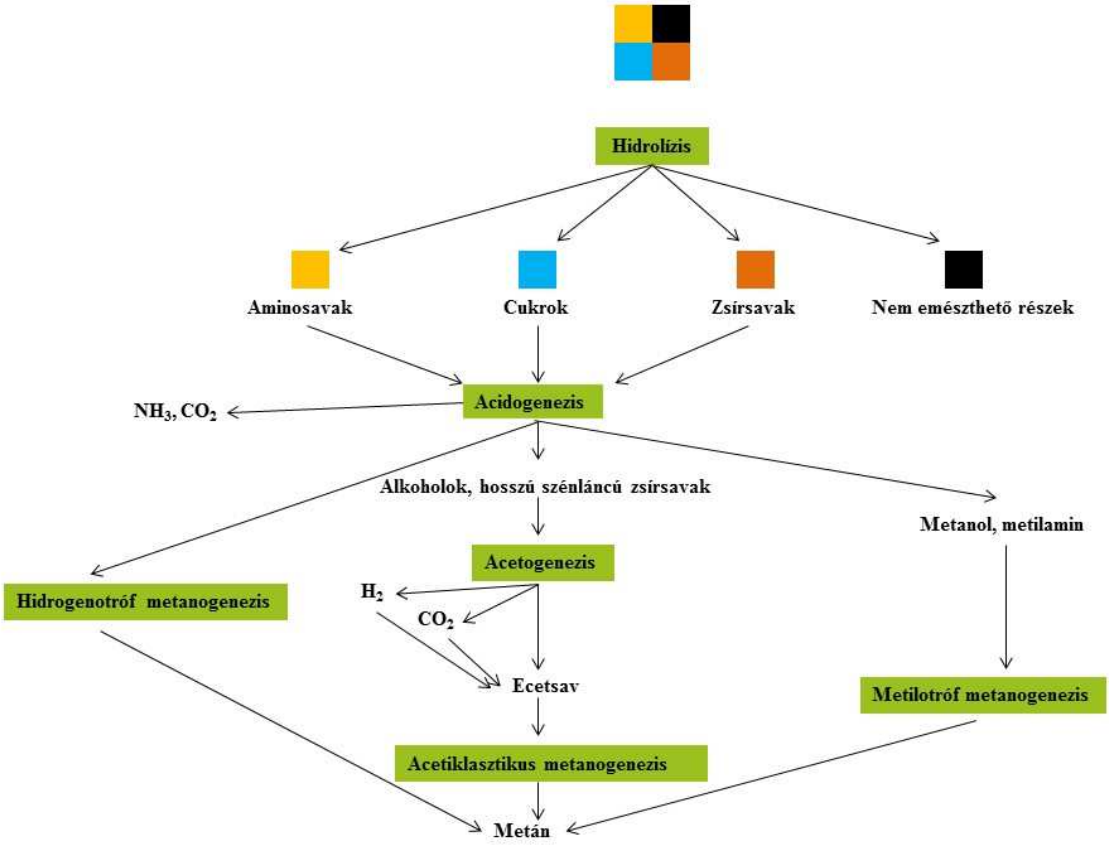
2 Szakirodalmi áttekintés

Évente több milliárd tonna mezőgazdasági, ipari és háztartási hulladék keletkezik világszerte. A kezeletlen szerves hulladékok nagymértékben szennyezik a környezetet és egyben kihasználatlan energiát is jelentenek. A természetben végbemenő, kontrollálatlan anaerob lebontás során metán is kerül a légkörbe, amely a szén-dioxidnál 23-szor nagyobb mértékben járul hozzá az üvegházhatáshoz (Chynoweth és mtsai., 2001, Holm-Nielsen és mtsai., 2009). A szabályozott keretek között megvalósuló biogáz termeléssel kapcsolt anaerob szervesanyag kezelés számos környezetvédelmi és közegészségügyi előnnyel jár.

A biogáz előállításáért négy (egyes szakirodalmak szerint három) fő csoportba sorolható mikrobiológiai tevékenység felelős (hidrolízis, acidogenezis, acetogenezis, metanogenezis) (Demirbas, 2008). Ezek egymásra épülnek, természetes körülmények között elválaszthatatlanok (Bai és mtsai., 2005; Kovács és mtsai., 2014). Ebben áll tanulmányozásuk nehézsége is, nehezen határozható meg, milyen feladatot lát el egy-egy faj az összetett rendszerben.

A biogáz fermentáció lényegét tekintve szerves anyagok anaerob konverziója szervetlen elektronakceptorok hiányában (pl. szulfát, nitrát, oxigén) (Rosenzweig és Ragsdale, 2011). A biogáz az alkalmazott szubsztrát összetételétől függően 50-70 % metánt, 28-48 % szén-dioxidot és 1-2 % egyéb gázt (kénhidrogén, nitrogén, hidrogén) és vízgőzt tartalmaz (Mitchell és Gu, 2010). A nyers biogáz fűtőértéke 50-70 %-a a földgázénak, mivel a földgáz legnagyobb részben metánból áll. A szén-dioxid és az egyéb összetevők eltávolításával ez az érték olyannyira megnövelhető, hogy tisztítás után a földgázzal gyakorlatilag megegyező fűtőértékű gázt kapunk, amit biometánnak is szokás nevezni (Bai és mtsai., 2005). A biogázból előállított elektromos vagy hőenergia kiválóan alkalmas a nagy mennyiségű lebontható szerves anyagot termelő mezőgazdasági létesítmények, szennyvíztelepek és magas energiaigényű technológiák (pl. szeszipar) energiaigényének fedezésére. A biogáz elégetése során ugyan jelentős mennyiségű szén-dioxid kerül a légkörbe, de ez – mivel biomassza eredetű – nem növeli meg a körforgásban lévő szén mennyiségét. A fermentáció során visszamaradó anyag pedig biotrágyaként visszajuttatható a szántóföldekre. Így amellett, hogy kiválóan javítja a terméshozamot, nem terheli meg felesleges nitrogénnel és foszforral a környezetet, nem jelent közegészségügyi veszélyt, továbbá a kihelyezés szempontjából az is fontos, hogy sokkal homogénebb szerkezetű, mint például az almos istállótrágya (Al Seadi, 2002; Bai és mtsai., 2005; Holm-Nielsen és mtsai., 2009).

Terminális elektronakceptor, mint például oxigén, szulfát, nitrát vagy fémionok hiányában a szerves anyagok elsődleges lebontási útvonala számos ökoszisztémában a metán termelés (Conrad és mtsai., 1989; Sekiguchi és mtsai., 2001). A biológiai metántermelés során a mikrobiológiai folyamatok egymásra épülnek, mivel a fermentációban szerepet játszó mikroorganizmus csoportok lebontási termékei szubsztrátként szolgálnak egy másik csoport számára. Ilyen módon egy rendkívül összetett metabolikus hálózat alakul ki a mikrobák között. A biogáz képződés nagyon egyszerűsített modellje a 1. ábrán látható. A lebontási folyamat egyensúlyának biztosítása szempontjából fontos, hogy a különböző biológiai átalakítási folyamatok megfelelően kapcsoltak maradjanak, így kerülhető el, hogy valamely intermedier felhalmozódjon a rendszerben (McCarty és Smith, 1986; Pavlostathis és Giraldo-Gomez, 1991; Batstone és mtsai., 2002; Gerardi, 2003; Bai és mtsai., 2005; Batstone és Jensen, 2011; Mitchell és Gu, 2010).



1. ábra: A biogázképződés vázlata.

(McCarty és Smith, 1986; Pavlostathis és Giraldo-Gomez, 1991; Batstone és mtsai., 2002; Gerardi, 2003; Bai és mtsai., 2005; Batstone és Jensen, 2011; Mitchell és Gu, 2010 alapján, módosítva)

2.1 Hidrolízis

A komplex szerves vegyületek anaerob lebontásakor a hidrolízis kifejezés a depolimerizáció és szolubilizáció számos különböző válfaját jelenti. A folyamat kezdetén az összetett polimer molekulák (szénhidrátok, fehérjék, zsírok) oligomerekké, majd monomerekké alakulnak, így a vizes fázisba jutnak (Gerardi, 2003; Rosenzweig és Ragsdale, 2011). Általában a biomassza legnagyobb részét cellulóz alkotja, e mellett jelentős mennyiségű keményítő és lipid található. A biokémiai reakciók többsége, például a szénhidrátok, polipeptidek, trigliceridek és a nukleinsavak lebontása valódi hidrolitikus folyamat, míg más esetekben, például a diszulfid hidak bontása reduktív vagy oxidatív biotranszformációnak számít (Sevier és Kaiser, 2002). A hidrolízist limitáló tényezőnek tekintjük darabos szubsztrátok esetében (pl. trágya, kukorica maradványok). A növényi rostok cellulózból, hemicellulózból és ligninből állnak, ezek lebonthatóságát a struktúrájuk és összetételük határozza meg: a magas lignin tartalmú anyagok pl. fa csak nagyon hosszú idő alatt emészthető, míg viszonylag könnyen hidrolizálható a ligninben szegényebb szalma (Tong és mtsai., 1990).

Az egyik leggyakoribb összetett szubsztrát a szennyvíztelepekről származó „eleven iszap”, amely a lebontást végző mikroorganizmusok és a bontani kívánt, illetve már bomló anyagok keverékét tartalmazza (Ekama és mtsai., 2007). Fehérjék és lipidek általában együtt találhatók meg a szennyvizekben (pl. húsipar, tejipar). A fehérjék bonthatósága erősen függ a szerkezetüktől, a részben vízoldékony globuláris fehérjék gyorsabban emészthetőek, míg a fibrilláris fehérjék nehezebben hidrolizálhatóak (McInerney, 1988). A lipidek jelentős része triglicerid, amelyeket a lipázok és egyéb észter kötéseket hasító enzimek támadnak meg. A lipid hidrolízis sebessége kevésbé függ a kémiai tulajdonságaiktól, azonban meghatározó lehet a részecskeméret és a környezeti tényezők, mint például a pH, illetve a felületi feszültség (Rosenzweig és Ragsdale, 2011).

A lebontási folyamatok elindítói olyan baktériumok, amelyek obligát vagy fakultatív anaerobok. Ezek a mikroba csoportok felelősek a fermentorokba esetlegesen bekerülő oxigén eltávolításáért is. A mikroközösség hatékonyságának egyik sebesség meghatározó lépése a kezdeti lebontás (Zeikus, 1977; Mitchell és Gu, 2010). A keletkező termékek nem csak a hidrolizálók szükségleteit elégítik ki, hanem elegendő mennyiségben állnak rendelkezésre a következő mikroba csoport, az acetogének számára is.

2.2 Acidogenezis

A lebontási folyamat második szakaszában az acidogén mikroorganizmusok a hidrolízis eredményeként a lebontási folyamatba belépett biomasszát bontják tovább (http://www.fao.org/documents/en/Rural%20infrastructure%20and%20agro-industries/topicsearch/9). Ezek a baktériumok részt vesznek a fermentorok kémhatásának kialakításában, miközben NH_3, H_2, CO_2, H_2S, továbbá az előzőeknél rövidebb szénláncú zsírsavak és alkoholok keletkeznek. A vegyületek többsége még mindig túlságosan nagy méretű a metanogének számára, így belépnek az anaerob lebontás következő szakaszába.

2.3 Acetogenezis

Azokat az oligo- és monoszacharidokat, szerves savakat (zsírsavak, aminosavak), amelyeket a hidrolizáló mikrobák nem használtak fel, az acetogén baktériumok tovább alakítják. Ezek az obligát vagy fakultatív anaerob mikroorganizmusok rövid láncú szerves savakat, ún. illékony szerves savakat (pl. ecetsav, propionsav, vajsav), alkoholokat, aldehideket és ketonokat, valamint szén-dioxidot és hidrogént állítanak elő. Az acetogén mikrobák rendkívül diverz csoportot alkotnak, sokféle tápanyagot képesek hasznosítani, ami a túlélési esélyeiket lényegesen megnöveli. Emellett igen ellenállóak a környezet káros hatásaival szemben és gyorsabban szaporodnak, mint a metanogének (Gerardi, 2003; Bai és mtsai., 2005). A homoacetogének szigorúan anaerobok és lebontási folyamatuk elsősorban az acetil-koenzimA útvonal, amely során koenzimA-ból acetil-koenzimA-t képesek előállítani.

A szerves savakat és az alkoholokat acetáttá alakítják a hidrogéntermelő acetogének. Az acetogén mikroorganizmusok erősen függnek a metanogénektől, mert az általuk termelt hidrogén a zárt rendszerben gátolja az anyagcseréjüket. A metanogének pedig az acetogén metabolizmus termékeire hagyatkoznak. A kapcsolt vagy szintrópikus kapcsolatot a hidrogéntermelők és -eltávolítók között „fajok közötti hidrogén transzfer”-nek nevezzük. Az acetogén szervezetek a biogáztermelő rendszerekben igen fontos szerepet töltenek be, mivel a metanogéneknek redukálószerként hidrogént, tápanyagként pedig szerves savakat, elsősorban acetátot, kisebb mennyiségben pedig pedig propionsavat és vajsavat termelnek, ezen kívül felelősek az alacsony redoxpotenciál kialakításáért. Az acetogének működését azonban gátolja a túl sok hidrogén, ezért fontos, hogy a metanogének gyorsan elfogyasszák azt (Demirbas, 2008).

A két mikrobacsoport közötti számottevő szaporodási rátában megmutatkozó eltérések még kényesebbé teszik a köztük lévő egyensúlyt (Batstone és mtsai., 2002).

2.3.1 Monoszacharidok fermentációja

A monoszacharidok lebontása talán a legáltalánosabb a fermentáció során. Tiszta kultúrában a lebontás folyamata és a képződő termékek skálája már jól tanulmányozott, különösen az iparban előszeretettel használt mikroorganizmusok esetében. Azonban a kevert kultúrákat tartalmazó fermentációk esetében – bár az alapvető útvonalakat már feltárták – az a folyamat, amelynek végén a kevert termékskála kialakul kevésbé jól ismert (Batstone és mtsai., 2002; Temudo és mtsai., 2008). A monoszacharidok lebontása Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) vagy Entner-Doudoroff (ED) útvonalon zajlik, ezt követően C3-as termékekké (tejsavvá és propionsavvá) vagy C2/C4/C6 termékekké alakul (ecetsav, vajsav, propionsav, kapronsav) acetil-koenzimA-n keresztül.

2.3.2 Aminosavak fermentációja

Az acetogenezis során létrejövő termékek többsége a glükóz metabolizmusa során, piroszőlősav köztiterméken keresztül keletkezik (Zeikus, 1977; Demirel és Yenigün, 2002). Az acetogének számára azonban az aminosavak is szolgálhatnak szén- és energiaforrásként. Az alacsony szénatomszámú aminosavak és különféle aromás komponensek legnagyobb részben az ún. Stickland-fermentáció során jönnek létre (2. A ábra) (Rosenzweig és Ragsdale, 2011).

A folyamatban az egyik aminosav elektrondonorként viselkedik (a termék egy szénatommal rövidebb lesz a kiindulási aminosavnál), egy másik aminosav pedig az elektronakceptor szerepét tölti be (a termék a kiindulási aminosavval megegyező szénatomszámú marad). A teljesen kapcsolt reakciókban a nettó hidrogén képződés gyakorlatilag nulla (Gottschalk, 1986; Hallenbeck, 2009). A reakcióban ammónia és szén-dioxid is keletkezik, kéntartalmú aminosavak lebontása esetén pedig kénhidrogén termelődik. Illékony szerves savak az aminosavak reduktív deaminációjával is létrejöhetnek (2. B ábra). Ezek a folyamatok termodinamikailag azonban csak akkor lehetségesek, ha egy hidrogént felhasználó metanogén reakcióval kapcsoltak (Ramsay és Pullammanappallil, 2001). Az olyan esetekben, amikor a hidrogén koncentráció alacsony és az energetikai feltételek lehetővé teszik, az aminosavak nem páros oxidációja is lejátszódhat (Stams, 1994).

A)	$C_6H_{13}O_2N$ (Leu)+$2H_2O$ → $C_5H_{10}O_2$(3- metil-vajsav)+NH_3+CO_2+$2H_2$+ATP $C_6H_{13}O_2N$ (Leu)+H_2 → $C_6H_{12}O_2$(4-metil-valeriánsav)+NH_3 $C_3H_7O_2N$ (Ala)+$2H_2O$→ $C_2H_4O_2$(ecetsav)+CO_2+NH_3+$4H^+$+$4e^-$ $2C_2H_5O_2N$ (Gly)+$4H^+$+$4e^-$→$2C_2H_4O_2$(ecetsav)+$2NH_3$
B)	$C_4H_9O_3N$ (Thr)+H_2O → $C_3H_6O_2$(propionsav)+NH_3+CO_2+H_2+ATP

2. ábra: Példák az anaerob aminosav lebontásra. A leucin, az alanin és a glicin Stickland-fermentációja (A) és a treonin reduktív deaminációja (B) (Ramsay és Pullammanappallil, 2001)

A szorosabb értelemben vett acetogén törzsek az „elektron elnyelőként” szolgáló szerves intermediereket (pl. propionsav, vajsav, etanol) ecetsavvá, hangyasavvá, szén-dioxiddá és hidrogénné alakítják (3. ábra, 1-3. egyenlet). Az anaerob fermentorokban ún. homoacetogén törzseket is találunk, amelyek hidrogénből és szén-dioxidból képeznek ecetsavat. Ezek a konverziós folyamatok fontos szerepet játszanak a sikeres biogáz termelésben, mivel a szén-dioxid és hidrogén mellett kizárólag az ecetsav, a hangyasav, valamint egyes alkoholok (metanol) és nitrogéntartalmú vegyületek (metilamin) használhatók fel közvetlenül a metanogének számára (Gerardi, 2003; Mitchell és Gu, 2010).

Reakció típusa		Szabadenergia- változás $\Delta G^{0,}$ (kJ)
Acetogén reakciók		
Propionsav (1.) $CH_3CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow$	Ecetsav $CH_3COOH + CO_2$	+ 76,1
Vajsav (2.) $CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow$	Ecetsav $2CH_3COOH + 2H_2$	+ 48,1
Etanol (3.) $CH_3CH_2OH + H_2O \longrightarrow$	Ecetsav $CH_3COOH + 2H_2$	+ 9,6
Metanogén reakciók		
Ecetsav (4.) $CH_3COOH + 2H_2O \longrightarrow$	Metán $CH_4 + CO_2 + H_2O$	-31,0
Szén-dioxid + hidrogén (5.) $CO_2 + 4H_2 \longrightarrow$	Metán $CH_4 + 2H_2O$	-135,6
Szintrópikus reakció		
Vajsav (6.) $2CH_3CH_2CH_2COOH + 4H_2O \longrightarrow$	Ecetsav $4CH_3COOH + 4H_2$	+ 96,2
Szén-dioxid + hidrogén (7.) $CO_2 + 4H_2 \longrightarrow$	$CH_4 + 2H_2O$	-135,6
	Nettó reakció:	**-39,4**

3. ábra: Az acetogenezis és metanogenezis jellemző reakciói (Mitchell és Gu, 2010)

2.3.3 Lipidek hidrolízise

Az anaerob fermentorokban lipidek is előfordulnak, általában zsírok és olajok formájában. Ezek az anyagok a kezeletlen szennyvíz szerves anyagának akár 30 %-át is kitehetik (Novak és Carlson, 1970).

A zsírsavak a glicerinnel glicerideket alkotva képezik a természetes zsírokat és olajokat. Zsírsavakat a természetben, állati és növényi szervezetekben találunk, nagy többségben kötött állapotban észterek (gliceridek) alkotórészeként (Nelson és mtsai., 2008). A trigliceridek jelentős része az élelmiszeriparból – főképpen a húsfeldolgozó

iparból – származik (Broughton és mtsai., 1998). A lipideket csoportosíthatjuk a zsírsav lánc hossza, a telítettség foka (kettős kötések száma) és fizikai tulajdonságaik alapján.

A hidrolízis mértéke erősen függ a kémiai karaktertől; a hosszú szénláncú zsírsavak esetében minél több a kettős kötés, a gyengébb vízoldékonyságuk miatt annál lassabb a lebontásuk (Novak és Carlson, 1970; Nelson és mtsai., 2008). A lipid-gazdag hulladékok anaerob úton történő lebontását erősen befolyásolja, hogy vízzel nem, vagy csak kis mértékben elegyednek. A felületi feszültség csökkentése érdekében vízben a legkisebb felszínnel rendelkező formát veszik fel, ezzel is lassítva lebontásukat (Gujer és Zehnder, 1983). A hosszú szénláncú zsírsavak felhalmozódása a fermentorokban gátolja az anaerob lebontási folyamatot (Angelidaki és Ahring, 1992; Lalman és Bagley, 2000; Lalman és Bagley, 2001; Nielsen és Ahring, 2006). A trigliceridéket a mikrobák észter kötéseket bontó enzimeikkel (pl. lipázok, észterázok) glicerinné és zsírsavakká bontják (Pavlostathis és Giraldo-Gomez, 1991). A glicerin lebontásának eredményeként illékony zsírsavak, hangyasav és alkoholok képződnek (Broughton és mtsai., 1998), míg a hosszú szénláncú zsírsavak elsődleges lebontási útvonala a β-oxidáció (Jeris és McCarty, 1965). Ennek terméke ecetsav és hidrogén (Hanaki és mtsai., 1981).

Összegzésként elmondható, hogy több teoretikus megközelítés alakult ki, hogyan lehet előre megjósolni az alapanyagok kémiai összetételének és a mikrobák élettevékenységének figyelembevételével a keletkező biogáz mennyiségét, illetve a fermentor stabilitását (Symons és Buswell, 1933; McCarty, 1972). A legújabb megközelítések sokkal komplexebb modelleket tartalmaznak, amelyek a biokémiai és fiziko-kémiai reakciókat szimulálják, és előre jelzik a főbb átmeneti és végtermékeket (Angelidaki és mtsai., 1999; Batstone és mtsai., 2000). Az általános kémiai formulát használva a szénhidrátokból ($C_6H_{10}O_5$) 0,42 Nm^3 CH_4/kg oTS, a fehérjékből ($C_5H_7O_2N$) 0,50 Nm^3 CH_4/kg oTS és a lipidekből ($C_{57}H_{104}O_6$) 1,01 Nm^3 CH_4/kg oTS lehet a maximális metánkihozatali érték (Symons és Buswell, 1933). Függetlenül az elméleti háttérből adódó különbségektől, maguknak a módszereknek a pontossága erősen függ a szubsztrát összetétel minél pontosabb meghatározásától, különös tekintettel a biológiai úton lebontható frakcióra. A szakaszos tesztekkel képesek vagyunk nagy pontossággal előre jelezni a lebontás maximális hatékonyságát, míg a félfolyamatos fermentorokkal már jól modellezhetőek bizonyos üzemi paraméterek hatásai (hőmérséklet, keverési sebesség, betáplálás gyakorisága, retenciós idő változtatása) a gázhozamra.

2.4 Metanogenezis

A metanogén archaea csoport szigorúan anaerob euryarchaeoták egyik, filogenetikailag diverz csoportját alkotják; metabolizmusuk szén-dioxidból és hidrogénből, hangyasavból, metanolból, metilaminokból, illetve ecetsavból metán előállítására korlátozódik. A sejtfaluk pszeudomureint tartalmaz, ezért antibiotikum rezisztensek. A membránjukban nincs zsírsav észter, ennek következtében nem tudnak cukrot felvenni, tehát át kell alakítani számukra, amit az acetogének végeznek el (Bai és mtsai., 2005). Fontos tulajdonságuk még, hogy lassan szaporodnak és rendkívül érzékenyek a környezet különböző hatásaira. Ez azzal magyarázható, hogy a biokémiai folyamataik során kevés energia szabadul fel és viszonylag kevés szubsztrátot képesek hasznosítani (Gerardi, 2003). Korlátozott metabolizmusuk ellenére ezek az organizmusok nagy jelentőséggel bírnak a globális szénkörforgásban - közel egy gigatonnára tehető az anoxikus körülmények között pl. élővizek üledékrétegeiben, mocsarakban, rizsföldek vízzel elárasztott részein, valamint a kérődzők és termeszek tápcsatornájában élő metanogének által termelt metán mennyisége (Thauer és mtsai., 2008).

A metanogének a hasznosított szubsztrát szempontjából három fő csoportba sorolhatók. Az acetotróf vagy acetoklasztikus metanogének ecetsavból, a hidrogenotróf metanogének szén-dioxidból és hidrogénből (3. ábra, 4-5. egyenlet) állítják elő a szén legredukáltabb formáját, a metánt és részben a legoxidálabb formát a szén-dioxidot. A harmadik csoportot a metilotróf metanogének képezik, amelyek tevékenységük során a metanol és a metilaminok metilcsoportját alakítják metánná (Gerardi, 2003; Chen és mtsai., 2008). A hidrogenotróf metanogének a hidrogénből származó elektronok terminális akceptoraként a szén-dioxidot használják fel. A hidrogenotrófok felelősek azért, hogy a hidrogén koncentrációja alacsony (10^{-8} és 10^{-5} M közötti) maradjon a rendszerben. A hidrogénből való metántermelés folyamán több energia szabadul fel, mint az acetoklasztikus reakció során (3. ábra, 4-5. egyenlet). Ennek ellenére az irodalomban általánosan elterjedt vélemény szerint biogáz fermentáció során képződő metán mintegy 50-70 %-a ecetsavból keletkezik, a *Methanosarcina* és a *Methanosaeta* nemzetségekbe tartozó törzsek munkájának eredményeképpen. Ennek oka, hogy a hidrogén limitált mennyiségben áll rendelkezésre. Az acetotróf metanogenzis során szén-dioxid is

keletkezik, amelynek egy részét a hidrogenotróf törzsek képesek továbbalakítani metánná (Sekiguchi és mtsai., 2001; Gerardi, 2003; Yadvika és mtsai., 2004; Bai és mtsai., 2005).

A metanogén archaeák öt rendjét azonosították eddig: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, valamint *Methanosarcinales*. Az ősi élőlények közül a legősibb ezek közül a *Methanopyrales*, a legújabb ágat pedig a *Methanosarcinales* rend alkotja. Ez utóbbi csoport összes tagja rendelkezik citokrómokkal és metanofenazinnal (funkcionális menakinon analóg), valamint a szubsztrátok széles spektrumát képesek felhasználni. A többi rendszertani csoportban nincsenek jelen sem a citokrómok, sem metanofenazin, továbbá a metánt a CO_2 redukálásával állítják elő többnyire hidrogén felhasználásával, de némely faj a hangyasavat is fel tudja használni elektrondonornak. Az előbbieken kívül a citokrómokkal nem rendelkezőkre az is igaz, hogy kedvező számukra, ha a H_2 parciális nyomása kisebb 10 Pa-nál. Osztódási idejük egy óránál is hosszabb lehet és számos fajuk hipertermofil (Thauer és mtsai., 2008). Az optimális szaporodáshoz és metán produkcióhoz a metanogéneknek több további tápanyagra és nyomelemre is szükségük van. Minden metanogén ammóniát használ nitrogén forrásként és mindnek szüksége van nikkelre, kobaltra valamint vasra. Ezek közül bármelyiknek a hiánya súlyosan befolyásolja, limitálja a biogáz képződését (Jarrell és Kalmokoff, 1988). Amennyiben a nitrogén NH_4^+ formájában, a foszfor pedig PO_4^{3-} formájában van jelen, az elősegíti a magasabb metán-termelést. Néhány kutató fontosnak tartja, hogy olyan nyomelemeket juttassanak a rendszerbe, amelyek szükségesek a metanogének növekedéséhez. Ezt úgy érhetjük el, hogy szelént, molibdént, magnéziumot, alumíniumot és bórt is adagolunk a biogáz reaktorba bevitt szubsztráthoz (Brummeler és mtsai., 1985; Yang és Okos, 1987). A metanogének növekedése vitaminokkal is elősegíthető (Jarrell és Kalmokoff, 1988).

A másik fontos környezeti faktor a rendszer kémhatása (Brummeler és mtsai., 1985; Jain és Mattiasson, 1998). Az irodalomban nagyon eltérő adatok jelentek meg a pH-optimummal kapcsolatban. Huser és mtsai. (1982) a *Methanosaeta*-k pH-optimumát pH=7,4-7,8 között állapították meg, míg Brummeler (1985) szerint a sejtek aktivitása nem változik pH= 6,8 - 7,8 között sem. A *Methanosarcina*-k viszonylag széles pH tartományban képesek életben maradni (pH=6,0-8,0), de pH=7,0 az optimális számukra. Brummeler (1985) kutatásai szerint azonban a sejtek sikeresen túlélik a pH=5,0 értéket is.

Az ecetsavból történő metán előállítást szigorúan anaerob folyamatnak tartjuk; a rövid ideig tartó oxigénnel való találkozás még nem letális, azonban a szaporodás és a

metán-termelés csak anaerob körülmények között zajlik le (Huser és mtsai., 1982). Fetzer és Conrad (1993) kutatásai azt mutatták, hogy 0,5 %-nál magasabb oxigén koncentráció azonnal gátolja a metán-termelést a *Methanosarcina barkeri* sejteknél. Ha 0,05-0,1 % oxigént juttatunk a rendszerbe, 0,5-2 órán belül bekövetkezik a gátlás, ha azonban az oxigén-koncentráció 0,005 % alatt marad, akkor nem okoz problémát.

A metán termelés egyenes összefüggést mutat a sejtek szaporodásával és ecetsav felhasználásukkal (Zeikus és mtsai., 1975). Gyakori módszer a metanogén sejtek szaporodásának nyomon követésére, hogy a termelt metán mennyiségét mérik (Yang és Okos, 1987). A metántermelés és az ecetsavfogyás között közvetlen kapcsolat van: körülbelül egy mol ecetsavból egy mol metán keletkezik (Zehnder és mtsai., 1980).

Huser és mtsai. (1982), valamint Patel (1984) kutatásai igazolták, hogy a *Methanosaeta soehngenii* és *Methanosaeta concilii* által termelt metán koncentrációja függ a kiindulási ecetsav-koncentrációtól, de csak akkor, ha az kevesebb, mint 10 mM (0,6 g/l). Ha a kezdeti acetát-koncentráció 5 mM, akkor a *M. concilii* metántermelése a 10 mM acetát-koncentrációhoz képest 40 %-kal visszaesik. A folyamatos növekedés és szaporodás fenntartásához a tápközegnek 70-80 mM ecetsavat kell tartalmaznia, így 60 mmol CH_4/l feletti koncentrációt értek el 35°C-os inkubációt alkalmazva (Patel, 1984).

2.5 Az acetogén és metanogén mikrobák közötti együttműködés

Amint ezt korábban röviden említettem az acetogének jelentősége abban áll, hogy a metanogének számára ecetsavat és redukálószerként hidrogént termelnek, így hozzájárulnak a redoxpotenciál lecsökkentéséhez. Azonban az acetogének is függenek a metanogénektől, mivel a hidrogén magas parciális nyomása gátolja az acetogének tevékenységét. Tehát ha az ecetsavat és hidrogént nem fogyasztják el a metanogének, akkor a felhalmozódó szerves savak lecsökkentik a közeg pH-ját. Ez a savas pH-ra érzékeny metanogének pusztulásához vezet, így végső soron a biogázfermentáció leállását eredményezi. A hidrogéntermelő és hidrogént fogyasztó törzsek tehát kölcsönösen egymásra utaltak, ún. szintrópikus kapcsolatban vannak. A közelség legtöbbször fizikai kapcsolódást is jelent: az acetogének és metanogének gyakran makroszkopikus granulumokat alkotnak (Schnürer és mtsai., 1999; Gerardi, 2003; Yadvika és mtsai., 2004; Bai és mtsai., 2005).

Szintrópikus hálózatok hiányában bizonyos szerves savak (pl. propionsav, vajsav) degradációja nem lenne kivitelezhető, mivel a lebontási reakció első lépése endergonikus (3. ábra, 6. egyenlet). A folyamat akkor válik termodinamikailag lehetségessé, ha a reakció egy acetoklasztikus és egy hidrogenotróf metanogén reakcióval kapcsolt (3. ábra, 4. és 7. egyenlet) (Sekiguchi és mtsai., 2001). A propionsav hasítása során először ecetsav és metán keletkezik egy acetogén (*Syntrophobacter wolinii*) és egy metanogén törzs közreműködésével. A következő reakcióban egy metanogén törzs az ecetsavból további metánt és szén-dioxidot állít elő. A teljes folyamat azonban csak akkor képes végbemenni, ha a metanogenezis megfelelően működik, azaz a fermentációs folyadék hidrogén és hangyasav koncentrációja alacsony. A rendszerben felhalmozódó propionsav és vajsav tehát képes jelezni, ha a fermentáció nem az optimális biogáz termelés felé tolódik el (Gerardi, 2003; Nielsen és mtsai., 2007; Yen és Brune, 2007; Krause és mtsai., 2008).

2.6 A mikroba konzorcium együttműködéséhez szükséges optimális körülmények

A fermentációt számos tényező befolyásolja, melyek közül az egyik legfontosabb a hőmérséklet. A mezofil metanogének hőmérséklet-optimuma 35-40°C, míg a termofiloké 50-60°C. A mikroorganizmusok aktivitása, és így a biogáz produkció is jelentősen visszaesik 40 és 50°C között, illetve fokozatosan csökken 0 és 35°C között (Demirbas, 2008).

Az acetoklasztikus metanogének csoportjába elsősorban mezofil törzsek tartoznak. Így a *Methanosaeta* nemzetség legtöbb tagja is mezofil (Scherer és Neuhaus, 2006). Ha 45°C-on inkubáljuk a sejteket tiszta tenyészetben, először elmarad a növekedés és a biogáz termelés, majd négy hét után elpusztulnak a sejtek (Whitman és Jeanthon, 2006). Kevert kultúrákban a biogáz reaktorban azonban a gyakorlati tapasztalatok szerint jól működő rendszerek alakulhatnak ki ebben a hőmérsékleti tartományban is. A *Methanosarcina sp*. hasonló hőmérsékleti optimumot mutatott, az ideális tartomány 35-37°C közé esett (Yang és Okos, 1987). Egyes termofil metanogének hőmérséklet-optimuma 65-70°C (Uemera és Harada, 1995). A biogázfermentációhoz tehát csak egy nagyon szűk hőmérsékleti tartomány optimális, ahol minden – a folyamatban szerepet játszó – mikroorganizmus még éppen képes ellátni a feladatát.

2.7 A fehérje alapú hulladékokról

Elsődleges biomasszának tekintjük a növényi eredetű biomasszát, amely a megkötött fényenergia jelentős részét a sejtek falában elsősorban lignocellulóz formájában halmozza fel. A növényi biomassza felhasználása energianyerésre világszerte az érdeklődés középpontjában áll (Tamás, 2008). A másodlagos biomasszák közé sorolhatók többek között az állati eredetű trágyák, a kommunális hulladékok, vágóhídi maradékok és a kommunális szennyvíziszap. Az anaerob lebontás során az előbbiekben említett anyagok széles spektrumát lehet felhasználni. A harmadlagos biomasszák a biológiai eredetű anyagokat felhasználó iparok termékei, melléktermékei, hulladékai, emberi települések szerves eredetű szerves hulladékai. Ezek közül elsősorban az élelmiszeripari melléktermékет, hulladékot hasznosítják biogáz előállítással. Az élelmiszeriparban keletkező hulladékoknak kb. fele (53,3 %-a) nem veszélyes vagy nagy szervesanyag-tartalmú, növényi és állati eredetű anyag (Szabó, 1999).

A szakirodalom általában egyetért abban, hogy a magas fehérje tartalmú ipari melléktermékekből nehéz biogázt előállítani, mert az alapanyag szén/nitrogén aránya (C/N aránya) nem kedvez a lebontást végző baktériumoknak. Számos kutató foglalkozott az évtizedek során azzal, hogy leírja azokat a paramétereket, amelyek között az előzőekben bemutatott, konzorciumban dolgozó mikrobák hatékonyan tudnak együttműködni (Luste és Luostarinen, 2010). Ennek egyik meghatározó paramétere a lebontani kívánt szubsztrát C/N aránya, amelyet optimálisan 20:1 és 30:1 értékek között határozták meg. A potenciális szubsztrátoknak protein-gazdag csoportját az ilyen irányú fejlesztésekben általában elkerülik a fehérjék lebomlásakor keletkező nagy mennyiségű redukált nitrogén vegyületeknek a mikrobákra gyakorolt káros hatása miatt. Már a denitrifikáció során képződő átmeneti nitrogén-oxid formák (NO_2^-, NO és N_2O) is csökkentik a metántermelést, azonban az ammónia nem-ionizált formája (NH_3) a legtoxikusabb a mikrobákra. Toxicitása erősen függ a pH-tól és a rendszer hőmérsékletétől, mivel ezen paraméterek emelkedésével az ammónium-ion/ammónia arány a nem disszociált ammónia felé fog elmozdulni. Az ammónia nem protonált formában (NH_3) diffúzió révén könnyedén bejut a sejtekbe. Az ammóniumion (NH_4^+) kevésbé könnyen diffundál át a lipid membránon (Kleiner, 1993). Az ammónia okozta toxikus folyamatoknak eddig két módját fedezték fel: (i) a nem ionizált ammónia-forma közvetlenül képes gátolni a citoszolikus enzimeket, (ii) NH_4^+ felhalmozódása a sejten belül az intracelluláris pH-ra gyakorolt hatásával okozhat gátlást, majd a sejt halálához (Sprott, 1984) vagy más kationok (pl. K^+)

koncentrációjának helytelen irányba történő elmozdulásához vezethet (Sprott és Patel, 1986). Ha egy átlagos, cellulózban gazdag szubsztrátot feldolgozó biogáz fermentorba hirtelen magas fehérjetartalmú alapanyagokat táplálunk a mikroba konzorcium ammóniára érzékeny csoportjainak növekedési üteme hamar felborul, a rendszer pH-ja az acetogén baktériumok túlzott elszaporodása miatt jelentősen csökken és a rendszer rövid idő alatt összeomlik. A kevert közösséget tartalmazó fermentorokban ráadásul szulfát-redukálók is jelen vannak, amelyek a metanogénekkel versengenek az elektronokért. Alacsony pH-n az általuk előállított kénhidrogén disszociációja csökken, ezáltal a disszociálatlan forma koncentrációja megemelkedik, amely a szabad ammóniához hasonlóan könnyedén átjut a mikrobák membránján és kb. 50 mg/l koncentráció felett kifejti toxikus hatását.

Az Európai Unióban több mint 8000 biogáz üzem működik napjainkban, ezek közül egy sem használ elsődleges alapanyagként fehérjében gazdag szubsztrátot annak ellenére, hogy folyamatosan, nagy mennyiségben termelődnek ezek a hulladékok. Tárolásuk, ártalmatlanításuk költséges és energiaigényes. Az élelmiszer előállítás során keletkező mellék- és végtermékek közé tartoznak a jelentős mennyiségű keratin fehérjéből felépülő tollat is tartalmazó, szárnyas tartásból kikerülő hulladékok, amelyekből évente világviszonylatban több millió tonna képződik (2009-ben 4 millió tonna) (Danish Environmental Protection Agency: Survey of wastes spread on land –Final report study contract, 2001). A broiler csirke nevelés gyorsabban nő, mint bármelyik egyéb húsipari felhasználás. Az Európai Unió adatai alapján a világ szárnyas hús előállításának 13 %-át az EU 28 tagországa állítja elő (Grabkowsky és Windhorst, 2009). Csak ebben a régióban évi 1 millió tonna fehérje-gazdag hulladék termelődik. Brazília és a muszlim országok sárnyas hs termelése szintén jelentős. Fehérje tartalmú melléktermékek, hulladékok azonban nem csak a húsiparból kerülhetnek ki, a tejgyári hulladék jelentős része tartalmazhat különböző mennyiségű proteint (Ramsay és Pullammanappallil, 2001). Tejipari hulladék felhasználásakor az anaerob lebontás alacsony szintje és a különböző vegyületek miatt kialakuló gátlás együttesen okozza a biogáz reaktorok csökkent aktivitását (Perle és mtsai., 1995). Elméletileg a fehérje-gazdag biomassza kiváló biogáz forrás lehetne, amennyiben sikerülne az anaerob lebontás néhány alapvető kérdését tisztázni.

2.8 A fehérje feldolgozásakor jelentkező problémák

A biogáz termelését végző mikroba-populáció egy rendkívül komplex rendszert alkot. A tagok közti különböző szintrópikus kapcsolatok és egymásra utaltság miatt a fermentáció csak akkor lehet hatékony, ha minden, a lebontásban szerepet játszó

csoportnak ideális körülményeket tudunk teremteni, hogy feladatukat ellássák. Minden mikrobának szüksége van makro- és mikroelemekre, ezek hiánya negatív hatást gyakorol életfolyamataikra. Ezek az elemek legtöbbször megtalálhatók a lebontandó alapanyagban. Azonban ha csak egyféle alapanyaggal (monoszubsztrát) végezzük a fermentor táplálását, előbb-utóbb fel fog lépni valamely ásványi anyag hiánya és ez jelentős mértékben csökkentheti a megtermelt biogáz mennyiségét és az alacsony pufferkapacitás nagyon sérülékeny rendszert eredményezhet. Az anaerob szerves anyag lebontás számos mikrobacsoport együttműködését igényli, mindnek megvan a speciális szerepe a teljes lebontási folyamatban (Ahring, 2003; Wirth és mtsai., 2012), amelynek hatékonysága számos környezeti tényezőtől függ, többek között az ammónia-koncentrációtól (van Velsen, 1979), amely a nitrogén-tartalmú szerves vegyületek – döntően fehérjék – lebontása során keletkezik. Megfigyelték, hogy a magas nitrogén tartalom felelős lehet számos alapanyag nem megfelelő lebontásáért és a biológiai rendszer összeomlásáért (Schmid és Lipper, 1969; Braun és mtsai., 1981). McCarty és McKinney (1961) eredményei alapján 150 mg/l-es határértéknél állapították meg a szabad ammónia toxicitásának határértékét (a határértékeket később részletezem), de kalcium- és magnézium ionokkal csökkenteni lehet a toxikus hatást (ammóniumion antagonisták). A magas metántartalmú biogáz előállításhoz optimális szén/nitrogén/foszfor (C/N/P) arányt 100:3:1-hez állapították meg (Conrad és mtsai., 1989; Rajeshwari és mtsai., 2000). Amennyiben a C/N arány magas, fennáll a veszélye, hogy a nem megfelelő tápanyag arányok miatt valamilyen hiány lép fel, ezzel együtt csökken a rendszer pufferkapacitása, amely érzékenyebbé teszi a mikroba közösséget (Nyns, 1986). Bizonyos esetekben javítható a szénhidrát alapú szubsztrátok lebonthatósága, ha keverjük nitrogén dús alapanyaggal, így javítva a C/N arányt (Ahring, 1992; Kaparaju és mtsai., 2002; Macias-Corral és mtsai., 2008). Azonban más szerzők általában nem ajánlják a nitrogén-gazdag hulladékok anaerob lebontását a felhalmozódó ammónia-származékok gátló hatásai miatt (Luste és Luostarinen, 2010; Ahring, 2003; Braun és mtsai., 2003; Gerardi, 2003).

Az ammónia gátlást évtizedek óta tanulmányozzák, ennek megfelelően számos alapos kísérletes munka született a témában, amelyek esetenként nagyon eltérő határértékeket állapítottak meg az ammóniára vonatkozóan (Kroeker és mtsai., 1979; Angelidaki és Ahring, 1993; Hansen és mtsai., 1998; Banks és Wang, 1999). A gátlás fő okaként azonban a legtöbb esetben a korábban említett szabad NH_3 könnyű membránon való átjutását (Kroeker és mtsai., 1979; de Baere és mtsai., 1984) és az ezáltal okozott

proton egyensúly felborulást és/vagy kálium hiányt állapították meg (Sprott és mtsai., 1984; Sprott és Patel, 1986; Gallert és mtsai., 1998). Az esszenciális NH_3-N koncentrációra is számos érték létezik: anaerob mikroorganizmusokra 0,05 és 0,2 g/l az ajánlott Bhattacharya és Parkin (1989) szerint. Van Velsen (1979) úgy találta, hogy 0,2 és 1,5 g/l NH_3-N még nem okoz gátlást a metanogének körében. Koster és Lettinga (1984) vizsgálatai alapján mezofil körülmények között a maximális metanogén-aktivitásra hatástalan volt a 0,68 g/l-es NH_3-N koncentráció. Azonban 1,5-3 g/l-es NH_3-N koncentráció pH≥7,4 felett már gátlást okozott a metanogén közösségben (van Velsen, 1979; McCarty és McKinney, 1961). Angelidaki és Ahring (1993) szerint 4 g N/l (a mértékegység feltehetően a teljes N koncentrációra utal) vagy ennél magasabb koncentráció komoly gátlást okozott termofil körülmények közötti marhatrágya alapú biogáztermelő rendszerben. Ennek ellenére a kísérletben tovább emelték a nitrogéntartalmat, mivel az eredményeik arra utaltak, hogy az acetiklasztikus és a hidrogenotróf metanogének növekedési ütemének visszaesése átmeneti jelenség. A szakirodalomban található eltérések részben abból adódnak, hogy nehéz összevetni a különböző mértékegységekben megadott eredményeket, továbbá a szerzők között jelentős eltérések vannak az alkalmazott pH és hőmérsékletek tekintetében is.

A magasabb ammónia koncentrációhoz való alkalmazkodás és a kationok antagonista hatását számos tanulmány részletezi, azonban jelentős eltérések mutatkoznak a gátlónak ítélt koncentrációkban (Lapp és mtsai., 1975; Chen és mtsai., 2008). Adaptációval magas tolerancia érhető el. Ahring és mtsai. (1992), valamint Hansen és mtsai. (1996) arról számoltak be, hogy 0,7-1,1 g NH_3-N/l között következik be irreverzibilis gátlás. Chen és mtsai. (2008) számos potenciális gátló tényezőt vizsgáltak, amelyek jelentősen visszavethetik a biogáz-termelődést. Hashimoto (1986) megfigyelte, hogy az általa használt termofil metanogénekre adaptáció előtt 2,5 g NH_3-N/l ammónia már gátlólag hatott, míg adaptációt követően ez az érték 4 g NH_3-N/l-re emelkedett. Mások a spontán kialakuló, nem adaptált természetes mikroba közösség alkalmazásával nagyon alacsony, mindössze 0,08-0,10 g NH_3-N/l ammónia határértéket állapítottak meg (Braun és mtsai., 1981; de Baere és mtsai., 1984). Parkin és mtsai. (1983) 8-9 g NH_3-N/l koncentráció eléréséig nem tapasztalt jelentős biogázhozam csökkenést adaptáció alkalmazását követően, míg más kutatók már 3-4 g NH_3-N/l koncentrációnál megfigyelték az adaptált rendszer összeomlását (Angelidaki és Ahring, 1993). Edström és mtsai. (2003) vért, gyomor- és béltartalmat, illetve élelmiszer hulladékok kofermentációját végezték állati

eredetű inokulummal. A betáplált alapanyagkeverék 8-15 % -ban állati hulladékokat is tartalmazott, ennek eredményeként viszonylag magas, 4,5-5,0 g NH_3-N/l koncentrációt értek el a folyamat gátlása nélkül. További sikeres kísérleteket végeztek Parkin és mtsai. (1983), valamint de Baere és mtsai. (1984), amelyek során egy adaptációs periódust követően 6,0-7,8 g NH_3-N/l összes nitrogéntartalom mellett is megbízhatóan zajlott a biogáztermelés.

Közismert tény, hogy a biogáz fermentorokban jelenlévő mikroorganizmusok közül a metanogének tolerálják legkevésbé a környezetükben megjelenő gátló anyagokat, így a növekvő ammónia koncentráció hatására lelassul a szaporodásuk (Kayhanian, 1994; Stroot és mtsai., 2001; Kotsyurbenko és mtsai., 2004). A megemelkedett NH_3 szint (0,8-6,9 g NH_3-N/l) változást okoz a mikrobaközösség összetételében; az ammónia gátlás egyik legjelentősebb következménye a populációban az acetiklasztikus metanogének mennyiségének eltolódása a szintrófikus acetát oxidálók irányába (Schnürer és Nordberg, 2008; Westerholm és mtsai., 2012). Az acetiklasztikus metanogének relatív mennyisége csökken az ammónia stressznek kitett reaktorokban, míg a baktériumok száma növekszik. Az acetát- és hidrogén-hasznosító metanogén populációk ammónia toxicitás tesztje azt mutatja, hogy az acetiklasztikus metanogének érzékenyebbek a hidrogenotróf metanogéneknél (Robbins és mtsai., 1989; Angelidaki és Ahring, 1993; Schnürer és Nordberg, 2008). Az acetiklasztikus metanogének növekedési rátája a felére csökken, ha a környezet összes nitrogéntartalma eléri 3,5 g N/l koncentrációt, ugyanez a hidrogenotrófoknál csak 7 g N/l-nél figyelhető meg (Angelidaki és Ahring, 1993) (sajnos az eredmények értékelésében ismét zavaró a mértékegység nem megfelelő definíciója). Egy korábbi tanulmány szerint azonban a hidrogén-hasznosító metanogének sokkal érzékenyebbek az ammóniára, mint az acetiklasztikus törzsek, bár a gátlás miatt fellépő hidrogén-felhalmozódás következményeként megnövekszik a rendszer propionsav koncentrációja, ami azonban már gátolja az acetiklasztikus fajokat is (Wiegant és Zeeman, 1986). Számos szintrófikus acetát oxidáló baktérium magas ammónia-toleranciával rendelkezik, mint például *Clostridium ultunense*, *Syntrophaceticus schinkii* és *Tepidanaerobacter acetatoxidans*, ez kétségtelenül kompetitív előnyt jelent számukra a közösség többi tagjához képest (Westerholm és mtsai., 2012). Koster és Lettinga (1988) tanulmányozták az acetogén és metanogén populációk változását, miközben a rendszer ammónia-nitrogén tartalmát 4,0-ről 5,7 g NH_3-N/l-ig növelték. Kísérleteik bizonyították, hogy a metanogén populáció aktivitásának több mint felét elvesztette ez idő alatt, míg az

acetogénekre alig volt hatással a több NH_3. Növekvő számú független kísérlet szerint lehetséges kiegyensúlyozott rendszerben biogázt fermentálni 4-5 g NH_3-N/l felett is egy kezdeti adaptációs folyamatot követően (Chen és mtsai., 2008; Nielsen és Angelidaki, 2008). A vizsgálatok többsége kiemeli, hogy a növekvő ammóniumion koncentrációval párhuzamosan visszaesik a biogázhozam és/vagy csökken a gázban a metán részaránya (Koster és Lettinga, 1988; Borja és mtsai., 1996).

Koster és Koomen (1988) a nem adaptált hidrogenotróf metanogének gátlását tanulmányozták. Ennek során azt találták, hogy magas ammónia-nitrogén koncentrációnál (6,3 g NH_3-N/l) is képesek voltak nőni a vizsgált törzsek. Bár Koster és Koomen eredményei nem egyedülállóak, számos ellentétes eredmény is napvilágot látott (van Velsen, 1979; Koster és Lettinga, 1984; Koster, 1986). Ezekben a kísérletekben nem adaptált, kevert acetiklasztikus és hidrogenotróf metanogén populációkat használtak, a rendszerben ideiglenes ammónia gátlást figyeltek meg, amely csak akkor tűnt el, ha egy adaptációs időszak során hozzászoktatták a közösséget a növekvő ammónia koncentrációhoz.

Általánosan használt megoldás az üzemi szintű biogáz előállításban, hogy a magas nitrogén-tartalmú szubsztrátokat cellulóz-gazdag/szénhidrát-gazdag alapanyagokkal keverve juttatják a fermentorokba, ezzel közelítve az ajánlott C/N arányhoz. A toxicitást vizsgáló tanulmányok közül csak kevés vizsgálta különböző koncentrációban az ammónia gátló hatását mind a hidrogenotróf, mind az acetiklasztikus metanogének esetében. Sprott és mtsai. (1984) négy, ipari biogázfermentorból izolált metanogén törzs tiszta kultúráinak ammónia toleranciáját vizsgálták (*Methanospirillum hungatei, Methanosarcina barkeri, Methanobacterium thermoautotrophicum*, és *Methanobacterium formicicum*). Megfigyelésük eredményeként kiderült, hogy a *M. hungatei* volt a legérzékenyebb az ammóniára a vizsgált fajok közül, mindössze 4,2 g NH_3-N/l-ig volt képes elviselni, míg a többi vizsgált törzs rezisztens volt a 10 g NH_3-N/l koncentrációjú ammóniára is. Hasonló, tiszta termofil hidrogenotróf metanogén kultúrák vizsgálata során 9 g NH_3-N/l koncentrációnál még megfigyelhető volt a törzsek növekedése (Hendriksen és Ahring, 1991). Más tanulmányok kifejezetten a *Methanosarcinaceae* és *Methanosaetaceae* családok törzseit vizsgálták, amelyeket erősen gátolt az alacsony NH_3 koncentráció is (Sprott és Patel, 1986; Hajarnis és Ranade, 1994). Archeák és baktériumok hasonlóan nőttek 0,8-2,3 g NH_3-N/l jelenlétében, azonban 4,4 g/l és 8,6 g/l közötti tartományban az Archaeák csaknem teljesen eltűntek a rendszerből. Mindeközben az anaerob reaktorokban

a szintrófikus acetát oxidálók (Schnürer és Nordberg, 2008; Westerholm és mtsai., 2012) fő versenytársai az acetiklasztikus metanogének, például *Methanosarcina* és *Methanosaeta* csoportok tagjai (Hattori, 2008).

A folyamat összetettsége miatt viszonylag kevesen vizsgálják a toxikus anyagok hatásait ipari méretű bioreaktorokban, különösen azért, mert ilyen esetekben figyelembe kell venni a reaktor geometriáját és a technológiai előírásokat, amelyek nem engednek meg ilyen kísérletezést (Gallert és mtsai., 1998).

2.9 Metagenomika

A metagenomika egy adott környezetben élő közösség teljes genetikai anyagát tanulmányozza. A tradicionális mikrobiológia és mikrobiális genom szekvenálás döntően a laboratóriumi körülmények között szaporítható mikroorganizmusokkal foglalkozik. Ezzel szemben a metagenomika (Handelsman és mtsai., 1998) lehetővé teszi a mikroba közösségek direkt vizsgálatát környezeti mintákból, kikerülve az izolálást és a tiszta kultúra laboratóriumi szaporítását.

Az automatizált Sanger szekvenálást, más néven „első generációs szekvenálást” az utóbbi években jelentősen tovább fejlesztették. Napjainkra számos jelentős technikai újítást vezettek be, ezeket a technikákat továbbfejlesztett, ún. „következő generációs szekvenálásnak” nevezik. Általánosan igaz ezekre a módszerekre, hogy nagy méretű adatbázisokat hoznak létre viszonylag rövid szekvencia fragmentekből és komoly bioinformatikai eszközök szükségesek az eredmények kiértékeléséhez. Környezeti mintákból specifikus gének azonosítása során (gyakran a 16S rRNA gének), egy összetett minta profilját kapjuk meg. Számos 16S rDNS szekvenciát találtak, amelyek egyetlen eddig ismert, tenyészthető fajhoz sem tartoztak, így a metagenomika egyik feladata, hogy azonosítsa ezeket az élőlényeket.

Az első metagenomikai vizsgálatokat 454 piroszekvenálásokkal végezték. Manapság is ez a legelterjedtebb platform, a néhány ismert esetben a biogáztermelő rendszerek leírására ezt alkalmazták (Krause és mtsai., 2008; Schlüter és mtsai., 2008; Kröber és mtsai., 2009; Hanreich és mtsai., 2011; Sundberg és mtsai., 2011). Az újabb módszertani fejlesztések eredménye: Ion Torrent Personal Genome Machine, az Illumina platform és az Applied Biosystems SOLiD rendszere. Ezek a DNS szekvenáló technikák a Sanger-féle szekvenálásnál rövidebb szekvencia fragmenteket állítanak elő; az Ion Torrent

PGM System és a 454 piroszekvenálás átlagosan 150-400 bp hosszúságú egyedi szekvenciákat ad, az Illumina 25-300 bp, a SOLiD 25-75 bp leolvasásokat állít elő (McKernan és mtsai., 2009; Tyler és mtsai., 2009; Johansen és mtsai., 2011; Liu és mtsai., 2011). A piroszekvenálással vizsgált metagenom minták 200-500 Mbp adatot szolgáltanak egy menetben, az Illumina platformok által generált adatmennyiség pedig eléri a 20-50 Gbp-t.

3 Célkitűzés

Felismerve az óriási mennyiségben keletkező, hasznosításra váró fehérjében gazdag ipari és mezőgazdasági melléktermékek biogáz formájában történő ártalmatlanításának és hasznosításának szükségességét célul tűztem ki:

1. Olyan eljárás kidolgozását, amely – az anaerob lebontást végző mikroba közösség összetételének megváltoztatásával – a biogáz termelő rendszert fokozatosan hozzászoktatja a szakmai irodalomban ismert határok többszörösét meghaladó fehérje-alapanyagokhoz.
2. Az ismert megoldások továbbfejlesztésével eljárást fejlesszek fehérjében gazdag alapanyagok fokozott mennyiségben való adagolására és ilyen melléktermékek monoszubsztrátokként történő (pl. sertésvér, kazein, húskivonat) ártalmatlanítására biogáz termelő rendszerekben.
3. Metagenom vizsgálattal tanulmányozzam a mikrobaközösség összetételében bekövetkező változásokat a fehérje-adaptáció során.
4. A metagenom-analízis alapján kiválasztott törzsek tiszta tenyészeteit visszajuttatva a rendszerbe a feltételezett előnyös hatásuk tesztelése érdekében vizsgáljam ezek hatását a biogáz termelésre illetve túlélésüket a biogáz termelő mikroba közösségben.
5. Összehasonlító vizsgálatokban meghatározzam az adaptált fehérje hasznosító mikrobaközösségek hatékonyságát, a biogáztermelés fenntarthatóságát.

4 Anyagok és módszerek

A kísérletekhez felhasznált vegyszerek nagy részét a Sigma, Reanal Vegyszergyár és a Merck cégek forgalmazzák. A sertésvér, amely proteinben gazdag tápanyagforrásként szolgált, a makói Füstöltkolbász Kft. vágóhídjáról származik. A baktérium törzsek a DSMZ német törzsgyűjteményből származnak.

4.1 Tápoldatok, táptalajok

Luria-Bertani, LB (Sambrook és mtsai., 1989) 1 literre vonatkoztatva:

- 10 g pepton
- 5 g élesztő kivonat
- 10 g NaCl

A tápoldat összeállítását követően szükséges a pH beállítása pH=7,5 értékre 1M NaOH segítségével.

A sejteket táplemezen tartottam fenn, mely a fent felsoroltakon kívül 15g/L agart is tartalmazott.

Bacillus subtilis (DSM10) és *Bacillus coagulans* (DSM1) tápoldat 1 literre vonatkoztatva:

- 5 g pepton
- 3 g húskivonat
- 0,01 g $MnSO_4xH_2O$

A tápoldat összeállítását követően szükséges a pH beállítása pH=7,0 értékre 1 M NaOH segítségével.

Pseudomonas fluorescens (DSM50090) tápoldat 1 literre vonatkoztatva (pH=):

- 5 g pepton
- 3 g húskivonat

4.2 Kevert természetes kultúra (oltóiszap)

A biogáz fermentációért felelős mikroba konzorcium anaerob reaktorok (Pilze-Nagy Kft., Kecskemét) fermentációs maradékából származik. A fermentációt megelőzően a mikrobák aktivitásának fokozása érdekében a fermentáció tervezett hőmérsékletén inkubáltam a kevert kultúrát egy héten keresztül.

4.3 Növényi eredetű konyhai hulladék

A háztartásokban jelentős mennyiségben keletkezik különböző növények tisztítása, aprítása során konyhai hulladék. E hulladék összetétele rendkívül eltérő, szezonálisan és lakóhelytől függően is változik. A vizsgálathoz mesterségesen összeállított keveréket használtam, melynek állandó biomassza összetételét úgy értem el, hogy az alapanyagként beszerzett zöldségeket és gyümölcsöket homogenizáltam (4. ábra). Ennek a homogenizátumnak a C/N összetétele 10:1 volt. A fermentorokba bevitt szubsztrát/oltóiszap oTS aránya 0,5 volt.

Hulladék frakció	% (m/m)
Alma	19,1
Burgonya	18,5
Görögdinnye	18,4
Őszibarack	10,2
Paradicsom	18,5
Szilva	15,3

4. ábra: A ’modell’ növényi eredetű konyhai hulladék összetétele

4.4 Mikroorganizmus törzsek

4.4.1 *Pseudomonas fluorescens* (DSM50090) típus törzs

Aerob, Gram-negatív, heterotróf baktérium. Több flagellummal rendelkezik, anyagcseréje nagyon változatos, biokontroll faj. A sejtek pálca alakúak, méretük: 0,5-0,8 x 1,5-3,0 µm. A talajban és természetes vizekben is megtalálható baktérium. A zselatint képes lebontani, emellett lipáz- és lecitináz aktivitással is rendelkezik. Hőmérsékleti optimuma 30°C, kis mértékű növekedést mutat 4°C-on is, azonban 41°C-on a sejtek osztódása nem figyelhető

meg. A DNS G/C aránya 60 %. Energiaforrásként felhasználja az acetátot, citrátot épp úgy, mint számos aminosavat (pl. L-alanin, L-aszparagin, L-aszparaginsav, L-prolin, L-arginin, L-tirozin, D-alanin, L-leucin és izoleucin, L-valin és L-hisztidin), továbbá a D-glükózt, D-fruktózt és D-galaktózt. Nem tudja bontani a vajsavat és az izovajsavat (Garrity és mtsai., 2005).

4.4.2 *Bacillus coagulans* (DSM1) típus törzs

B. coagulans Gram-pozitív, kataláz pozitív, endospórát képző, mozgó, fakultatív anaerob baktérium (0,9 μm-3,0 μm x 5,0 μm). Reakciói alapján a *B. coagulans* Gram-negatívnak tűnhet, amikor az osztódás stacionáris fázisába lép. Növekedéséhez az optimális hőmérséklet 40°C (DSMZ szerint 30°C), de 30°C-55°C között tolerálja a környezet hőmérsékletét (Hammer, 1915). A zselatint, kazeint és a keményítőt is bontja, fel tudja használni energianyerő folyamataihoz a fruktózt, maltózt, trehalózt, továbbá a citromsavat, azonban a propionsavat nem hasznosítja. A *B. coagulans* pH-optimuma pH= 6,0-7,0 (Vos és mtsai., 2009).

4.4.3 *Bacillus subtilis* (DSM10) típus törzs

A szénabacillus néven is ismert *B. subtilis* a talajban általánosan fellelhető Gram-pozitív, kataláz-pozitív baktérium. A Bacillus nemzetség fajaként a *B. subtilis* pálcika formájú, és képes a kedvezőtlen környezeti körülmények közti túlélést biztosító, endospórát létrehozni. A *B. subtilis*-t a múltban obligát aerob szervezetként írták le,, mára elfogadottá vált, hogy mind aerob, mind anaerob környezetben képes a faj szaporodni (Vos és mtsai., 2009). Motilis, pigment anyagot nem termel, a zselatint, keményítőt és a kazeint is képes bontani. A citromsavat, fruktózt, maltózt és a trehalózt a *B. coagulans*hoz hasonlóan képes hasznosítani, azonban a propionsavat nem tudja energianyerő folyamataiban felhasználni. A növekedéséhez szükséges pH=6,0-8,0, míg az optimális hőmérséklet 20-40°C.

4.5 Szárazanyag-tartalom meghatározás

A szubsztrátként felhasznált biomassza szárazanyag-tartalmának meghatározásához 105°C-os szárítószekrényben a mintákat egy éjszakán keresztül

tömegállandóságig szárítottam, majd a visszamaradt tömeg alapján következtettem azok szárazanyag-tartalmára.

4.6 Szervesanyag-tartalom meghatározás

A szárazanyag-tartalom meghatározás során keletkezett mintákat 550°C-on hevítettem tömegállandóságig, a visszamaradt tömegből következtettem azok szervesanyag-tartalmára.

4.7 Illékony szerves savak (VFA) mennyiségi meghatározása

A VFA mennyiségét nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (Hitachi Elite LaChrom HPLC) segítségével határoztam meg. Az eredmények leolvasása és kiértékelése EZChrome Elite programmal történt. Mozgófázisként 0,01 M kénsav oldatot használtam, melynek áramlási sebessége 0,8 ml/perc volt. A komponenesek elválasztása ICsep ICE-COREGAL 64H oszloppal, azonosításuk L-2490 refraktív index detektorral történt. A kolonna hőmérséklete 50°C, a detektoré 41°C volt. Mérés előtt a mintákat lecentrifugáltam (5 perc, 13,000 rpm, 4°C), majd cellulóz-acetát membrán fecskendőszűrőn (0,2 µm pórusátmérő) leszűrtem, annak elkerülése érdekében, hogy szennyeződéseket, illetve bakteriális sejteket vigyünk fel az oszlopra.

4.8 Biogáz minőségi összetételének vizsgálata

A keletkezett biogáz összetételének meghatározását gázkromatográf (Shimadzu GC-2010, Carboxen 1010 kolonna) segítségével végeztem el. A fermentorokon kialakítottunk egy gázminta vételre alkalmas szeptumot, melyen keresztül vettem a gázmintákat.

Hővezető képesség detektort, valamint nitrogén vivőgázt alkalmaztam. A kolonna hőmérséklete 60°C, a detektoré 160°C volt.

4.9 Kénhidrogén-tartalom meghatározása

Az elmenő gázban mért kénhidrogén-tartalmat Drager gyártmányú (gyártószám: CH29101) csövekkel határoztam meg, amelynek mérési tartománya 100-2000 ppm közé esett.

4.10 Ammóniumion tartalom meghatározás

A minták ammóniumion tartalmának meghatározását Spectroquant Nova60 (Merck) reagens teszt (1.00683.0001) segítségével történt. Mérés előtt a mintákat először

szűrőpapíron, majd 0,2 µm pórusátmérővel rendelkező fecskendőszűrőn leszűrtem, mivel a használt műszer spektrofotometriás elven működik, így a minta zavarossága hamis pozitív eredményt adhat.

4.11 Proteáz-aktivitásmérés

Mintáinkból nem specifikus proteáz aktivitást mérünk azokazeinnel. Az azokazein lényegében az akklimatizációhoz használt kazein módosított formája, ahol az alapfehérjére festéket kötnek. A proteáz-hasítást követően színes termék jelenik meg az oldatban, amelynek mennyisége spektrofotometriás úton 440 nm-en mérhető. Ezen a hullámhosszon mért fényelnyelés arányos a proteázaktivitással. A minták előkészítése során 0,2 µm pórusátmérőjű steril fecskendőszűrőn átszűrjük a mintákat. 200 µl mintát pufferelünk 50 µl K_2HPO_4-KH_2PO_4 pufferrel (8pH), majd összekeverés után 200 µl azokazeint adunk a keverékhez és 24 órára 37 °C-ra helyezzük a mintákat. Ez az időtartam elegendő, hogy az enzimek elvégezzék a hasítást. A reakció 700 µl 5%-os triklór-ecetsavval állítjuk le, amely kicsapja a rendszerben lévő összes fehérjét, így az enzimeket, valamint az el nem hasított azokazein molekulákat is, a lehasított festék azonban oldatban marad és az általa adott szín mélysége arányos a rendszerben lévő enzimek mennyiségével. A mintákat lecentrifugáljuk 13000 rpm fordulaton 10 percig, majd 440 nm-en megmérjük a fényelnyelést spektrofotométer segítségével.

4.12 Szubsztrátként felhasznált anyagok tulajdonságai

A kísérletek során alkalmazott szubsztrátok adatai a következőek voltak:

paraméterek	mértékegység	Kazein	Vér	Húskivonat	Növényi eredetű konyhai hulladék
Szerves szárazanyag-tartalom	% (a szárazanyag-tartalom százalékában)	59,83	95,79	87,56	92,71
Szárazanyag-tartalom	%	97,12	23,32	94,16	16,60
Nedvesség-tartalom	%	2,88	76,68	5,84	83,40
Sűrűség	kg/m^3	1,48	1,06	1,47	1,06
C/N arány		3,47	3,20	3,32	12,43
Lipidtartalom	% (a szerves szárazanyag-tartalom százalékában)	<1	<1	<1	<1
Fehérje-tartalom	% (a szerves szárazanyag-tartalom százalékában)	72,40	94,40	68,20	7,20
Szénhidrát-tartalom	% (a szerves szárazanyag-tartalom százalékában)	26,50	5,30	30,50	68,70

5. ábra: A kísérletek során alkalmazott alapanyagok összetétele

4.13 DNS izolálás

A lecentrifugált baktérium csapadékot 570 µl TAE pufferben szuszpendáltam fel. Hozzáadtam 3 µl 10 mg/ml koncentrációjú proteináz K-t és 30 µl 20 %- SDS-t, majd óvatosan összekevertem. 15-20 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Ezt követően 100 µl 5 M Na-acetáttal és 80 µl 10%- CTAB-bal (cetil-trimetilammónium-bromid) egészítettem ki a mintát és 10 percig 65°C-on inkubáltam, majd rögtön fenoloztam: a minta eddigi térfogatával megegyező mennyiségű pufferelt fenolt alkalmaztam (pH=7,0). Óvatos forgatással összekevertem, majd lecentrifugáltam a mintát (5 perc, 13000 rpm). A felülúszót továbbvittem egy tiszta Eppendorf csőbe és 200 µl fenolt, valamint 200 µl kloroformot adtam a mintához. Óvatos forgatással összekevertem, majd lecentrifugáltam a mintát (5 perc, 13000 rpm). A felülúszót 40 µl kloroformmal átmostam, majd lecentrifugáltam a mintát (5 perc, 13000 rpm). A nukleinsavat kicsaptam 700 µl izopropanollal, 30 percig -20°C-on tároltam a mintát, majd ezt követően lecentrifugáltam. A csapadékot 70 V/V%- hideg (-20°C) etanollal átmostam, majd 5 percig újra centrifugáltam a mintát. Az alkoholt eltávolítottam a csapadékról, majd megszárítottam. Végső lépésként a csapadékra 20-50 µl steril desztillált vizet mértem és egy órán keresztül

37°C-on inkubáltam a teljes feloldódásig. Ezt követően a mintát további felhasználásáig -20°C-on tároltam.

A használt oldatok

TAE: 4,84 g TRIS Base
1,142 ml jégecet
2 ml 0,5 M Na_2-EDTA (pH=8,0)
20% SDS: nátrium-dodecil-szulfát
5 M- Na-acetát
10 %- CTAB: cetil-trimetilammónium-bromid

4.14 DNS mennyiségi meghatározása qPCR segítségével

A polimeráz láncreakcióhoz fajonként két primerpárt alkalmaztam, hogy a mennyiségi meghatározást elvégezhessem. Az első pár, BcoFW (5' CGACATGGACAT GATCCAGAATA 3') és BcoREV (5' GAAATTCGGGCTCTGGTTTG 3'), a *B. coagulans* glükozid hidroláz GH D génjéből sokszoroz fel egy 200 bp szakaszt. A másik primerpár BsuFW (5' GCTGCCGTGATCTTGGTGAA 3') és BsuREV (5' GGCGAACAGCCTCAACGATA 3') egy 198 bp fragmentumot amplifikál fel a *B. subtilis* piridoxál liáz PdxS génjéből, ami egy membránkötött [Ni-Fe] hidrogenáz alegységet kódol. Valamint a PflFW (5' CAACGACGCCGCAATCTC 3') PflREV (5' GCCAGATGCACCGTGAACT 3') primerek a *Ps. fluorescens* L-ornitin 5-monooxigenáz PvdA génjéből amplifikál fel egy 200 bp szakaszt.

A PCR elegy tartalmazott 2x-es Power SYBR green PCR mastermixet (Applied Biosystems), oligonukleotid primert 1 µM koncentrációban primerenként, valamint 1 µl tisztított DNS-t 25 µl végtérfogatban. A negatív kontrollok nem tartalmaztak templát DNS-t. A DNS koncentrációkat Nanodrop spektrofotométerrel (ND-1000 UV/Vis, Thermo Scientific) mértem. A PCR reakciókat Real Time PCR berendezéssel készítettem el (Applied Biosystems RTP 7500), amely során a következő körülményeket alkalmaztam: 50ºC 2 perc; 95ºC denaturáció 10 perc; 40 ciklus 95ºC-os denaturációval 15 másodpercig, valamint 60ºC-os annealinggel 1 percig (az adatgyűjtés ennél a lépésnél történt). Ezt követte egy disszociációs lépés: 95ºC 15 másodperc, 60ºC 1 perc, 95ºC 15 másodperc. Az eredményeket a gyártó által biztosított szoftverrel (7500 system sequence detection

software v 1.4) analizáltam. Mivel a SYBRGreen festék nem termékspecifikus, ezért a termék tistaságának ellenőrzése céljából olvadáspont analízist végeztem.

4.15 Szakaszos fermentáció

A szakaszos (batch) fermentáció során a biogáz keletkezése a fermentorban lévő biomassza elfogyását követően leáll, ellentétben a folyamatos vagy fél-folyamatos fermentációval, ahol a rendszeres tápanyag utánpótlás biztosított. A biomassza biogázzá való alakíthatóságát vizsgáló kísérleteket légmentesen zárható, 0,5 literes térfogatú laboratóriumi fermentorokban végeztem. A szakaszos fermentációkhoz a VDI-szabványnak (Verein Deutcher Ingenieure, 2006) megfelelő mennyiségű oTS (szerves szárazanyag-tartalom) reaktor térfogatra vetítve 1,5 % volt, amíg a szubsztrát és az oltóiszap oTS tartalmának ajánlott arányát 0,5-en tartottam a szubsztrát gátlás elkerülése érdekében. Az adaptációt vizsgáló kísérletekben ettől eltérő arányokat alkalmaztam: 3-30 % között változott a szubsztrát/oltóiszap oTS aránya. A fermentorok gázterét nitrogénre cseréltem ki, hogy biztosítsam az anaerob körülményeket. A fermentációt kevert természetes kultúrával (oltóiszap) indítottam el, amely egy működő biogáz fermentorból (Pilze-Nagy Kft., Kecskemét) származott. A fermentorokat 37°C-os inkubátorba helyeztem.

A keletkezett biogáz mennyiségi meghatározása vízkiszorításos rendszerrel történt. Az eljárás lényege, hogy a biomasszát, és az esetenként hozzáadott baktériumokat tartalmazó lezárt, anaerobbá tett reaktorhoz egy vízzel teli második üveget kötünk, így a gáz szabadon áramolhat a második üvegbe. A beáramló gáz a saját térfogatával ekvivalens térfogatú vizet szorít ki a harmadik üvegbe, melynek mennyiségét mérőhengerrel mértem, így naponta figyelemmel követhető a keletkezett biogáz mennyisége. Figyelembe kell vennünk, hogy a gázok térfogata különböző hőmérsékleteken eltérő. Ahhoz, hogy a keletkezett gáztérfogatok összehasonlíthatóak legyenek normál állapotra számítottam át (0°C, 1013 mbar) a mért értékeket Gay-Lussac 2. törvénye alapján, valamint módosítottam a vízgőznyomással és 1 g szerves szárazanyagra vonatkoztattam.

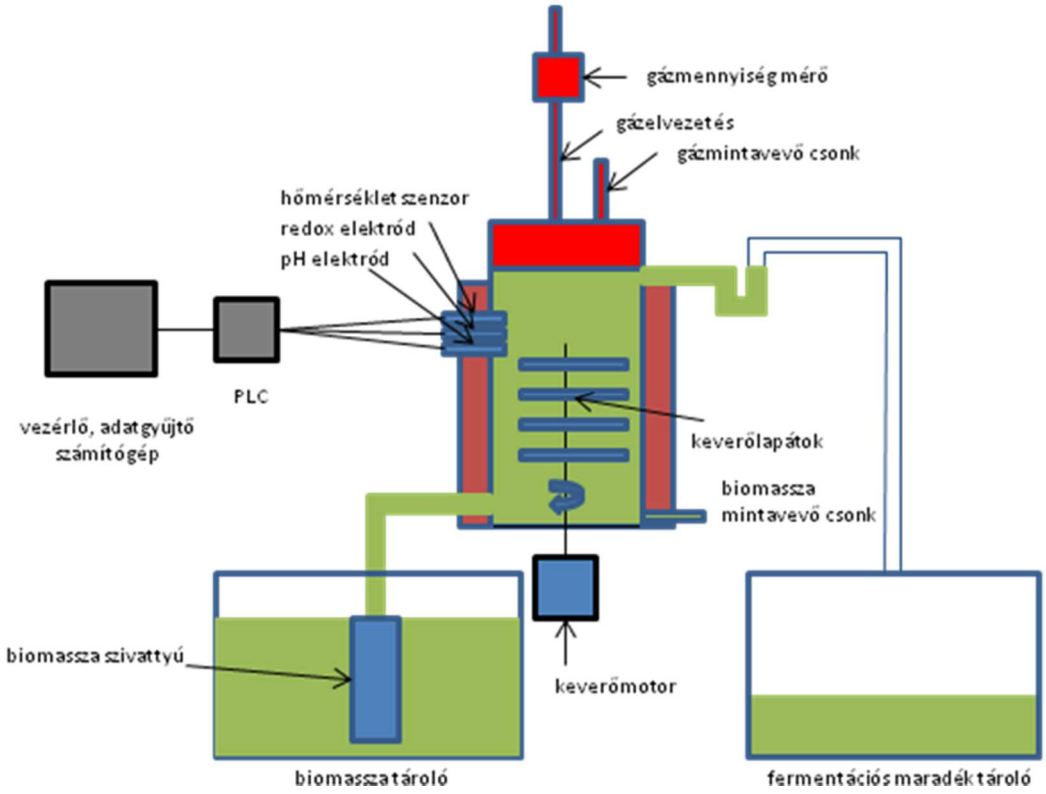
4.16 Rátáplálásos fermentáció

A rátáplálásos (fed-batch) fermentációkat 5 literes hasznos térfogatú fermentorokban végeztem, a folyadéktér felett egy liternyi gáztér volt. Az ilyen típusú fermentációk átmenetet képeznek a szakaszos és a folyamatos üzemű rendszerek között, ötvözve azok tulajdonságait. A rendszer szakaszosan (naponta) tápanyag utánpótlást kap

kívülről és a keletkező gáz elvezetése is megoldott, azonban egyéb elvétel a rendszerből nem történik. A rátáplálásos fermentáció lehetőséget nyújt adaptációs kísérletek végrehajtására, mivel például az adott kísérletsorozatban a fermentorba jutattot nitrogén mennyisége a rendszerben maradt, hiszen a fermentációs maradék eltávolítása nem történt meg.

4.17 Folyamatos üzemű fermentáció

A folyamatos üzemű fermentáció speciálisan erre a célra egyedileg gyártott fermentorokkal történt (6. ábra). A folyamatos üzemű fermentáció esetében nyitott rendszerről van szó, amelyben folyamatosan történik a biomassza betáplálása és a fermentációs maradék eltávolítása. A keletkezett biogáz mennyisége állandó összetételű alapanyag esetén nem változik. E technológia előnye, hogy jól ellenőrihető és automatizálható a folyamat. Elsősorban a gyakorlati életben, biogáz üzemekben alkalmazzák, ahol a cél a minél költséghatékonyabb biogáz hozam elérése. A laboratóriumi léptékű reaktorokban jól modellezhetőek a folyamatban fontos szerepet betöltő paraméterek.



6. ábra: 5 literes folyamatos üzemű fermentorok sematikus felépítése

A reaktor hasznos térfogata 5 liter, felette 1 liter gáztér található. A fermentort irányító program szabályozni képes a hőmérsékletet, míg a redox potenciált, pH-t, távozó gázmennyiséget rögzíti minden 4. órában (naponta 6 mintavételi pont). A szubsztrát biomassza egy tároló tartályban kerül elhelyezésre, majd a programozott tartózkodási idő függvényében a rendszer a megfelelő mennyiséget, megfelelő időközönként a rendszerbe adagolja. Az anyag egyenletes eloszlását spirálkeverő biztosítja. A fermentorokon kialakításra került egy gáz-, valamint egy folyadék mintavételi csonk. A fermentáció teljes időtartama alatt a pH-t, a hőmérsékletet, a tartózkodási időt (a naponta beadagolt friss biomassza mennyiségét) meghatározott értéken tartottam, a redox potenciált mértem. A biogáz fermentációban szerepet játszó mikroba törzsek számára -300 mV alatti redox potenciál érték az optimális. Amennyiben e paraméter értéke -300 mV fölé emelkedett inert nitrogén gázzal mostam át a fermentorok légterét a megfelelő anaerobicitás kialakítása érdekében. A hőmérsékletet elektromos fűtőköpeny segítségével az automatika a kívánt hőmérsékleten, +/- 0,2°C-on tartotta. A közeg kémhatását pH= 7,0-8,5 közötti tartományra állítottam be, amennyiben szükséges volt NaOH-t, illetve HCl-t adagoltam a reaktorokba. A fermentor rendszer az SZTE Biotechnológiai Tanszék és a Biospin Kft közös fejlesztése.

4.18 Metagenomikai analízis

A sertésvér, kazein, húskivonat és a növényi eredetű konyhai hulladék felhasználásával végzett adaptációs kísérletek során a fermentorokból metagenomikai vizsgálat céljából hetente mintát vettem, és abból DNS-t tisztítottam, hogy a DNS szekvencia alapján azonosítsuk a fermentorokban élő mikroba közösséget alkotó fajokat. A megfelelő mennyiségű és minőségű (3-5 µg; 260/280=1,8-2,0) DNS kinyerése után Applied Biosystems SOLiD™ típusú új generációs szekvenátort használtunk a vért, kazeint, húskivonatot és növényi eredetű konyhai hulladékot tartalmazó fermentorokból származó minták metagenomikai analízisére. A SOLiD rendszer reprodukálható eredményt szolgáltat a felhasználónak, ugyanis nagy mennyiségű és megbízható adat nyerhető általa, mivel a DNS-ről nagyságrendekkel több leolvasást képes produkálni, mint a Sanger típusú szekvenálási technikák (Wirth és mtsai., 2012). Megbízhatóságát az is biztosítja, hogy a DNS-szekvenálás ligálási reakcióval történik (a ligáz enzim fluoreszcensen jelölt DNS-próbákat csatol össze, ami a fermentorból tisztított DNS szekvenciájának komplementerével egyezik meg), valamint minden egyes nukleotid kétszer kerül

leolvasásra. A kísérlet során a leoltásnál (azaz az oltóiszap fermentorban való elhelyezésénél), valamint a leoltástól számított 5., 9., illetve 13. héten vett fermentor mintákat vetettük alá metagenomikai vizsgálatnak. A DNS szekvenálás során 25-35 millió egyedi szekvencia részletet határoztunk meg, amelyeket hosszabb kontigokká egyesítettünk CLC program segítségével. Ezeket a kontigokat, azaz az összeszerelt leolvasásokat az online elérhető MG-RAST program különböző adatbázisokkal vetette össze: GenBank, IMG, KEGG, PATRIC, RefSeq, SEED, SwissProt, TrEMBL, eggNOG, COG, KO, NOG, Subsystems, LSU, RDP, SSU. Ennek segítségével rendszertanilag faj szintig meghatároztuk a törzseket. A kapott eredményeket e-érték és százalékos egyezés alapján szűrtük. Az e-érték azt becsli, mennyire valószínű, hogy a tapasztalt szekvenciaillesztés (a próbaként használt read és a megtalált referenciaszekvencia között) pusztán a véletlen műve, vagyis mi a statisztikai valózsínűsége, hogy egymással nem rokon szekvenciákat azonosítottunk. A százalékos egyezés azt mutatja meg, hogy a meghatározott szekvencia hány százalékban egyezik meg az adatbázisban talált hasonló szekvenciával. Az eredmények kiértékelése során >70 % egyezést fogadtunk el.

5 Kísérleti eredmények és értékelésük

Korábbi vizsgálatok alapján a szakirodalomban a fehérjét gátló szubsztrátnak tartják a biogáz fermentáció során. Ennek hátterében az áll, hogy a fehérje nagy mennyiségben tartalmaz nitrogént és kenet, amiből nitrogén esetében NH_3, NH_4^+, kén esetében pedig H_2S keletkezik. Megfigyelések szerint a közeg kémhatásától függően változó mértékben megjelenő szabad NH_3 50 mg/l feletti koncentrációban már negatívan hat a metanogénekre, 1500-3000 mg/l felett pedig teljesen legátolja a rendszert (Bai és mtsai., 2005). Felismertük, hogy azokban a kísérletekben, amelyekben ezt a jelenséget tanulmányozták elsősorban poliszacharidokkal keverték a fehérje alapanyagot az optimális C/N arány fenntartása érdekében. Ezeket az anyagokat (trágya, cellulózban gazdag növényi részek, melléktermékek) a fermentorban lévő mikroorganizmusok könnyebben és gyorsabban fel tudják használni, így a fehérje a rendszerben feltehetően felhalmozódott, és legátolta a fermentációt. Laboratóriumunkban az utóbbi évek során végzett, itt bemutatásra kerülő kísérletekben sikerült a biogáz fermentor mikroba populációját magas fehérje tartalomhoz adaptálni, működő fermentációt fenntartani. A kísérletek során fehérje szubsztrátként elsősorban sertésvért és kazeint használtam, de a kísérleti elrendezést sikeresen teszteltem egy másik élelmiszeripari melléktermékén, a húskivonaton is. Fontos megjegyezni, hogy a kísérleteimben fehérjében gazdag „monoszubsztrátot” használtan, tehát eljárásomban a szénhidrát alapú szubsztrát gyorsabb emésztése nem jelentkezik.

Az adaptáció során rendszeres időközökben ellenőrzött mennyiségben adagoltam a magas fehérjetartalmú alapanyagokat. Célszerűen csekély mennyiségű, az adott kiindulási konzorcium által biztosan tolerált mennyiségű fehérje szubsztráttal indítottam a fermentációt. Az adaptálódó rendszer összeomlását a rendszer folyamatos monitorozásával kerültem el. Ennek érdekében a keletkezett illékony zsírsavak, például ecetsav és/vagy propionsav koncentrációjának változását ellenőriztem. Amennyiben a szerves savak koncentrációja átlép egy tapasztalati úton korábban meghatározott határértéket (ecetsav: 3 g/l, összes szerves sav: 5 g/l), azt az adaptációs vagy a termelő rendszer egyensúlyának felborulása irányába mutató adatnak tekintettem. Hasonlóan monitoroztam a fermentációs elegy biológiai aktivitását. Erre lehetőséget ad az elegyben a mikroorganizmus-konzorcium proteáz aktivitásának mérése. Ennek az adaptáció során fokozatosan nőnie kell, a stabil vagy stabillá vált rendszer esetében pedig a korábbi növekedés után magas értéken marad. A fermentorokból metagenomikai vizsgálat céljából hetente mintát vettem és azt elemeztem. A DNS-szekvencia adatbázis alapján meghatároztam a fermentorokban élő

mikroba közösséget alkotó fajokat és azok relatív gyakoriságát. Metagenomikai megközelítéssel meghatároztam a fehérje szubsztráthoz alkalmazkodott mikrobiológiai közösségben bekövetkező változásokat.

Az eredmények ábrázolásakor a beadott alapanyag mennyiségét – függetlenül a szubsztrát típusától – minden esetben fekete szín jelzi. A vizsgált paraméterek színe pedig következetesen utal a fermentációhoz használt alapanyagra, így a kazeint a kék szín, sertésvért a narancssárga, húskivonatot a sárga, míg a növényi eredetű konyhai hulladékot zöld szín jelöli.

5.1 Szakaszos adaptációs kísérletek

5.1.1 Kazein szubsztrát vizsgálata

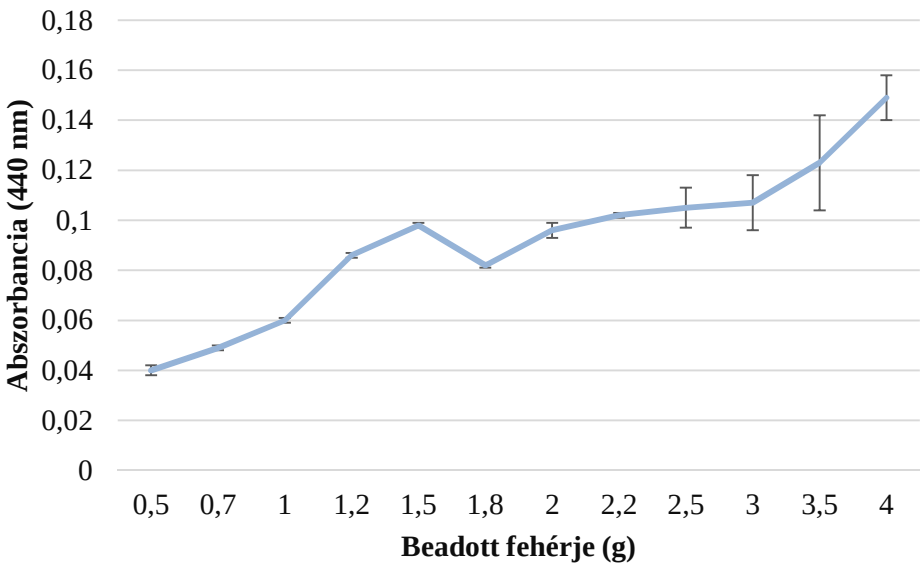
Vizsgálataim során fehérjéhez adaptált mikroba-inokulumot állítottam elő. A kezdetben még alacsony fehérje koncentrációt elviselő mikroorganimusok az átszoktatás két hónapja alatt növekvő mennyiségű fehérjét kaptak egyedüli táplálékként. Ezzel párhuzamosan a fehérjebontó aktivitásuk is nőtt a fermentáció során. További kísérletek eredményeként így azt várom, hogy a hozzászoktatott mikrobák nagyobb hatékonysággal bontsák a szubsztrátként beadott fehérjéket, ezekből nagyobb mennyiségű és jobb minőségű biogázt állítsanak elő, valamint jobban elviseljék a magasabb ammónia koncentrációt. A fermentációk elindításához minden esetben olyan oltóiszapot használtam, amely működő biogázüzemből származott, ennek megfelelően a kísérleteim elkezdése előtt legalább egy hétig vártam, hogy az oltóanyaggal bevitt szubsztrátot felhasználják a mikroorganizmusok; a kísérleteket csak a biogáztermelés visszaesése után kezdtem el.

Az adaptáció során a beadott kazein egy ideig növeli a keletkező biogáz mennyiségét, majd 2,5 g kazein/400 ml bevitt fehérje esetében elérte maximumát. Ezt követően jelentős visszaesés volt tapasztalható a biogázhozamban. A rendszer egyensúlya kezdett felborulni, erre utalt a gyorsan növekvő ecetsav-koncentráció, valamint a fermentorban megjelenő propionsav és egyéb savas karakterű származékok.

Az első adaptációs kísérletek során biomasszaként felhasznált kazein vízben oldhatatlan. A baktériumok élettevékenységük folyamán bontják le exoenzimeikkel, és szerves savakat termelnek. Ez elvileg savanyítja a rendszert, azonban a rendszeres kontroll során kiderült, hogy a pH a kiindulási pH=8,2-8,4-ről nem változott jelentősen, köszönhetően az ammónia-származékok magas koncentrációjának, amelyek a fehérje

lebontása során szabadultak fel, valamint a rendszerre jellemző pufferkapacitásnak. A fermentáció során legnagyobb mennyiségben ecetsav termelődik; a degradáció első szakaszában a szerves savak alacsony koncentrációja is a lebontás optimális körülményeire utal, az acetogének és a metanogének jól tudtak együttműködni. A későbbiekben az ecetsav-szint elkezdett emelkedni, de gátló hatását még nem fejtette ki a mikroba-konzorciumra. Azonban 3,5 g kazein beadását követően a rendszer hirtelen lesavanyodott és a biogáz termelés visszaesett. Ez arra utal, hogy az acetogének gyorsabban szaporodtak, mint a metanogének, amelyek képesek lettek volna felhasználni az ecetsavat.

A kísérlet során meggyőző bizonyítékok után kutattam, amellyel igazolni tudom, hogy valóban történt akklimatizáció a vizsgálat időtartama alatt.



7. ábra: Relatív enzimaktivitás változása a kazein fermentációja során

A 7. ábra mutatja, hogy a beadott fehérje mennyiség folyamatos növelésének eredményeként a rendszerben a fermentorokban nőtt a mikrobák által termelt proteáz aktivitás. Ez azt jelenti, hogy a mikrobák elfogadták egyedüli táplálékként a fehérjét és alkalmazkodtak annak felhasználásához, nagyobb bevitt mennyiségéhez is, valamint magas biogáhozamot produkáltak (8. ábra).

5.1.2 Sertésvér lebontása

A húsiparban számos olyan mellék- és vágóhídi végtermék keletkezik nagy mennyiségben naponta, amelyek aerob lebomlása lassú és rendkívül kellemetlen szaghatással jár, egyéb ártalmatlanítása (pl. elégetés) pedig nemcsak költséges, de környezetkárosító is. A vágóhidakról évi több millió liter vért kell elszállítani megsemmisítésre. Mivel a sertésvér jelentős része víz, így a vér szállítása, majd a víz elpárologtatása is jelentős energiabefektetést igényel. Az anaerob ártalmatlanítás során nemcsak a könyezetszennyezést tudjuk kivédeni, hanem energiát is termelünk.

A sertésvér lebontása szakaszos fermentáció során nagyon gyorsan, 8-12 nap alatt végbemegy, szintén magas gázkihozatal jellemzi (8. ábra). E fermentációk közben is végeztem szerves savmeghatározást: a gyors lebontásnak köszönhetően a fermentáció első hetében ugrásszerűen megemelkedett a szerves savak mennyisége; a legnagyobb mennyiségben keletkező ecetsav mellett megjelent a propionsav is, azonban a fermentáció végére sem emelkedett az összes szerves sav-koncentráció a toxikus 5 mg/ml-es határérték fölé.

5.1.3 Húskivonat

A húskivonat közel állandó összetételű alapanyag, amely nagy fehérjetartalma miatt megfelelő szubsztrát a vizsgálatainkhoz. A lebontása mezofil szakaszos fermentáció során a vérhez hasonlóan hamar, 12-16 nap alatt végbemegy gázkihozatali eredménye megközelíti a húskivonatét (8. ábra). E fermentációk során is meghatároztam a szerves savak mennyiségét és minőségét; a gyors lebontásnak köszönhetően a fermentáció első hetében ugrásszerűen megemelkedett az ecetsav koncentrációja, de egyéb szerves savak mennyisége is megemelkedett; megjelent a propionsav, valamint a vajsav és az izovajsav is, azonban a fermentáció végére sem emelkedett az összes szerves sav-koncentráció a toxikus 5 mg/ml-es határérték fölé.

5.1.4 Növényi eredetű konyhai hulladék

A fermentáció során folyamatosan nyomon követtük a keletkezett biogáz összetételét. A kapott értékek minden esetben megfeleltek az elvártnak, a biogáz metántartalma 27 és 46 % között változott (8. ábra).

A biomasszaként felhasznált növényi eredetű konyhai hulladék már a fermentáció előtt enyhén savas karakterű volt, így folyamatos pH-kontroll volt szükséges. A

fermentáció során legnagyobb mennyiségben ecetsav termelődött ebben az esetben is. Az ecetsav mellett nem jelent meg kimutatható mennyiségben más szerves sav a fermentorokban.

Szakaszos fermentáció VDI 1X	Biogázhozam (Nml/g oTS)	Szórás (Nml/g oTS)	Metánkoncentráció (%)
Növényi eredetű konyhai hulladék	450	±3	27 – 46, átlag 42
Kazein	460	±40	30 – 64, átlag 52
Sertésvér	480	±22	34 – 58, átlag 51
Húskivonat	457	±16	33 – 62, átlag 52

8. ábra: A különböző alapanyagok fermentációja során mért biogázhozamok, valamint az átlagos metánkoncentrációk

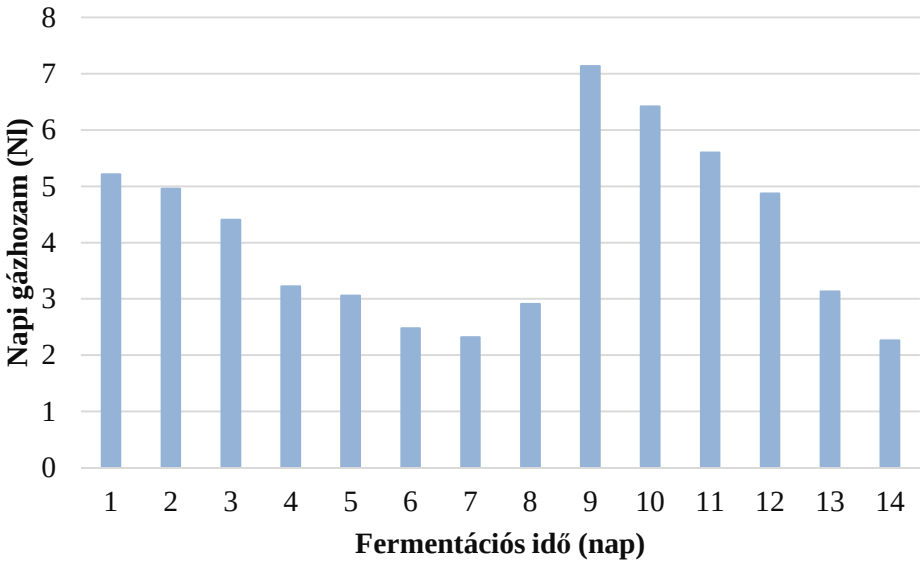
5.2 Adaptált mikrobaközösség előállítása 5 literes rátáplálásos fermentorokban

5.2.1 Kazein lebontása 5 literes rátáplálásos üzemű fermentorokban

A fermentorokat kierjedt oltóiszappal töltöttem fel, ehhez adagoltam hetente egyszer a kazein szubsztrátot, így a rendszerben levő mikrobaközösség számára az egyetlen táplálékforrás a beadagolt fehérje volt, a megtermelt biogáz is csak ebből származhat. A 9. ábrán összefoglaltam a fehérje beadagolásának változását az időben. A bevitt kazein mennyiségének emelésére csak akkor került sor, ha a szerves sav eredmények nem utaltak a rendszer instabillá válására. A megnövelt fehérjemennyiség eredményeképpen a napi gázhozamok folyamatosan emelkedtek (10. ábra). Egy héten belüli idő felbontásban azt tapasztaltam, hogy a szubsztrát beadagolását követő 1-2 napban megemelkedett a biogázhozam, majd ezt követően fokozatosan visszaesett.

Bevitt kazein mennyisége (g)	Szakasz ismétlésszáma
6,25	4
7	1
7,5	1
8	1
10	1
15	1
20	1
30	1
40	1
70	1
100	1
130	1

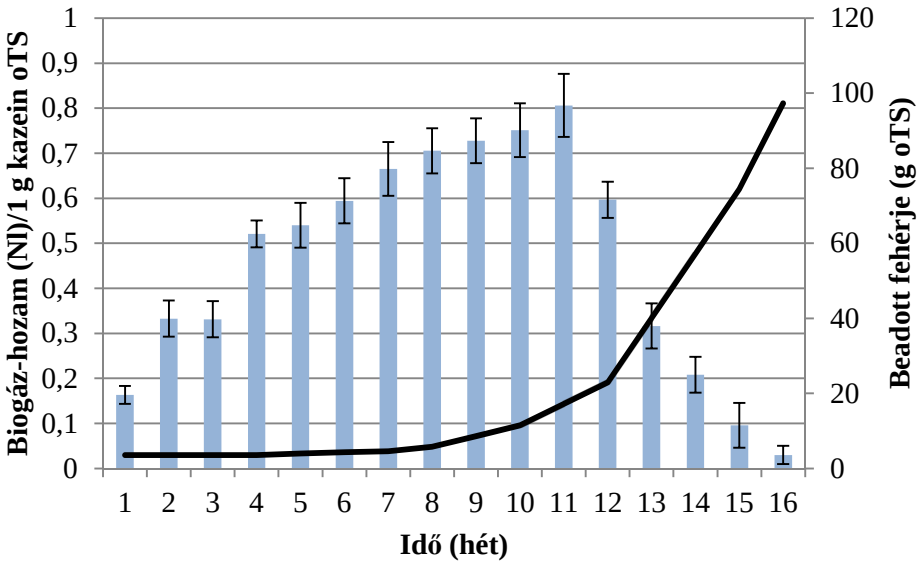
9. ábra: Az adaptáció során alkalmazott kazein mennyisége és a heti beadagolás ismétlésszáma



10. ábra: A hetente adagolt kazein fermentáció során keletkezett napi gázhozamok fluktuációja

A 11. ábrán a beadagolt kazein mennyiségének függvényében ábrázoltam az 1 gramm fehérjéből termelt biogázhozamot. Az adaptáció végeredményeként 1 gramm fehérjéből a kiindulási gázhozam 3,5-szeresét állították elő a mikrobák. A legmagasabb

biogáz hozamot 30 g/5 l beadott fehérjénél érte el a rendszer. Ezt követően jelentősen visszaesett az 1 gramm kazeinre számolt termelt fajlagos biogáz hozam. Ez azzal magyarázható, hogy a rendszerbe bevitt fehérjéből először oligo- és monomerek, majd szerves savak keletkeznek, amelyeket később a metanogén mikrobák felhasználnak saját életfolyamataikhoz és metánt állítanak elő belőlük. A proteáztermelésért azonban döntően a hidrolizáló baktériumok felelősek. Az utóbbiak számára az alacsonyabb pH sem zavaró, így jelentős szerves sav jelenlétében is képesek életfolyamataikat fenntartani. A biogáztermelés limitáló tagjai a metanogének, amelyek alacsony pH tartományban nem dolgoznak maximális sebességgel. Így amikor a hidrolizáló baktériumoknak még megfelelő a környezet és az enzimeik segítségével bontják a fehérjéket, a metanogének számára már közel sem optimálisak a feltételek a biogáz termeléshez. Tehát a mikroba közösség életét befolyásoló tényezők megismerésével viszonylag egyszerű módon tudjuk a technológia hatékonyságát javítani a mikroba közösség összetételének változtatásával.



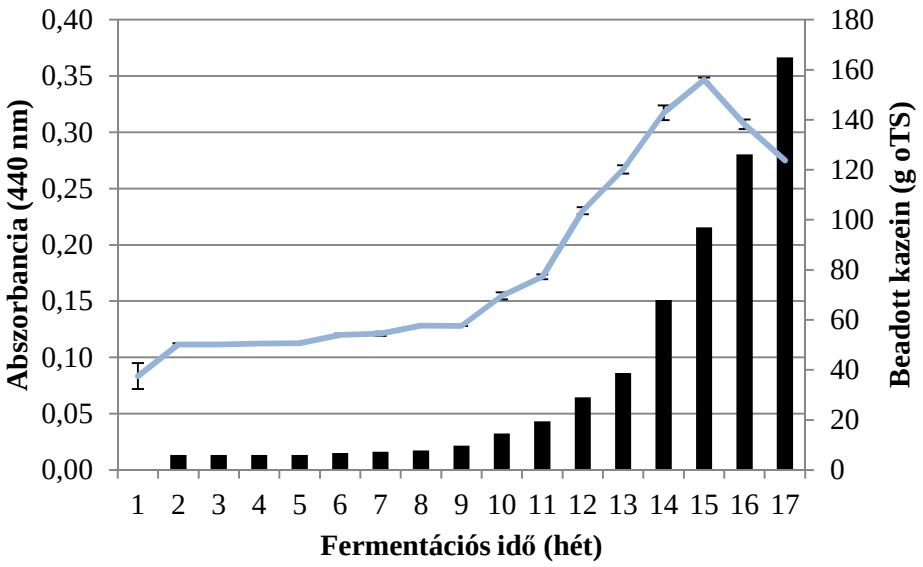
11. ábra: Az 1 gramm fehérjéből termelt biogáz hozamok (kék oszlopok) és a beadott fehérje mennyiség (fekete vonal) változása

A fehérjék lebontása aminosavakká az egyik kritikus lépése a fermentációnak és egyben a legfontosabb előrejelzője annak, hogy a fehérjegazdag szubsztrátot a mikrobák fel tudják használni, tehát a proteáz aktivitás meghatározása és nyomonkövetése a fermentáció során jó közelítést adhat a rendszer működéséről. Kazein szubsztráton a teljes

fermentációt figyelembe véve a relatív proteáz aktivitás ötszörösére emelkedett a kiindulási állapothoz képest. A 12. ábrán az enzim aktivitások átlagát tüntettem fel a bevitt kazein mennyiség függvényében. Jól látható, hogy maximális proteázaktivitás 100 gramm bevitt fehérjénél volt mérhető, ez azonban jóval nagyobb mennyiség, mint amit a gázhozamok eredményei alapján optimálisnak tekintenénk.

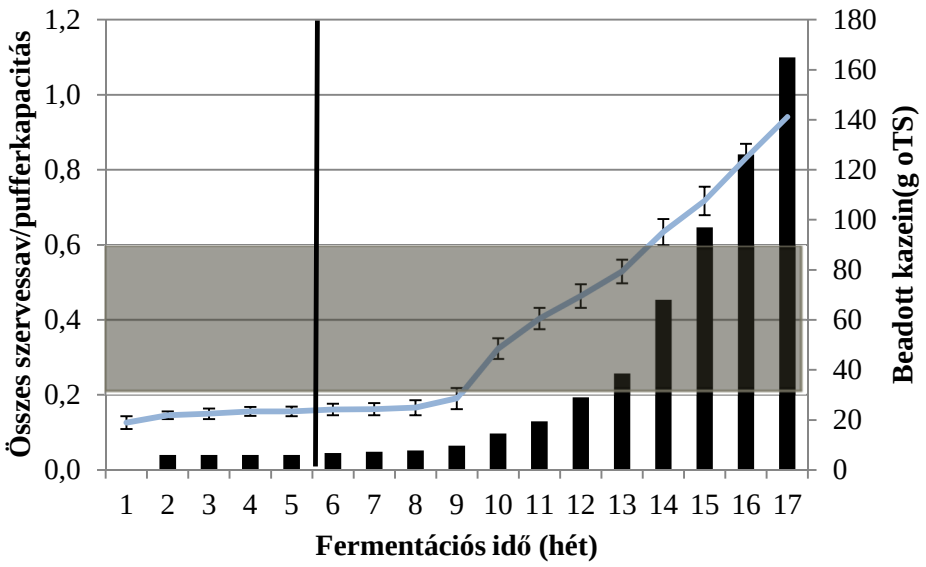
A gázhozam növekedése közvetlenül azután megindult, ahogy a fehérjeadagolást elkezdtük. Ez alátámasztja azt a korábbi feltételezésünket, hogy a fermentorban már számos olyan mikroorganizmus eleve jelen volt, amelyek képesek a fehérjéket, aminosavakat lebontani. Az adaptáció során elősegítjük, hogy ezek a mikrobák kerüljenek előnyösebb helyzetbe és ezáltal a konzorcium domináns tagjaivá válhassanak. A biogázhozam maximumát a 7-11. hét között érte el a rendszer, ekkor a mikrobák 3,5-szer több biogázt állítottak elő egységnyi fehérjéből, mint az adaptációs folyamat kezdetekor (11. ábra). A maximális gázhozamot 30 g kazein beadagolását követően figyeltem meg. A szubsztrát bevitel ez esetben is hetente egyszer történt, így a megtermelt biogáz mennyisége jelentős napi változásokat mutatott, azonban sosem esett vissza nullára. A reaktorokban maradt lebontási köztitermékek hozzájárulhattak a következő heti gázhozam eredményekhez, ez vezethetett a 6-9. hét közötti intervallumban a nyilvánvalóan túlbecsült gázhozamokhoz.

A Symons és Buswell által közölt klasszikus egyenlet szerint (1933) 1 g „átlagos” fehérjéből 0,5 Nl metán termelhető a biogáz fermentáció során. Az kazein fermentáció során termelődő biogáz átlagos metántartalma 53 % volt, az átlag biogázhozam 0,46 Nl/g oTS, ebből kiszámíthatjuk a teljes időtartamra vonatkozó átlagos metántartalmat, amely 0,25 Nl/g oTS-nek adódott.



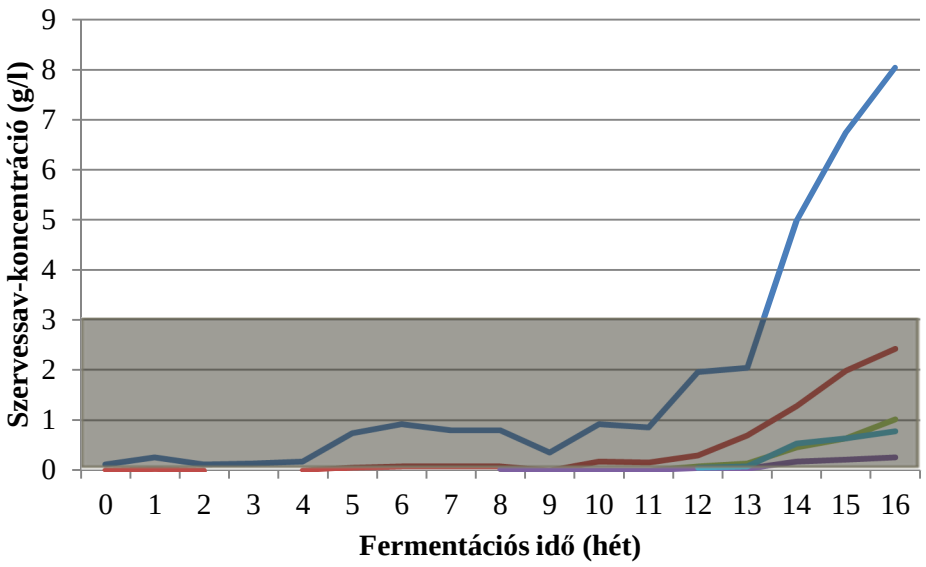
12. ábra: A proteázaktivitás (folytonos vonal) változása a bevitt kazein mennyiségének (oszlopok) függvényében

Az összes szerves sav és a pufferkapacitást Nordmann alapján határoztam meg (Nordmann, 1977) és a McGhee-formulával (McGhee, 1968) számoltam ki. Az arányszám alapján megbecsülhetjük az anaerob lebontás stabilitását (13. ábra). Ha az arányszám 0,2 alatt van, a rendszer további betáplálást igényel, míg a 0,6 feletti arány a rendszer instabilitására utal, csökkenteni kell a szubsztrátbetáplálást. A fehérje szubsztráthoz való adaptáció során csak fehérje alapanyagot kaptak a mikrobák, ezzel ösztönöztük őket, hogy azokat a metabolikus útjaikat használják, amelyek ennek az anyagnak a lebontásáért felelősek. A rendszer tűrőképességének felső határát kívántuk elsőként meghatározni a folyamatos szubsztrát mennyiség emelésével és a fermentáció közbeni paraméterek nyomon követésével. A biogáztermelés jelentős visszaesése a rendszer összeomlását mutatja, amelyre esetünkben a 11-12. héten került sor. Az összeomlás jelei közé sorolhatjuk e mellett a növekvő szerves sav koncentrációt és az összes szerves sav/pufferkapacitás arányának jelentős emelkedését. A reaktorok pH-ját folyamatosan nyomon követtük, nem találtunk jelentős változást, 8,01 és 8,32 között változott a fermentáció során, a pH módosítására nem volt szükség. A lebontási folyamat során szerves savak és ammóniumionok „termelődnek” párhuzamosan, ezzel a rendszert folyamatosan pufferelik.

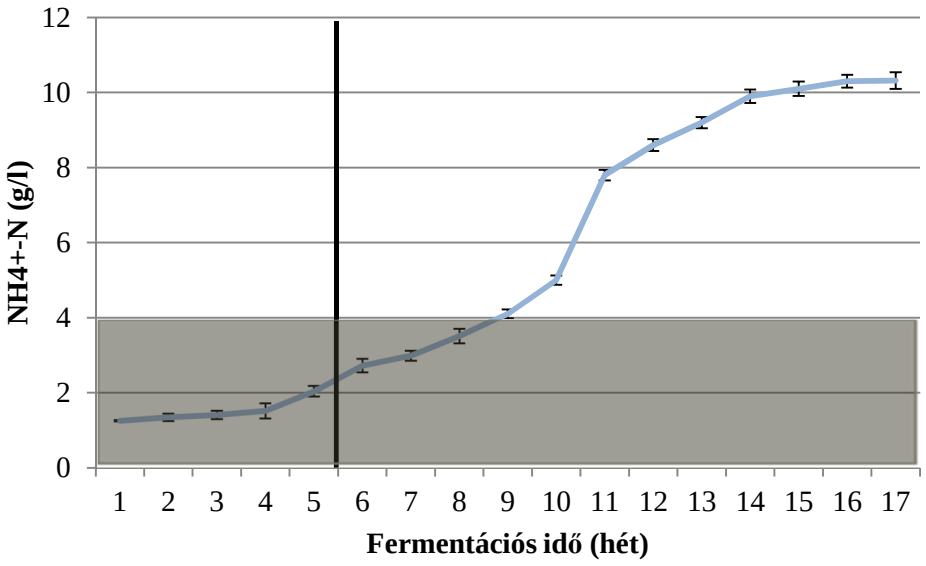


13. ábra: Az összes szerves sav és a pufferkapacitás arányának változása a bevitt kazein mennyiségének függvényében (kék vonal). A fekete oszlop a beadott kazein mennyiségét, a fekete vonal az adaptáció kezdeti fázisát, a szürke terület a szakirodalom alapján javasolt optimális tartományt jelöli.

Az adaptáció első 4-5 hetében azonos, alacsony mennyiségű fehérjét adtam a fermentorokhoz. Mielőtt emelni kezdtem a szubsztrát mennyiséget a szerves savak koncentrációját ellenőriztem, alacsony koncentrációban volt jelen az ecetsav, valamint minimális propionsav volt kimutatható a rendszerben (14. ábra), mindeközben a biogázhozam folyamatosan emelkedett. Az adaptáció ezen szakaszában a proteáz aktivitás nem növekedett jelentősen, csupán kismértékű emelkedés volt kimutatható (12. ábra). Az ecetsav koncentrációja a 13-14. héten érte el a 3 g/l határértéket, valamint számos, hosszabb szénláncú szerves sav is megjelent a reaktorban (14. ábra). Ezzel egyidőben a biogáz termelés jelentősen visszaesett (11. ábra), valószínűleg a metanogén aktivitás hanyatlásának köszönhetően. Bár a pH-ban nem állt be komolyabb változás, a szerves savak, valamint az ammónia közvetlenül képesek gátolni a biogáz előállítást.



14. ábra: A szerves savak koncentrációinak változása a kazein fermentáció során. Az ábrán az ecetsav (kék), propionsav (piros), vajsav (zöld), izo-vajsav (türkiz) és kapronsav (lila) változását tüntettem fel. A szürke terület az irodalomban javasolt megengedett tartományt jelöli.



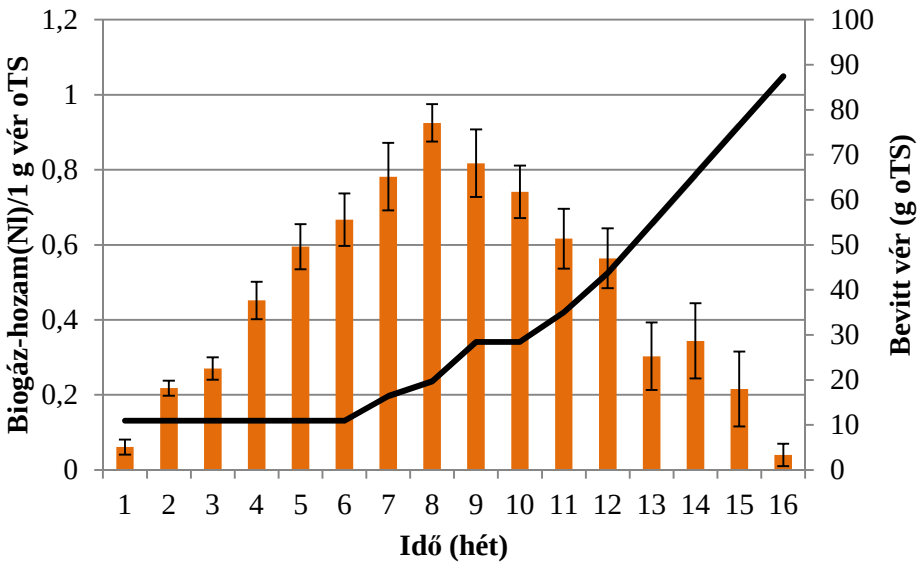
15. ábra: Az ammóniumion-koncentráció változása a fermentáció során. A függőleges fekete vonal az adaptációs szakasz végét és a terhelés növelésének kezdetét jelzi, a szürke terület a szakirodalom alapján ajánlott tartomány.

A vízoldékony NH_4^+ szintje fokozatosan emelkedett a teljes kísérlet alatt (15. ábra). Ez nem meglepő, hiszen a fehérjegazdag szubsztrátot egyedüli táplálékként kapták a mikrobák, és a lebontás eredményeként az egyik felszabaduló végtermék az ammónia. Az NH_4^+-N koncentráció elkezdett emelkedni már az adaptációs folyamat kezdeti szakaszában, majd a 9. héten meghaladta a szakirodalom által kritikusnak tartott 4 g/l koncentrációt, még mielőtt elérte a rendszer a biogázhozam maximumát. A fermentáció stabil maradt és emelkedett biogázhozamot mutatott egészen addig, amíg az ammónium koncentrációja elérte a 7-8 g NH_4^+-N/l értéket.

A kénhidrogén-tartalom a lebontás során a beadott szubsztrát mennyiségekkel egyenes arányban nőtt, a kiindulási alacsony kénhidrogén-tartalom 300 ppm volt, amely a fermentáció végére elérte az 1500 ppm-es toxikus koncentrációt.

5.2.2 Sertésvér lebontása 5 literes rátáplálásos üzemű fermentorokban

A kísérletben friss, előkezelés nélküli sertésvért használtam. A megalvadt sertésvért dekantálással elválasztottam a szérumtól és felhasználásig lefagyasztottam. A 16. ábrán a fermentáció idejének függvényében ábrázoltam az 1 g oTS vérből előállított biogáz-hozamot. Egyértelműen mutatja a diagram, hogy 20 g oTS vér betáplálásáig fokozatosan emelkedik a termelt biogáz mennyisége, majd folyamatos csökkenés figyelhető meg a biogáz-hozamban, amely a legmagasabb alkalmazott vérmennyiség beadásánál (87,4 g oTS) drasztikusan lecsökkent. A 17. ábrán a bevitt vér mennyiségének függvényében tüntettem fel a proteáz enzim aktivitással arányos abszorbanciát. A helyzet hasonló volt a kazeines méréseknél megfigyelt viselkedéshez. Bár a relatív enzimaktivitás a vizsgálat során folyamatosan emelkedett a bevitt vér hatására, ennek pozitív hatása bizonyos vérmennyiség után már nem jelentkezett a gázhozamban. Ennek azonos lehet a magyarázata a kazein-adaptációnál leírtakkal, bár az összeomlás némileg lassabb volt (18. ábra), mint azt a kazein-fermentációnál tapasztaltam. A fibrinogénen-fibrinen kívül a kicsapódott véralvadék számos fontos ásványi anyagot is tartalmazott, amelyek elősegíthették a rendszer stabilitásának fenntartását. Az adaptáció optimalizálásához és a betáplálási stratégia, esetleg stratégiák kialakításához további kísérletekre lesz szükség a jövőben.

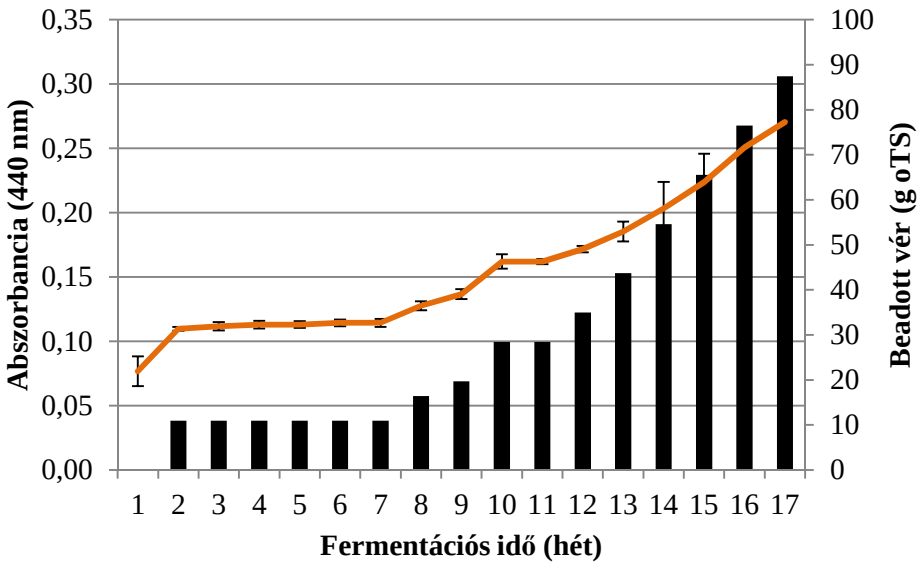


16. ábra: 1 gramm oTS vérből előállított biogáz mennyisége (narancssárga oszlopok) a beadott vér mennyiségének (fekete vonal) függvényében

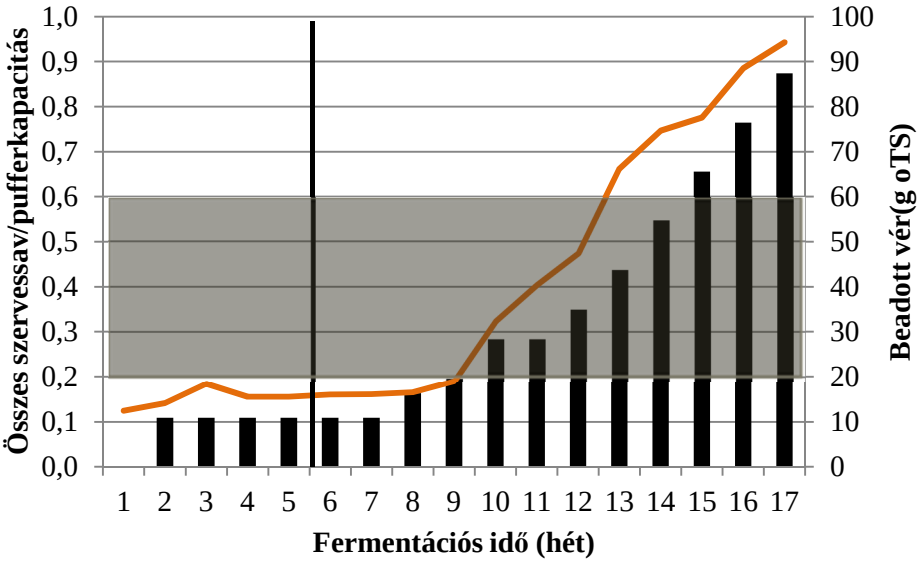
A vér anaerob lebontása során, 0,48 Nl/g oTS átlagos biogázhozamot mértem, melynek átlagos metántartalma 54 % volt. Az ezekből az adatokból számított metán termelés 0,26 Nl/g oTS-nek adódik. A legtöbb szempontból a vér lebontása a kapott eredmények alapján hasonlóan zajlott, mint a kazein fermentációja.

A fermentáció korai fázisában valószínűleg a proteázok „elérhetősége”/mennyisége volt a limitáló tényező. Később feltehetően a lebontás következtében képződött metabolitok váltak limitáló/gátló tényezővé.

Nem volt lényegi különbség az ammónia-felhalmozódásban a kazein és a sertésvér fermentációja esetén, jó közelítéssel követi a beadott fehérje mennyiségét. A kénhidrogén-tartalom a kiinduláskor ebben az esetben is 300 ppm volt, amely a fokozatosan növelt fehérje betáplálás következményeként a lebontás végére elérte az 1800 ppm koncentrációt.



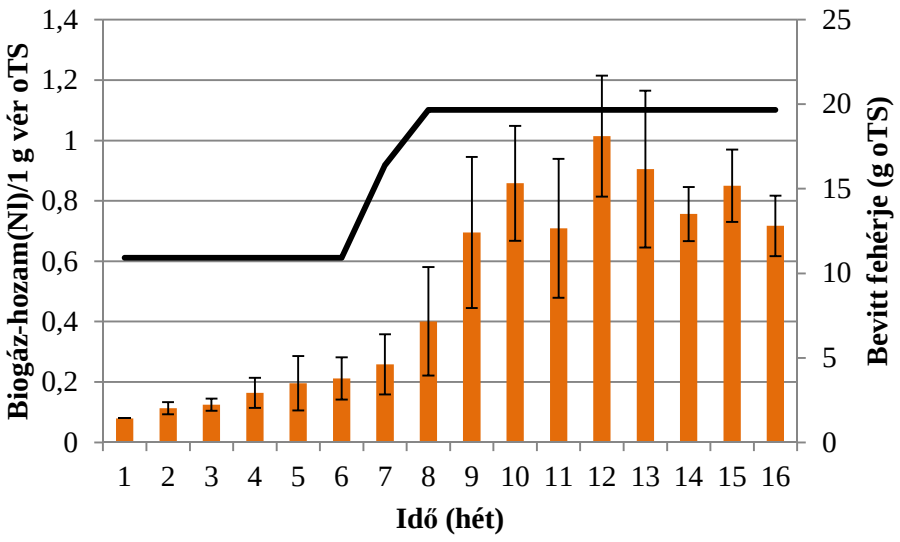
17. ábra: Az enzimaktivitás (narancssárga vonal) változása a beadott vér mennyiségének (fekete oszlopok) függvényében



18. ábra: Az összes szerves sav és a pufferkapacitás arányának változása (narancssárga vonal) a beadott vér mennyiségének (fekete oszlopok) függvényében. A függőleges fekete egyenes az adaptációs szakaszt és a terhelési szakaszt választja el, a szürke terület a szakirodalom alapján ajánlott értékhatárokat jelzi.

5.3 Biogáztermelés fenntartása rátáplálásos üzemű fermentorokban

Korábbi kísérleteim arra irányultak, hogy megállapítsam, szervesanyaggal meddig terhelhetőek a fehérje monoszubsztráttal táplált fermentorok. További kérdés volt, hogy van-e lehetőség az ilyen rendszerek hosszabb ideig történő fenntartására, folyamatos biogáz termelő technológia kialakítására fehérje monoszubsztrát esetén. A korábbiakban számos paraméter változását tanulmányoztam különböző alapanyagok esetében, ebben a kísérletben igyekeztem megtalálni azt a pontot, amikor a fermentáció még kiegyensúlyozott, a fenntartható tartományban van, és a biogáztermelés hatékonynak tekinthető. A fenntarthatóság vizsgálatakor ugyanazokat a térterheléseket alkalmaztuk a hétről-hétre végzett fehérje tápláláskor, amelyeket korábban az 5 literes rátáplálásos fermentációk esetében optimálisnak találtam. Ez az érték a vérkoagulátum esetén 19,7 g oTS volt. Ezt a mennyiséget két hónapon keresztül adagoltam hetente a reaktorokba az öt hetes adaptációs szakasz után (19. ábra). A fermentorokban a pH a korábbiakhoz hasonlóan 8,0 és 8,4 között maradt, így nem volt szükség a pH beállítására/módosítására. Az összes szerves sav/puffer kapacitás aránya sem változott számottevően, 0,13 és 0,2 között maradt a vizsgálat teljes időtartama alatt. A termelt gáz metán tartalma gyakorlatilag állandó volt 54-58 % között, azonban a kénhidrogén-tartalom a kiindulási 300 ppm-ről (2. hét) a 16. hétre 1600 ppm-re emelkedett. Az NH_4^+-N tartalom szintén emelkedett a fenntartást vizsgáló kísérlet során, azonban korántsem olyan mértékben, mint a kénhidrogén; az NH_4^+-N koncentráció stabilizálódott 8-10 g/l között a vizsgálat 8-16. hetében. A konstans betáplálás időtartama alatt az átlagos metántermelés 0,447 l CH_4/g oTS, amely jó egyezést mutat a szakaszos fermentációs tesztek által meghatározott 0,42 l CH_4/g oTS eredménnyel. Ez egyben azt is mutatja, hogy egy megfelelően adaptált mikrobakonzorcium képes a szubsztrát jó hatékonyságú átalakítására (átalakítási hatékonyság ebben az esetben 89 %-a az elméleti maximumnak).

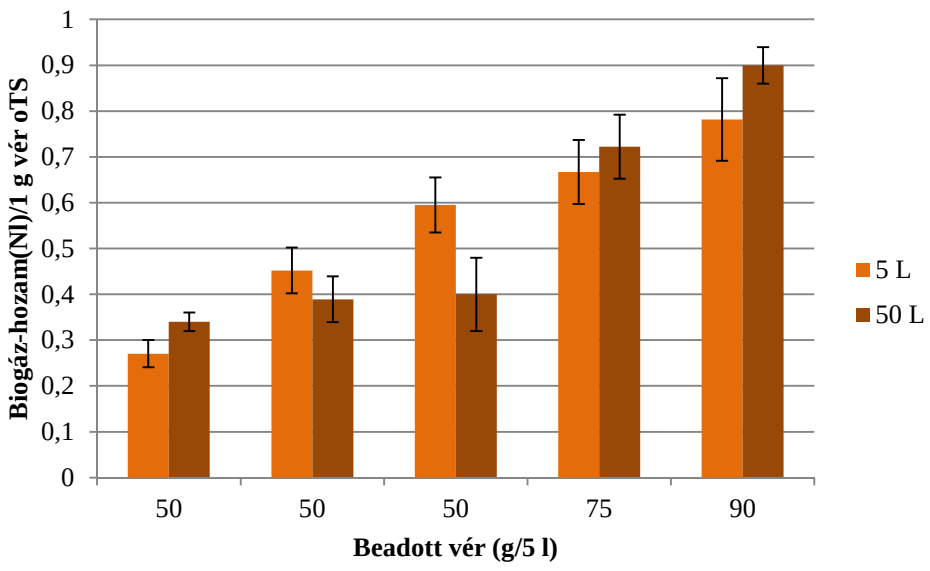


19. ábra: Átlagos heti gázhozam-értékek (narancssárga oszlopok) a bevitt vér mennyiségének (fekete vonal) függvényében a fenntarthatósági kísérletek során.

5.4 Léptéknövelő kísérlet

A léptéknövelés során vizsgálni kívántam, hogy a korábbi fehérjelebontási kísérletek a fermentor méretétől függetlenül is megvalósíthatóak-e. A kísérletekhez az 5 literes fermentorokhoz nagyon hasonló felépítésű és működési elvű, 50 literes, kisüzemi reaktorokat használtam. Alapanyagként a már bemutatott vérkoagulátumot használtam.

A fermentációról általánosan elmondható, hogy hasonló hatékonyságú és közel azonos biogáz hozamot produkált, mint az 5 literes fermentorokban megfigyelhető értékek (20. ábra).



20. ábra: Biogázhozam-értékek 5 és 50 literes fermentorok esetében a bevitt vér mennyiségének függvényében

5.5 Folyamatos üzemű fermentációk

5.5.1 Húskivonat folyamatos üzemű fermentációja

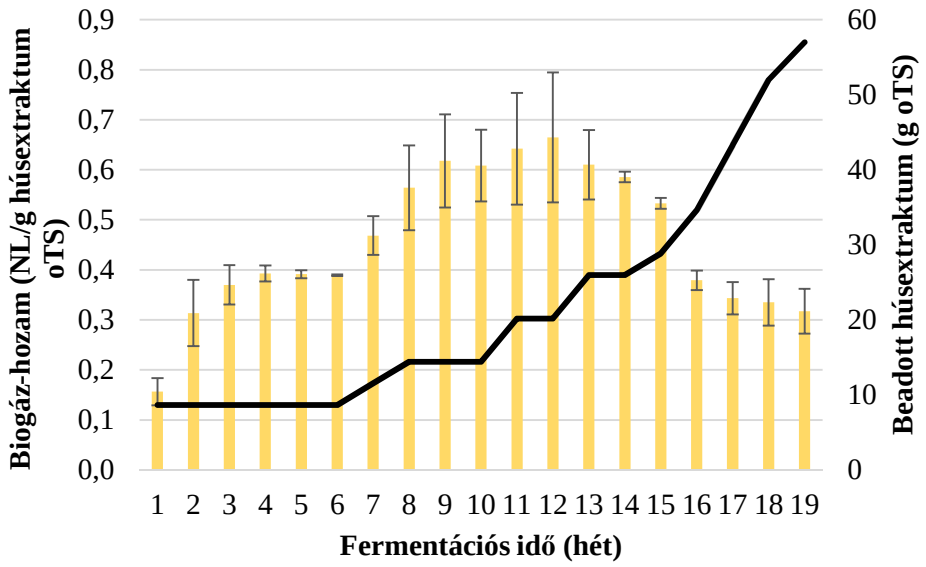
A további vizsgálatokhoz használt húskivonat fehérjetartalma viszonylag magas (67 %), de a lipidtartalma elhanyagolható (kimutatási határérték alatti) (5. ábra). Protein tartalmát tekintve a két másik, magas fehérjetartalmú alapanyag közé esik. A beadagolás ebben az esetben is heti rendszerességű volt.

A beadagolást követő első és második héten már emelkedő biogázhozam volt kimutatható, mindeközben a metántartalom is lassú növekedésnek indult. A biogázhozam maximumát a 9-12. hét között érte el a rendszer, ekkor a mikrobák négyszer több biogázt állítottak elő egységnyi fehérjéből, mint az adaptációs folyamat kezdetekor (21. ábra). A maximális gázhozamot 20,2 g oTS húskivonat beadását követően figyeltem meg, bár itt már a rendszer valószínűleg elérte a lebontási maximumát, mivel a fermentorok gázhozama alig emelkedett a 9. és a 12. hét között, miközben a fehérjebevitelt 14,4 g oTS-ről 20,2 g oTS-re emeltem. A reaktorokban maradt szubsztrát a korábbiakhoz hasonlóan itt is hozzájárulhatott a következő heti gázhozam eredményekhez, ez vezethetett a 9-12. hét közötti intervallumban a nyilvánvalóan túlbecsült gázhozamokhoz.

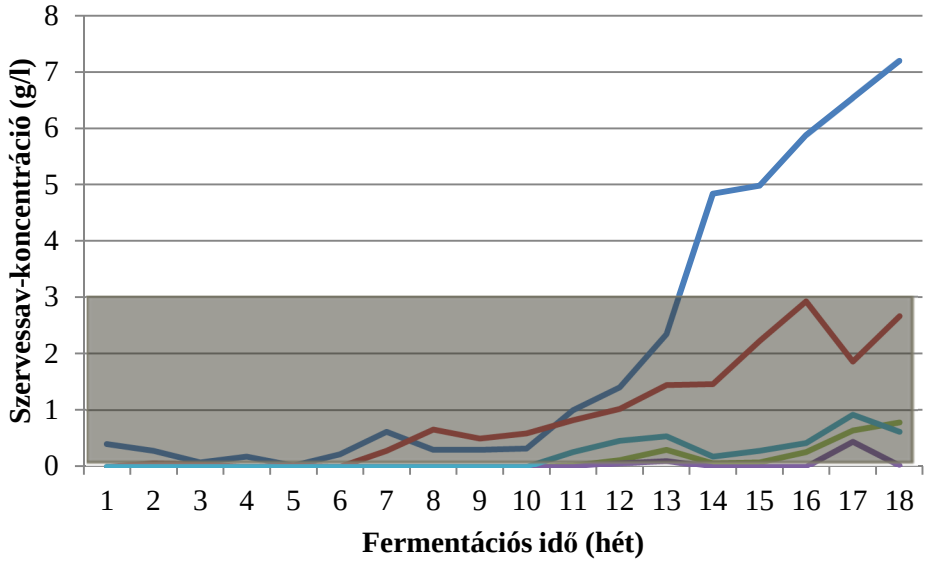
Az átlagos metántartalom a fermentáció során 58 % volt, az átlag biogázhozam 0,46 Nl/g oTS, ebből kiszámíthatjuk a teljes időtartamra vonatkozó átlagos metántartalmat, amely 0,27 Nl CH_4/g oTS-nek adódott.

Az adaptáció első 5 hetében azonos, kis mennyiségű fehérjét adtam a fermentorokhoz. Mielőtt emelni kezdtem volna a szubsztrát mennyiséget a szerves savak koncentrációját ellenőriztem: alacsony koncentrációban volt jelen az ecetsav, valamint minimális, 0,1 g/l alatti propionsav volt kimutatható a rendszerben, mindeközben a biogázhozam kismértékben emelkedett. A propionsav koncentrációja a 12. héten átlépte az 1 g/l-es értéket, továbbá az ecetsav koncentrációja a 13. héten elérte a 3 g/l határértéket, valamint a 10. héttől folyamatosan számos, hosszabb szénláncú szerves sav is megjelent a fermentorban (22. ábra). Ezzel egyidőben a biogáz termelés fokozatosan csökkent, először kisebb mértékben, majd a folyamat felgyorsult. Az összes szerves sav/pufferkapacitás aránya a kiinduláskor nagyon alacsony szintet mutatott (0,13), majd a betáplálás elkezdésétől a 16. hétig csak minimális mértékben változott – köszönhetően a fermentációs iszap jó puffer kapacitásának (23. ábra). Bár a pH-ban nem állt be jelentősebb változás, a szerves savak, valamint az ammónia közvetlenül is képesek gátolni a biogáz előállítást – valószínűleg ennek tudható be, hogy a biogáz hozam a 16. hét után hanyatló fázisába ért. Az NH_4^+-N szintje fokozatosan emelkedett a teljes kísérlet alatt, jól követve a beadagolt szubsztrát mennyiségét. A fermentáció stabil maradt és emelkedett biogázhozamot mutatott egészen addig, amíg a rendszer elérte a 7 g NH_4^+-N/l koncentrációt (24. ábra).

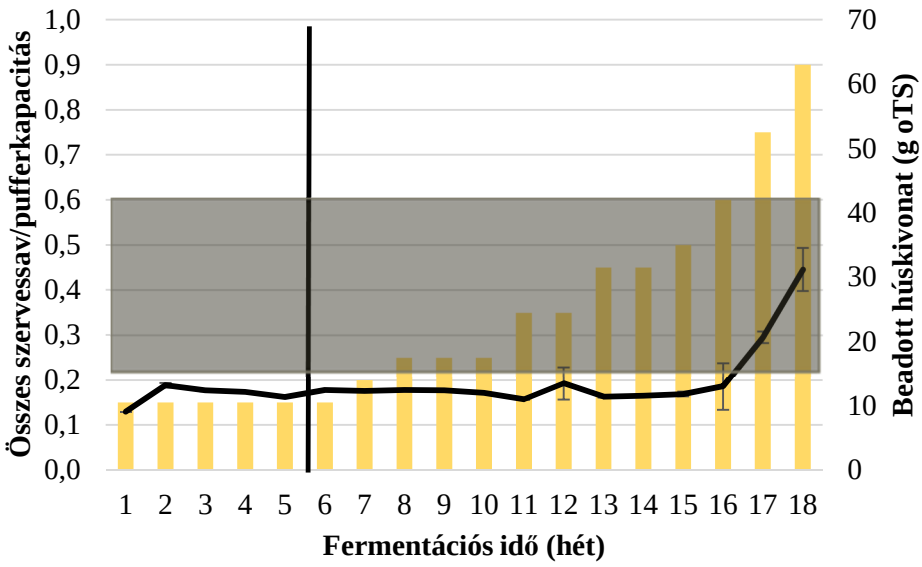
A kénhidrogén-tartalom ebben az esetben is alacsony, 250 ppm-es koncentrációról indult, amely a lebontás végére elérte az 1700 ppm-es értéket.



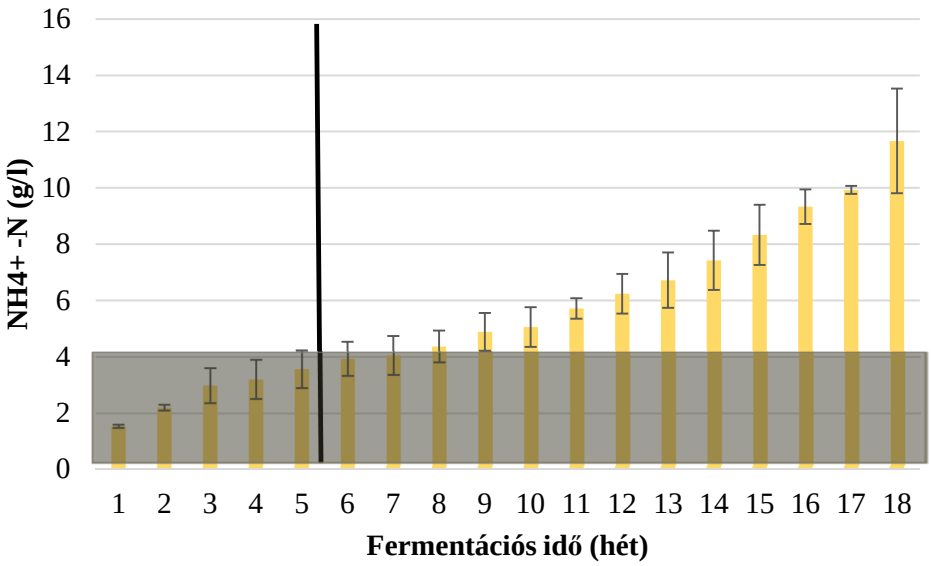
21. ábra: Átlagos heti gázhozam-értékek (sárga oszlopok) a bevitt húskivonat mennyiségének (fekete vonal) függvényében.



22. ábra: A szerves savak koncentrációinak változása a húskivonat fermentáció során. Az ábrán az ecetsav (kék), propionsav (piros), vajsav (zöld), izo-vajsav (türkiz) és kapronsav (lila) változását tüntettem fel. A szürke terület az irodalomban javasolt megengedett tartományt jelöli.



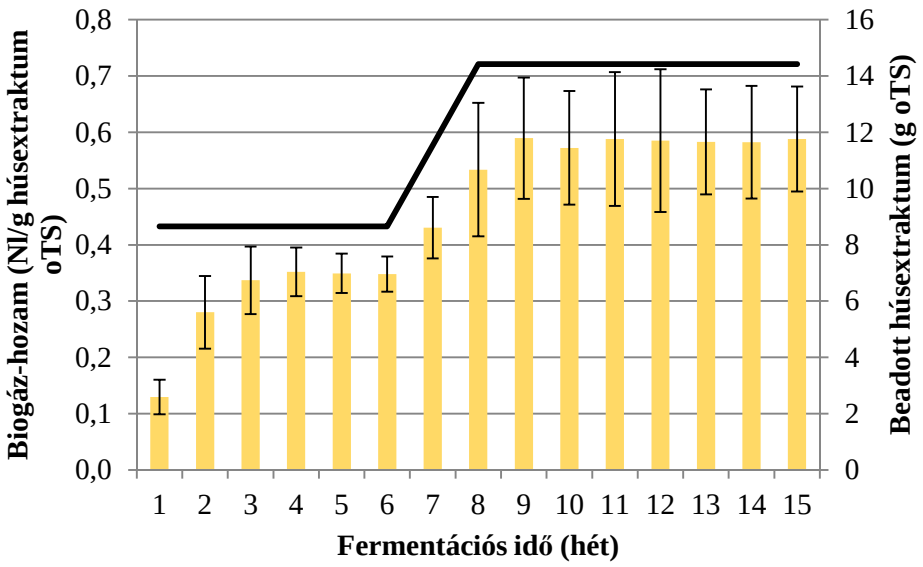
23. ábra: Az összes szerves sav és a pufferkapacitás arányának változása (fekete vonal) a húskivonat adaptálás és terhelés szakaszában (sárga oszlopok). A függőleges fekete vonal az adaptációs szakasz végét és a terhelés növelésének kezdetét jelzi, a szürke terület a szakirodalom alapján ajánlott tartomány.



24. ábra: Az ammóniumion-koncentráció változása a húskivonat fermentáció folyamán. A függőleges fekete vonal az adaptációs szakasz végét és a terhelés növelésének kezdetét jelzi, a szürke terület a szakirodalom alapján ajánlott tartomány.

5.5.2 Biogáztermelés fenntartása folyamatos üzemű fermentorokban - Fenntartási kísérletek húskivonattal

A sertésvérrel végzett kísérletek eredményeinek teszteléseként a húskivonattal is elvégeztem a fenntartási vizsgálatot. Célom volt, hogy további adatokat gyűjtsek arra vonatkozóan, melyek a legjobban használható paraméterek a rendszer pillanatnyi állapotának megállapítására. A folyamatos üzemű fermentációk fenntarthatóságának vizsgálatához ugyanazokat a térterheléseket alkalmaztam hétről-hétre, mint amit a korábbi 5 literes rátáplálásos fermentációk esetében optimális értéknek határoztam meg. A korábbi kísérletek tapasztalata alapján olyan fehérje koncentrációt kívántam választani a fenntartáshoz, amelynél lehetőleg csak kismértékű káros köztitermék felhalmozódás figyelhető meg a rendszerben, ez az érték a 14,4 g oTS húskivonat volt. Ezt a mennyiséget két hónapon keresztül hetente adagoltam a reaktorokba a „szokásos” öt hetes adaptációs szakasz után, melynek során a bigázhozamok hasonlóan alakultak az előző kísérletekben mért eredményekhez (25. ábra). A fermentorokban a pH a kiindulási 7,8-ról rövid idő alatt 8 fölé emelkedett és a fermentáció végére 8,35-8,41 értéken stabilizálódott, így nem volt szükség a pH beállítására-módosítására. Az összes szerves sav/puffer kapacitás aránya sem változott számottevően a betáplálás megkezdését követően, 0,14 és 0,2 között maradt a vizsgálat teljes időtartama alatt. A termelt gáz metántartalma gyakorlatilag állandó értéken volt 50-54 % között, azonban a kénhidrogén-tartalom a kiindulási 200 ppm-ről (1. hét) a 15. hétre 850 ppm-re emelkedett. Az NH_4^+-N tartalom szintén emelkedett a fenntartást vizsgáló kísérlet során, a koncentráció stabilizálódott 4,5-5 g/l között a vizsgálat 8-15. hetében. A konstans betáplálás időtartama alatt (9-15. hét) az átlagos metánkoncentráció 53 % volt, az átlagos metánhozam pedig 0,456 l CH_4/ g oTS, amely jól egyezik a szakaszos fermentációs tesztekben meghatározott 0,457 l CH_4/g oTS eredménnyel.



25. ábra: A heti átlagos biogázhozam értékek (sárga oszlopok) változása a beadott szubsztrát mennyiségének (fekete vonal) függvényében.

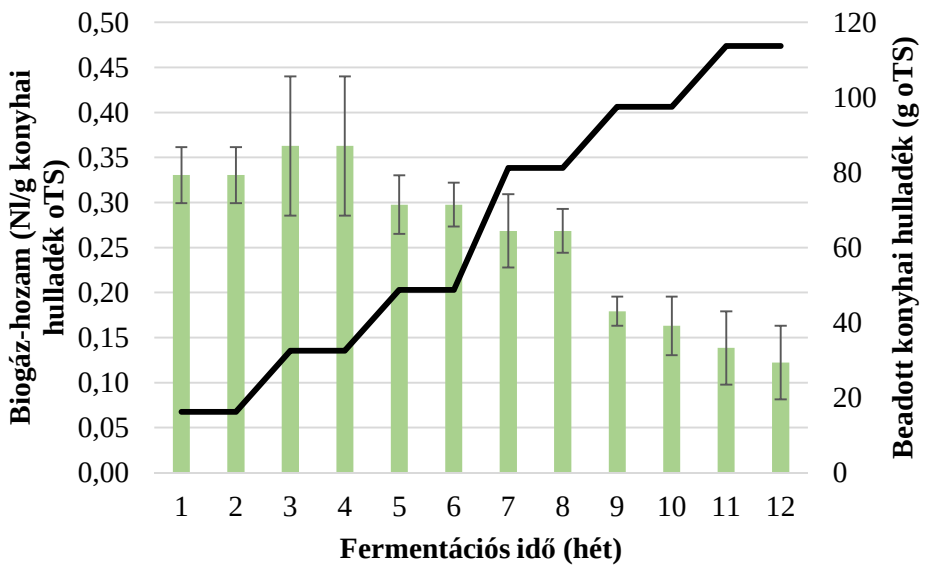
5.5.3 Növényi eredetű konyhai hulladék folyamatos üzemű fermentációja

A kísérlethez alkalmazott növényi eredetű konyhai hulladék összetétele alapvetően eltér a többi, magas fehérjetartalmú szubsztráttól, azonban C/N aránya még így is messze elmarad a szakirodalomban ajánlott 20-30:1-től (5. ábra). A beadagolás ebben az esetben is heti rendszerességű volt.

A szubsztrát beadagolást követő első hónapban emelkedő biogázhozam volt jellemző, miközben a metántartalom is növekedésnek indult. A biogázhozam maximumát a 3-4. hét között érte el a rendszer, ezt követően először lassabb, majd gyorsuló tempóban hanyatlott a fermentációs aktivitás. A maximális gázhozamot 32,5 g oTS növényi eredetű konyhai hulladék beadását követően figyeltem meg (26. ábra). Az átlagos metán tartalom a fermentáció során 42 % volt, az átlag biogázhozam 0,26 Nl/g oTS, ebből kiszámíthatjuk a teljes időtartamra vonatkozó átlagos metántartalmat, amely 0,11 Nl CH_4/g oTS-nek adódott.

A beadott szubsztrát dózisokat kéthetente emeltem, miután a szerves savak koncentrációját ellenőriztem. Általában alacsony koncentrációban volt jelen az ecetsav, valamint minimális, 0,1 g/l alatti propionsav volt kimutatható a rendszerben, mindeközben

a biogázhozam és a metántartalom emelkedett. A propionsav koncentrációja csak a 11. héten lépte át az 1 g/l-es értéket, és az ecetsav koncentrációja is csak lassan emelkedett, a 10. héten érte el a 3 g/l határértéket. Ebben az esetben nem jelentek meg hosszabb szénláncú szerves savak a fermentáció ideje alatt. Az összes szerves sav/pufferkapacitás aránya a kiinduláskor nagyon alacsony szintet mutatott (0,13), majd a 12. hétig jelentős mértékben változott – köszönhetően pufferkapacitás drasztikus csökkenésének. Ebben az esetben a pH a kiindulási 8,1-ről a fermentáció végére 6,9-re csökkent, annak ellenére, hogy enyhe lúg hozzáadásával a 8. héttől (pH=7,66) minden héten korrigáltam a pH-t. Az NH_4^+-N szintje lényegében nem változott a teljes kísérlet alatt. A kénhidrogén-tartalom a lebontás végére alig haladta meg a kiindulási értéket, 200 ppm-ről 250 ppm-re nőtt.



26. ábra: A heti biogázhozam értékek (zöld oszlopok) változása a beadott szubsztrát mennyiségének (fekete vonal) függvényében

5.6 Metagenomikai analízis

5.6.1 A metagenomika kivitelezése

A metagenom-szekvenálás nyers adatainak szűrése után több száz mikroorganizmust azonosítottunk. Az elemzés pontossága érdekében szekvencia-adatbázisokban ezekre a fajokra az összeszerelés nélküli leolvasásokat újból ráillesztettük,

ugyanis az egyes leolvasások összeszerelése során keletkezett kontigok hibákat tartalmazhatnak. Az összeszerelés nélküli adatok jól alátámasztották az eredeti eredményeket.

5.6.2 A metagenomikai vizsgálatok eredménye a kiindulási mintákban

Az adatok szerint a leoltásnál vett növényi eredetű konyhai hulladékot, kazeint, vért, illetve húskivonatot tartalmazó oltóiszappal leoltott minták mikroorganizmus-összetétele között nincs szignifikáns különbség, a négy fermentor-populáció összetétele hasonló, a kiindulási körülmények megfelelnek a normál, azaz a fehérjementes fermentorok populáció-összetételének, mind a Bacteria, mind az Archaea doménen belül. Ez érthető, hiszen oltóiszapként normál (növényi alapanyaggal és trágyával etetett) biogáz fermentorból származó iszapot használtam fel, ennek mikroba közösségét adaptáltam a növekvő mennyiségű fehérjéhez.

Mind a négy fermentor kezdeti populáció eloszlása a Bacteria doménen belül jó egyezést mutat az irodalomból ismert hasonló fermentorok populáció összetételével. Az általunk vizsgált fermentorokban a Clostridia (49-50 %) és a Bacilli (12-14 %) osztályba tartozó fajok voltak túlnyomó többségben. A fermentorok kiindulási populáció összetétele hasonló, ezek közül a leggyakoribb fajokat sorolja fel a 27. ábra. Actinobacteria osztályból két faj, a *Slackia heliotrinireducens*, és a *Bifidobacterium longum* volt nagy mennyiségben megtalálható az általunk vizsgált fermentorokban. A *S. heliotrinireducens* egy Gram-pozitív, anaerob bakterium, ez a faj képes a nitrát ammóniává redukálására, amennyiben elektron donor (H_2, hangyasav) van a rendszerben, továbbá metabolikus aktivitása révén képes ecetsavat, és vajsavat is előállítani. Ezen belül legnagyobb számban a *Clostridium thermocellum* fordult elő. Ez a faj számos extracelluláris celluláza segítségével képes a cellulózt bontani, melyből szerves savakat, majd etanolt állít elő. A *C. thermocellum* faj mellett nagy mennyiségben találtunk *C. cellulolyticum, C. saccharolyticum, C. kluyveri* fajokat, amelyek ugyancsak rendelkeznek cellulolitikus aktivitással. A *Desulfitobacterium hafniense* egy anaerob cellulóz fermentáló baktérium, mely cellulózból acetátot és etanolt állít elő. A *Syntrophomonas wolfei* előszeretettel fermentál hosszú láncú zsírsavakat és társkultúrában képes szaporodni a metanogén Archaea-kal. Nagy mennyiségben találtunk *Pelotomaculum thermopropionicum* baktériumokat, melyek hasonlóan a *S. wolfei*-hez szintrópiában élnek a metanogénekkel. Ez a szintrópikus kapcsolat fontos szerepet játszik a szerves anyagok metánná való átalakításában. Két fém-redukáló baktérium is található a

kezdeti populációban, az *Alkaliphilus metalliredigens*-t és a *Desulfotomaculum reducens*-t. Ezek a fajok tejsavat és acetátot hasznosítanak.

Az eredményeket röviden összegezve megállapíthatjuk, hogy a kiindulási mikroba közösség összetétele megfelelt a cellulóz alapú szubsztráton nevelt mikrobák halmazának.

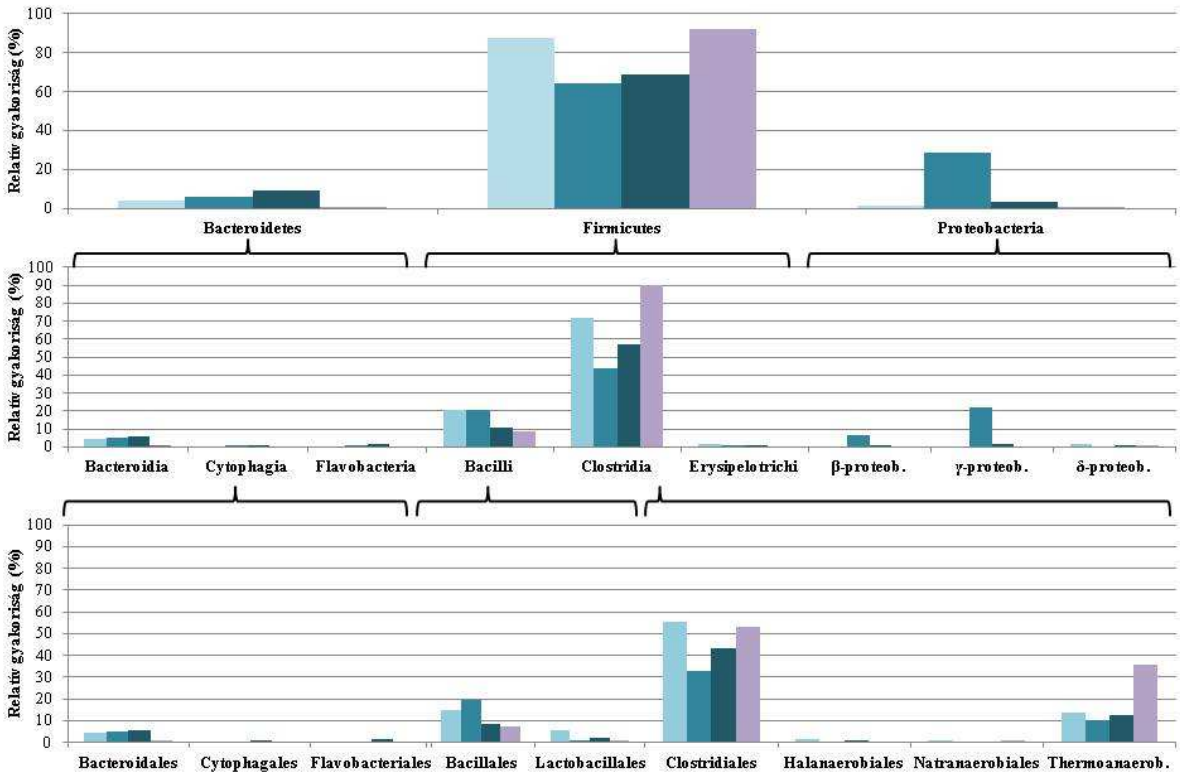
Fajnév	**Abundancia**
Candid. Cloacamonas acidaminovorans	596
Clostridium thermocellum	295
Alkaliphilus metalliredigens	277
Bacillus cereus	230
Desulfitobacterium hafniense	219
Alkaliphilus oremlandii	184
Syntrophomonas wolfei	155
Clostridium kluyveri	143
Symbiobacterium thermophilum	140
Enterococcus faecalis	128
Caldicellulosiruptor saccharolyticus	127
Clostridium cellulolyticum	125
Clostridium phytofermentans	125
Desulfotomaculum reducens	122
Pelotomaculum thermopropionicum	121

27. ábra: A kiindulási populáció leggyakoribb fajai és abundanciaértékeik

5.6.3 A metagenomikai vizsgálatok eredménye kazein alapanyagon

Megvizsgáltam a kazein szubsztrát hatását is a metán előállító mikroba közösségre. A kazein fermentációja során – a teljesebb összkép érdekében – a kiindulási, 5., illeve 11. heti mintavételen túl, egy átmeneti – 8. heti – minta metagenom analízise is megtörtént. Ez utóbbi a 30. és 31. ábrán sötétkék színnel ábrázolt, míg a végső állapotot a lila színű oszlopok reprezentálják. A kazein a vizsgálatok alapján részben eltérő összetételű közösség kialakulását eredményezte a vér fehérjével táplált fermentorokkal

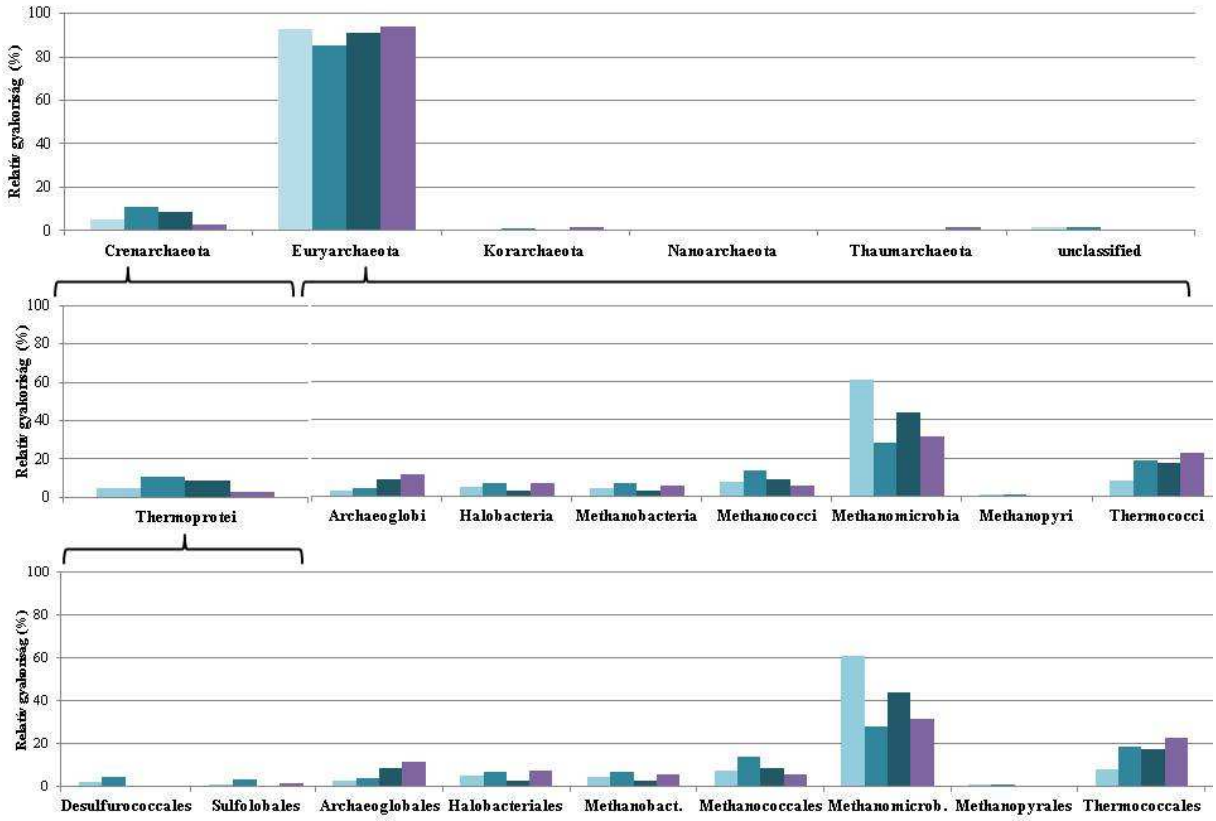
összehasonlítva. A fermentorban maradt növényi szubsztrát és a család tagjainak spórázó képessége lehetővé teszi Clostridia osztály egyes tagjainak fennmaradását, azonban a nagy mennyiségű fehérje átalakítja a közösség összetételét. A véres mintához hasonlóan itt is az *Alkaliphilus metalliredigens* faj nagy gyakorisággal jelenik meg a Clostridium fajok mellett. Egyes Clostridium fajok fehérje bontására is képesek. A kazein bontásból származó aminosavakat képesek felhasználni a korábban tárgyalt (2.3.2. fejezet) Stickland-reakció segítségével, mely az aminosav-felhasználó mikrobákra jellemző. A fermentorban fehérjebontó Clostridia fajokon kívül találtam más rendszertani csoportok képviselőit is, amelyek fehérjebontásra képesek (28. ábra).



28. ábra: A kazein adaptáció során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten a Bacteria doménben

A Bacteroidetes, valamint a Proteobacteria törzs tagjai hasonló változást mutattak, mint a vér fehérje fermentáció során. Kiemelkedő különbség mutatkozott azonban a

Firmicutes törzsön belül, amely végigkövethető a rendszertani kategóriákon lefelé haladva: a kiindulási közösségben való magas előfordulás után az 5. heti mintában az arányuk csökken, majd a fermentáció végére a mennyiségük ismételten megemelkedik. Ennek a jelenségnek a magyarázatához faj szintű elemzésre volt szükség, mely során kiderült, hogy a kiindulási clostridiák döntően szénhidrát bontók voltak, protein hasznosítók csak viszonylag kis számban fordultak elő. Mivel a fermentáció során szénforrásként kizárólag fehérjét juttattunk a rendszerbe, a szénhidráton élő populáció hamar lecsökkent, számos faj kipusztult a fermentorból, ezzel párhuzamosan a fehérje bontók aránya jelentősen megnőtt. Az 5. heti mintában arányuk már magas, és fokozatosan háttérbe szorítják a szénhidrát bontó Clostridia csoport tagjait. A véres fermentációhoz hasonlóan a Thermoanaerobacterales aránya is megnőtt a végső populációban.

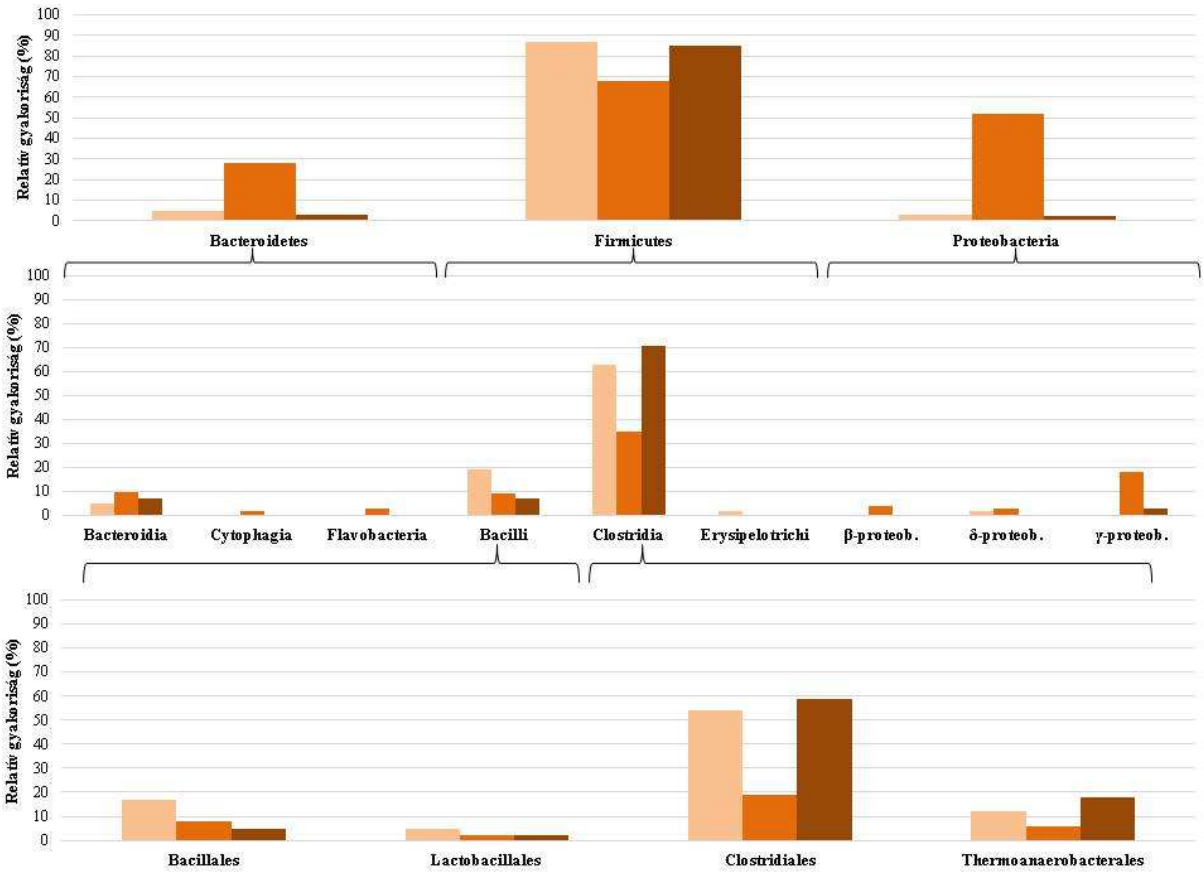


29. ábra: A kazein adaptáció során Archaea doménen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten

A vér alapanyagnál tapasztaltakhoz nagyon hasonló eredmények figyelhetők meg a kazein esetében is. Az Archaea doménen belüli változásokban alig mutatkozik számottevő eltérés. Az Euryarcheotá-k domináltak ebben az esetben is a vizsgált mintákban az Archaea közösség tekintetében, azonban a vér fermentáció végső állapotánál magasabb relatív abundanciát mutattak. Ezen törzsön belül itt is a Methanomicrobia osztály tűnt a leggyakoribbnak, azonban nem volt kimutatható a vér fehérje fermentációhoz hasonló visszaesés a fermentáció utolsó szakaszában (29. ábra).

5.6.4 A metagenomikai vizsgálatok eredménye sertésvéren

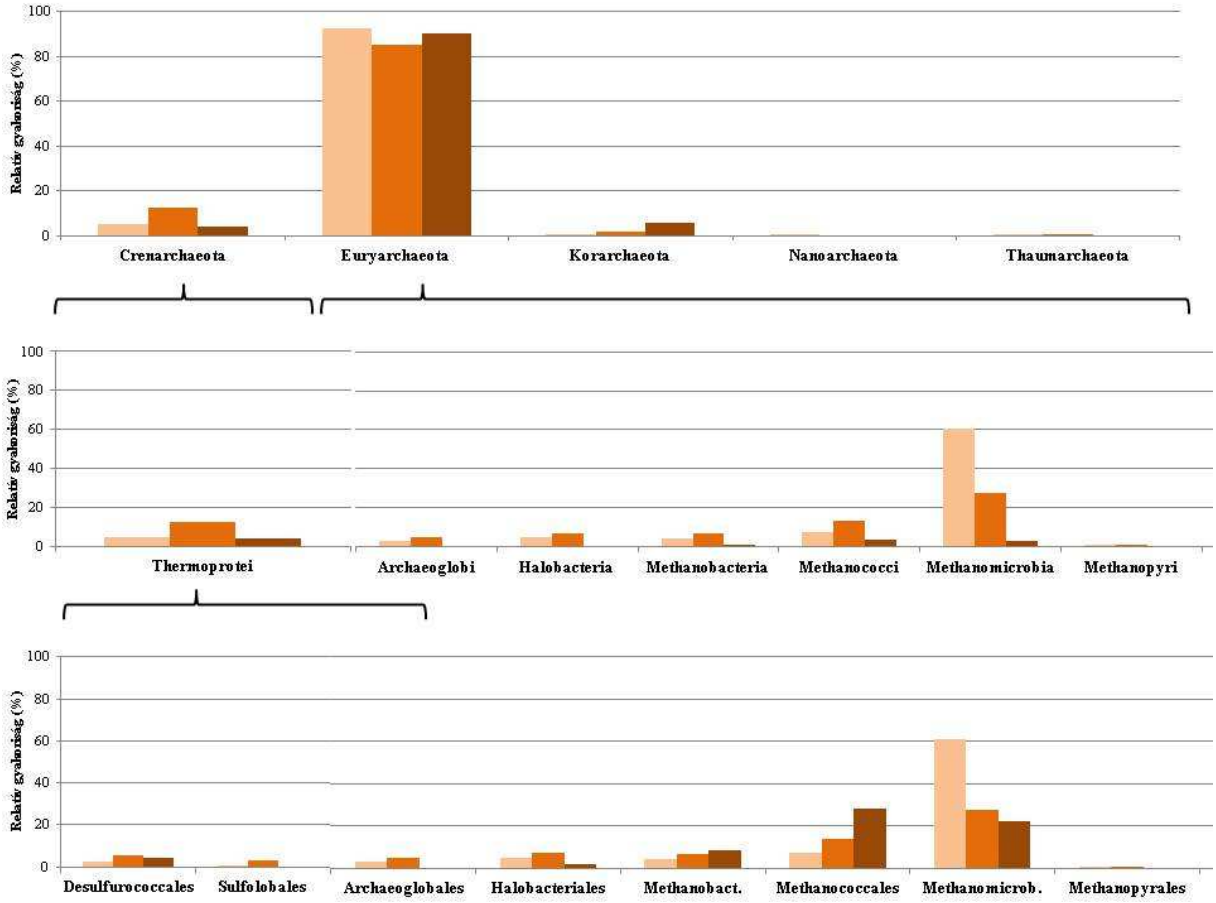
A sertésvér, mint egyedüli szén- és energiaforrás a biogáz termelő baktérium közösség számára, jól használható alapanyagnak bizonyult a kísérlet során. A fermentáció kiindulási mikroorganizmus közössége – az ábrákon a legvilágosabb színárnyalatú oszlopok – jelentős változáson ment keresztül az adaptáció során. A kiindulási populáció rendszertani összetételét az előzőekben bemutattam. Az 5. heti populáció – a közép színárnyalatú oszlopok – az 5. heti mintavétel eredményeit tükrözi, ebben az időszakban az adaptáció felfutó szakaszában volt a rendszer. Az adaptáció eredményeként kiemelkedően megugrott a Proteobacteriumok aránya a fermentorban. Ez a változás az osztályok szintjén legjobban a Gammaproteobacterium-ok számának növekedésében mutatkozott meg. Szembe tűnő emelkedést mutatott a Firmicutes-ek relatív gyakorisága, azonban az egyes osztályok abundanciája csökkent a 5. heti mintában. Ennek magyarázata, hogy néhány kisebb rend (pl. Negativicutes) gyakorisága növekedett. A 30. ábrán ábrázolt Bacteriodetes törzsbe tartozó osztályok mindegyikének nőtt a százalékos előfordulása az 5. heti mintában. A következő ábrákon a legsötétebb színárnyalatú oszlopok a 11. heti mintavételi eredményeket mutatják be. Ekkor a rendszer már hanyatló fázisában volt, a gázhozam jelentősen visszaesett, a szerves savak mennyisége már nagyon nagy volt. Ennek megfelelően csak azok a mikrobák maradtak életben, amelyek a magas szerves sav koncentráció mellett is képesek életfunkcióikat fenntartani. Erre az adott mintákban a Clostridiales tagjai, valamint a Thermoanaerobacterales rend bizonyos tagjai voltak képesek. Ellenben jelentősen csökkent a Proteobacterium-ok előfordulása. Hasonlóan alakult a Bacillales és a Lactobacillales rendek tagjainak száma (30. ábra).



30. ábra: A vér adaptáció során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten

Az Archaea közösség számosságát tekintve nagyon kis részesedéssel van jelen egy biogáz fermentorban – ez az állítás ebben az esetben is igaz, hiszen a relatív mennyiségük minden vizsgált mintában kevesebb, mint 10 %-a volt a teljes mikroba közösségnek. A teljes képet tekintve, bár a különböző rendszertani kategóriák megoszlása eltér, minden Archaea filogenetikai csoport jelen volt a fermentorokban, a doménen belül jelentős átrendeződés figyelhető meg (31. ábra). Az Euryarcheota törzs dominált minden esetben a vizsgált mintákban az Archaea közösség tekintetében. Ezen törzsön belül a Methanomicrobia osztály tűnt a leggyakoribbnak, majd a Thermococci és a Methanococci osztály. A Methanomicrobia osztály mutatta a leglátványosabb gyakoriságbeli változást, relatív abundanciájuk a kezdeti 60 %-ról az 5. hétre 30 %-ra, ezt követően pedig 10 % alá csökken. A Methanococci csoport tagjai azonban ettől nagyon eltérő képet mutattak, a kiindulási mintában kis mennyiségben fordultak csak elő a többi osztályhoz képest, majd az 5. heti mintában a kezdeti érték majdnem kétszeresét érték el, azonban a fermentáció végső szakaszára gyakoriságuk visszaesett a kezdeti érték alá. Hasonlóan viselkedtek a

Thermococci, valamint a Thermoprotei osztályok képviselői is. Mindazonáltal az Archaea domén alulreprezentáltsága miatt a teljes mikrobiális közösségre nézve nem teszi lehetővé a kapcsolatok tárgyalását nagyobb felbontásban.



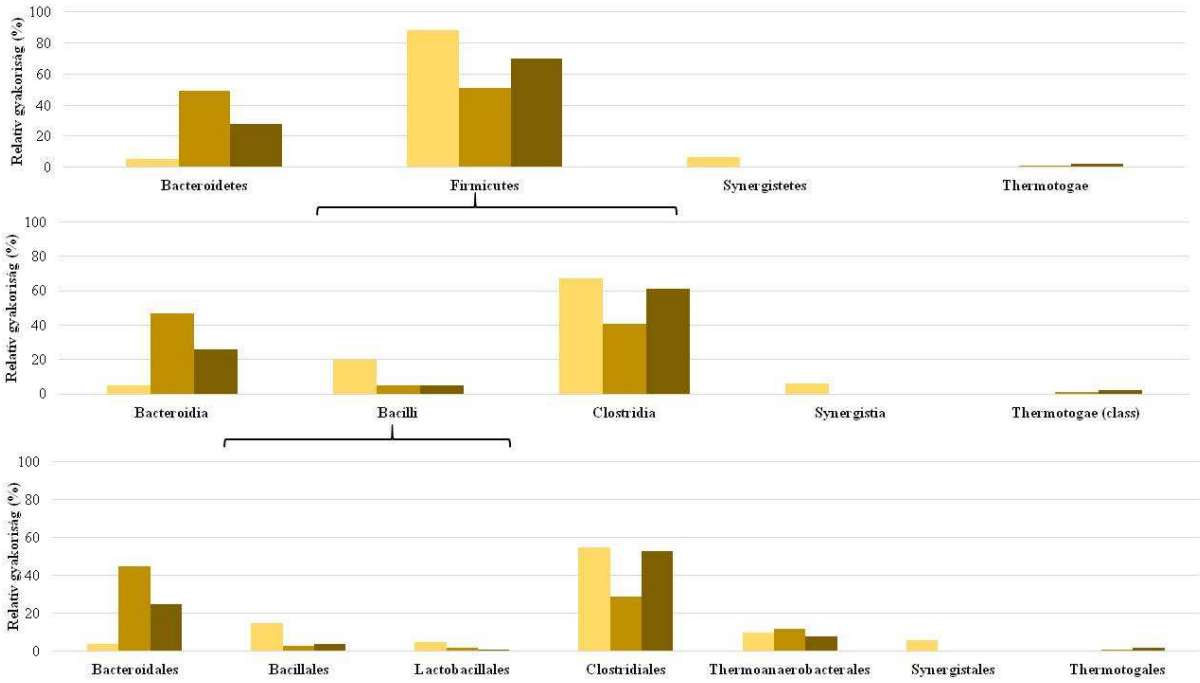
31. ábra: A vér adaptáció során az Archaea doménen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten

5.6.5 A metagenomikai vizsgálatok eredménye húskivonat alapanyagon

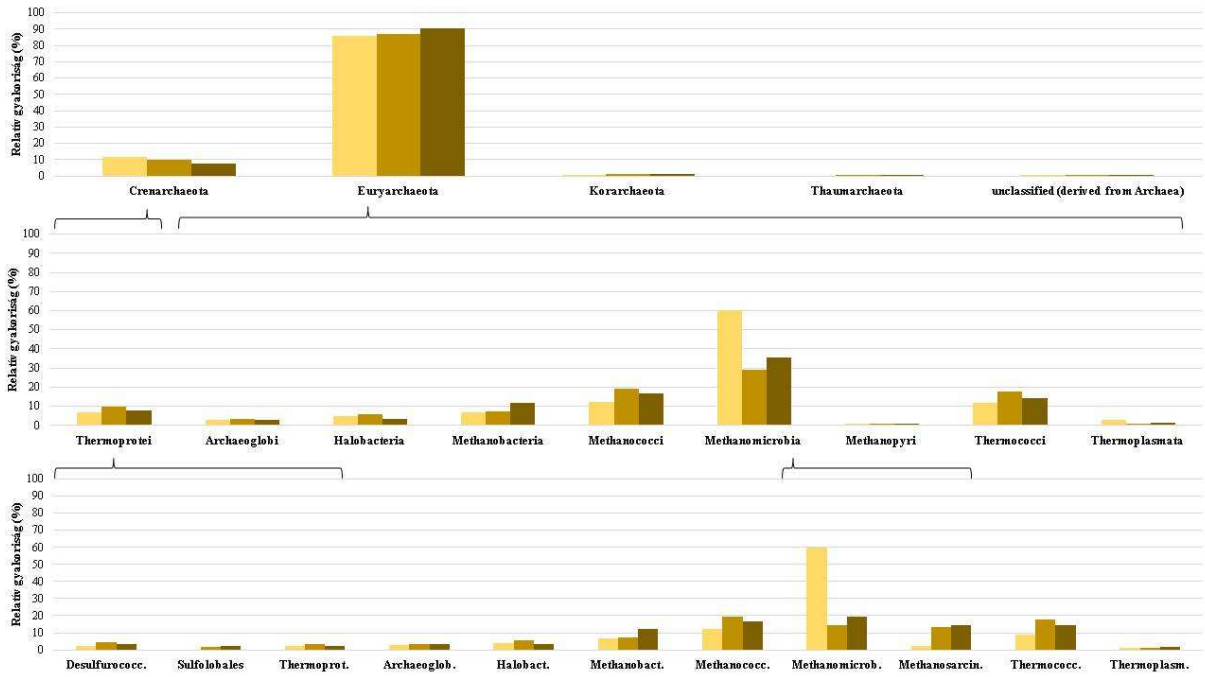
A sertésvér, valamint a kazein szubsztrátot tartalmazó biogáz fermentor mintákkal párhuzamosan megvizsgáltam a húskivonatot feldolgozó mikroba közösség összetételét is. A korábbi metagenom vizsgálatoktól részben eltérő összetételű közösség kialakulását eredményezte a húskivonat betáplálása.

A Bacteroidetes törzs tagjai hasonló változást mutattak, mint a kazeines és a véres fermentáció során. Jelentősen eltér azonban a Firmicutes törzs esetében tapasztalt relatív

abundancia a korábban látott véres fermentáció eredményeitől, de hasonlít a kazein fermentációnál tapasztalt változásokhoz. Ez a különbség végigkövethető a rendszertani kategóriákon; a kiindulási populációban való magas előfordulás után az 5. heti mintában az arányuk csökken, majd a fermentáció végére a mennyiségük ismételten megemelkedik (32. ábra). A fajszintű elemzés itt is hasonló képet tárt fel, mint a korábban bemutatott kazein lebontás esetében. Proteobacteria törzs tagjai a kiindulási mintában számottevő gyakorisággal voltak jelen, ezt követően számuk a kimutatási határérték alá csökkent. A Synergistetes törzs tagjaival is hasonló a helyzet, míg a Thermotogae törzs éppen ellenkező változást mutatott, a kiindulási mintában alig voltak jelen, majd ez követően számuk kismértékben ugyan, de folyamatosan emelkedett a fermentáció végéig.



32. ábra: A húskivonathoz való adaptáció során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten



33. ábra: A húskivonat fermentációja során Archaea doménen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten

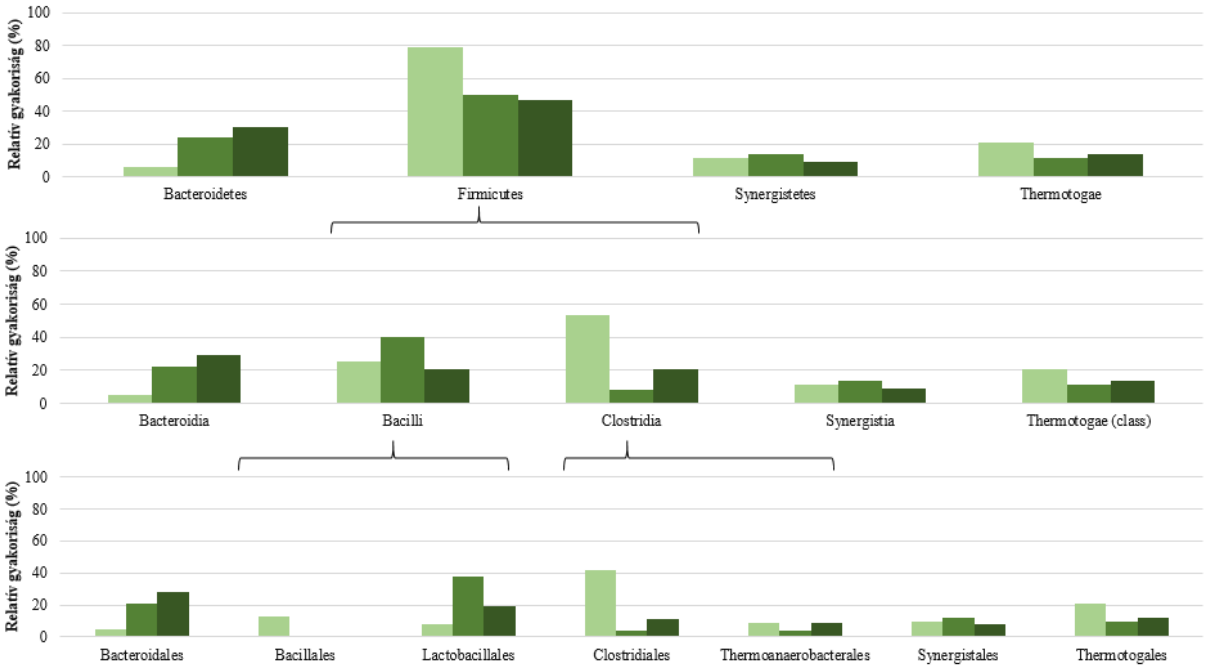
A korábban tárgyalt fehérjegazdag alapanyagokhoz hasonló eredményeket mutatnak e minták metagenom szekvenálási eredményei. Az Archaea doménen belül kismértékű változások történtek a húskivonat betáplálásakor. Az Euryarcheota dominanciája a korábbiaknak megfelelően alakult itt is. Azonban újdonságnak tekinthető, hogy az eddig lényeges változást nem mutató – a Methanomicrobia osztályba tartozó – Methanosarcinales rend jelentős mennyiségben azonosítható volt a reaktorból és fennmaradt a teljes fermentáció során (33. ábra).

5.6.6 A metagenomikai vizsgálatok eredménye növényi eredetű konyhai hulladékon

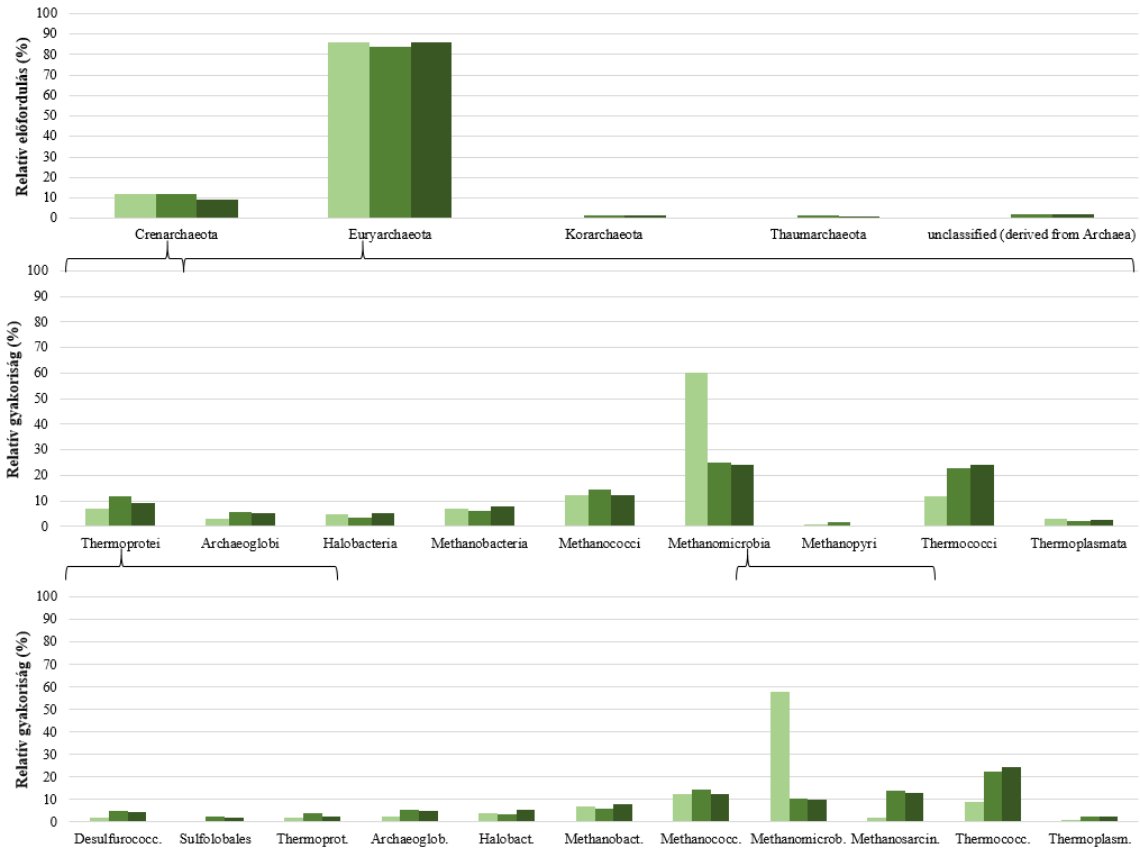
A növényi eredetű konyhai hulladék alapvetően eltér kémiai összetételében a korábban tárgyalt alapanyagoktól, ennek megfelelően anaerob lebontása során számos különbség mutatkozott a többi vizsgált alapanyaghoz képest.

A Bacteroidetes törzs tagjainak előfordulási gyakorisága jelentős növekedést mutatott a korábban tárgyalt alapanyagokhoz képest, relatív abundanciájuk a fermentáció végére elérte a 30 %-ot. Nagy eltérés figyelhető meg a Firmicutes törzs esetében, hiszen a

kezdeti 80% körüli relatív abundancia az anaerob lebontás során folyamatosan és jelentős mértékben csökkent. Az alacsonyabb rendszertani kategóriák áttekintése során kiderült, hogy a Firmicutes-en belüli változás a Bacilli – ezen belül a Lactobacillales rend – relatív növekedéséből, továbbá a Clostridia osztály számottevő visszaeséséből adódik (34. ábra). Proteobacteria törzs képviselői csak a kiindulási mintában voltak jelen, ezt követően számuk a kimutatási határérték alá csökkent. A Synergistetes törzs tagjai kismértékű ingadozást mutattak csak, relatív abundanciájuk 10 % körül mozgott a fermentáció során, míg a Thermotogae törzs éppen eltérő változást mutatott: a kiindulási mintában 20 % körüli érték volt megfigyelhető, majd ez követően számuk 10-12 %-ra esett vissza.



34. ábra: A növényi eredetű konyhai hulladék fermentációja során végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten



35. ábra: A növényi eredetű konyhai hulladék anaerob lebontása során Archaea közösségen belül végbement előfordulási gyakoriságváltozások törzs, osztály és rend szinten

A konyhai hulladék fermentációjának eredményeként az Archaea közösségben a Thermococcales rend esetében volt megfigyelhető, hogy a fermentáció végéig növekedett relatív gyakoriságuk (35. ábra). A többi vizsgált rendszertani kategória esetében nem volt jelentősebb változás. Figyelemre méltó a Methanomicrobiales rend gyors csökkenése a rendszerben.

5.7 Fehérje bontó mikroba keverék elősegíti a biogáz termelést

A metagenom kísérletek eredményei alapján azonosított fajok közül kiválasztottam hármat, amelyeket a további vizsgálatokhoz használtam. Ezeknek számos kritériumnak kellett megfelelniük, mint például mezofil (37°C±2°C) körülmények között kell szaporodniuk, fehérjét vagy aminosavat kell tudniuk bontani, ideális legyen számukra a pH=7,0-8,0. Olyan törzseket kerestem, amelyek kiemelkedő abundancia változással

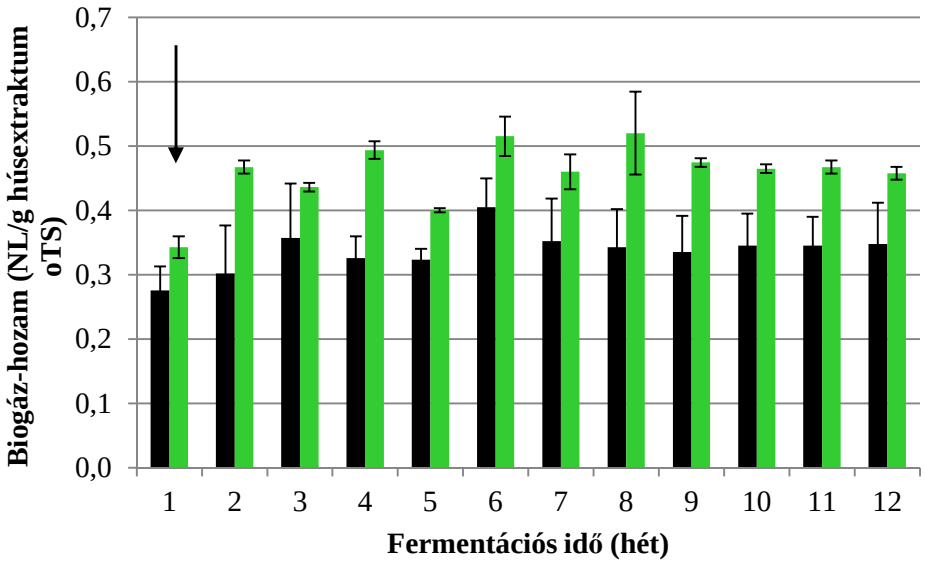
reagáltak a fehérje monoszubsztráthoz való adaptáció idején. A választás a *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus coagulans* és *Bacillus subtilis* fajokra esett, amelyek aerob körülmények között gyorsan szaporodnak Luria-Bertani-tápoldatban, majd ezt követően anaerob körülmények között képesek protein bontásra.

A fajok tesztelése rátáplálásos kísérletekben történt, amely során meghatároztam az optimális sejtszámot, amely elérése után megfigyelhető, hogyan járulnak hozzá a biogáz termeléshez az adott környezetben a vizsgált mikrobák.

5.7.1 Hozzáadott mikroba keverék hatásai a gázhozamra

A kísérlet alapvető célja a biogázhozam növelése volt a hozzáadott baktérium-keverékkel. A kísérlethez használt alapanyag húskivonat volt, amelyből a korábban optimálisnak ítélt 11,5 g oTS mennyiséget adagoltam heti egy alkalommal.

A húskivonat hozzáadott baktérium-keverék nélküli anaerob lebontása során 53%-os átlagos metántartalmat, valamint 0,34 Nl/g oTS átlagos biogázhozamot mértem. Az ezekből az adatokból számított metánhozam 0,18 Nl/g oTS-nek adódik. A hozzáadott mikroba-keveréket tartalmazó fermentorok átlagos metántartalma 58 %, az átlagos biogázhozam 0,46 Nl/g oTS volt (36. ábra). A számított metánhozam 0,27 Nl/g oTS volt. A gázhozamban 35 %-os növekedés volt mérhető a keverék alkalmazásával, a metánhozamban ez az érték 50 %-nak adódott a vizsgálat időtartama alatt.



36. ábra: A heti biogázhozam-változások a baktérium-keverék nélküli, valamint a baktérium-keverékkel leoltott fermentorokban. A fekete oszlopok a baktérium-keverék

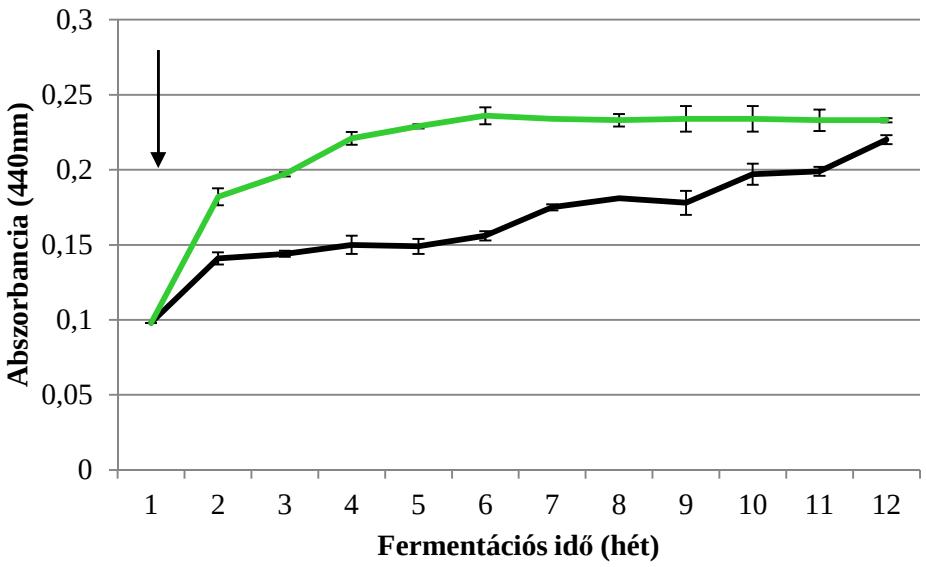
nélküli adatokat, míg a zöld oszlopok a baktérium-keverék hozzáadásával termelt gázhozam értékeket mutatják. A fekete nyíl a leoltás idejét mutatja.

5.7.2 Hozzáadott mikroba keverék hatása a szerves sav összetételre

A kiindulási iszap összes szerves sav-tartalmának és pufferkapacitásának arányában nem volt jelentős különbség, a 0,2-0,3 közötti arány arra utal, hogy a rendszer nincs túltáplálva, növelni lehet a szubsztrátbevitelt. A mérési eredmények alátámasztják, hogy a rendszer optimálisan működött, hiszen az összes szerves sav/pufferkapacitás arányok nem változtak drasztikusan a kiindulási állapothoz képest.

5.7.3 Hozzáadott mikroba keverék hatása a proteáz aktivitásra

A fehérjék lebontása aminosavakká az egyik kritikus lépése a fermentációnak, ezért ebben az esetben is fontosnak tartottam a relatív proteáz aktivitás nyomon követését a reaktorokban. Korábbi kísérleteim bizonyították, hogy a fehérje betáplálás elkezdését, illetve az adagok növelését követően megemelkedik a fehérjebontó enzimek aktivitása, azonban ebben az esetben jól megfigyelhető volt, milyen nagy jelentőséggel bírnak a szubsztrát lebontásában a rendszerbe juttatott baktériumok. A 37. ábrán az enzimaktivitások átlagát tüntettem fel a fermentáció idejének függvényében. Ebben az esetben nem volt adaptációs periódus, hiszen azt kívántam vizsgálni, a bevitt mikrobák képesek-e a rendszerbe hirtelen bejutó többlet fehérjét hasznosítani, így némileg tehermentesíteni a többi, nem fehérjebontó, de a biogáz fermentáló konzorciumban aktívan résztvevő mikrobát. A baktérium keverék nélküli fermentorokban egy lassú aktivitás növekedés figyelhető meg, míg a hozzáadott baktériumokat tartalmazó reaktorokban hamar megemelkedett és időben magas szinten állandósult enzimaktivitás volt kimutatható. A leoltás nélküli fermentorokban mérhető proteáz aktivitás jól egybevág a biogázhozam növekedéssel; mivel a betáplált szubsztrátmennyiség nem volt túl sok, így valószínűleg itt is elindult a vizsgálat időtartama alatt az adaptáció. A hozzáadott mikrobákat tartalmazó rendszerek esetében tehát az adaptációs szakasz lerövidíthető.

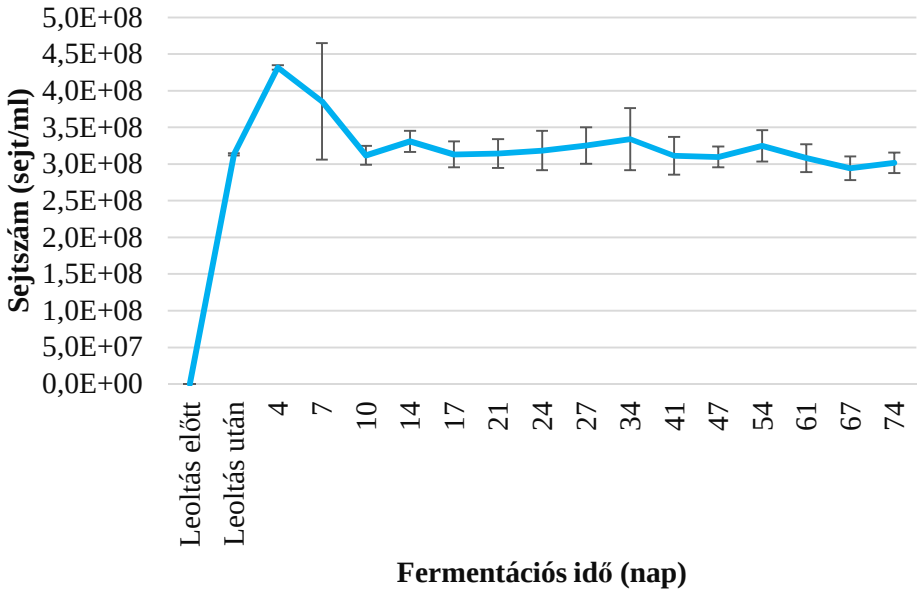


37. ábra: A proteáz aktivitás változása a baktérium-keverék nélküli, valamint a baktérium-keverékkel leoltott fermentorokban. A fekete folytonos vonal a baktérium-keverék nélküli adatokat, míg a zöld vonal a baktérium-keverék hozzáadásával termelt gázhozam értékeket mutatják. A fekete nyíl a beoltás idejét mutatja.

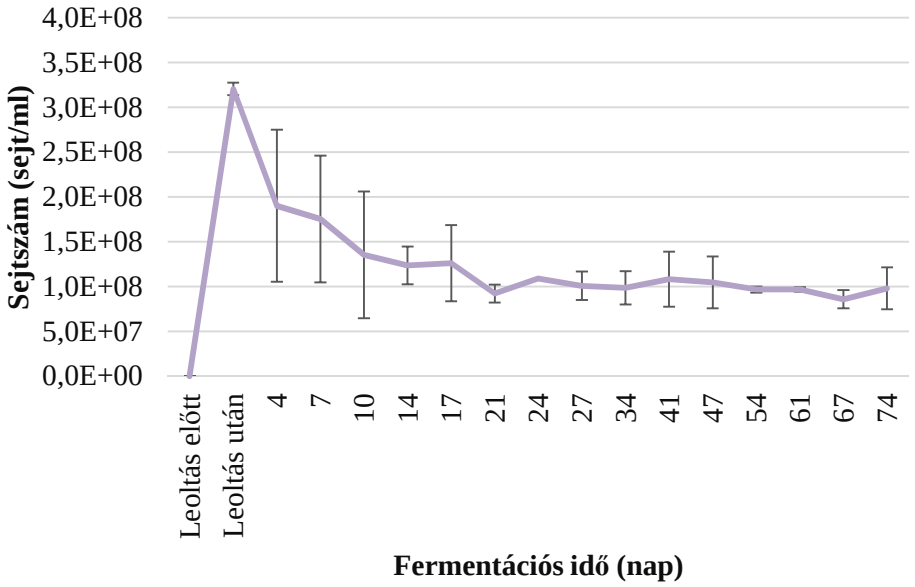
5.7.4 qPCR eredmények

A gázhozam eredmények alátámasztották, hogy a rendszerbe juttatott mikroba keverék jelentős mértékben megnöveli a megtermelt biogáz mennyiségét, valamint jelenlétükben emelkedett a gáz metántartalma. Ahhoz, hogy ezeket az előnyös hatásokat a hozzáadott baktérium keverékhez rendelhessük meg kell győződni arról, hogy képesek-e szaporodni és hosszabb távon életben maradni a kiválasztott mikrobák az adott közegben. A törzseket tiszta kultúrában neveltem fel, de azonosításuk a biogáz termelő kevert mikroba közösségben klasszikus mikrobiológiai módszerekkel igen nehézkes, ezért molekuláris biológiai eljárást alkalmaztam. A kvantitatív PCR lehetővé tette a vizsgálni kívánt baktériumok mennyiségi változásának időbeli nyomon követését. A reaktorokból 4 naponta mintát vettem, majd *Ps. fluorescens, B. coagulans* és *B. subtilis* specifikus primerek és qPCR segítségével meghatároztam a fermentorban lévő, adott fajba tartozó sejtek DNS-ének mennyiségét, ebből – kalibrációt követően - következtetni lehet azok sejtszámának alakulására. Az első mintavételi pont a leoltás előtti állapotot tükrözi, míg a következő mintavétel fél órával a leoltást követően történt. A kiindulási sejtszám

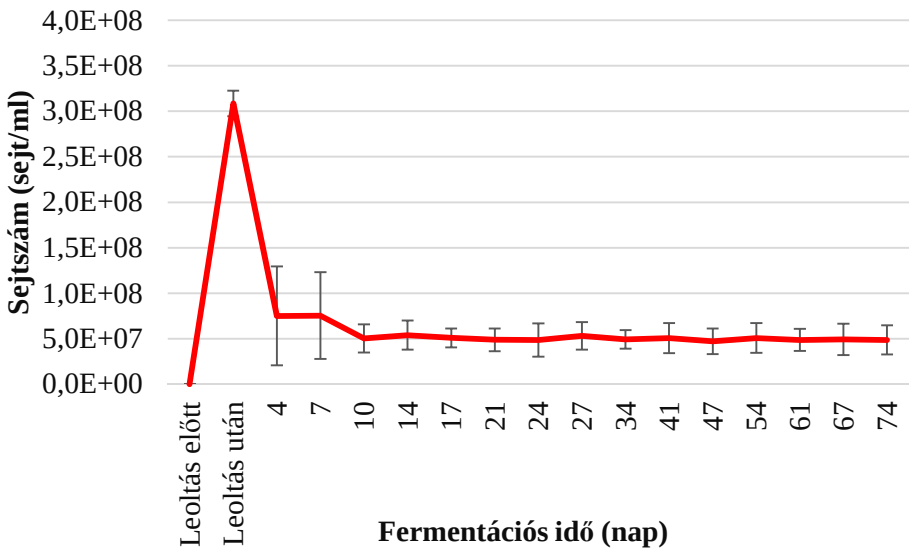
mindhárom baktérium esetében $3*10^8$ sejt/ml volt a fermentor aktív térfogatára vetítve. Amint az 38. ábráról leolvasható a *Ps. fluorescens* sejtek száma a leoltást követően megemelkedett, majd az idő előrehaladtával a számuk egy alacsonyabb szintre esett vissza és ezen az értéken stabilizálódott a fermentáció végéig. A *B. coagulans* és *B. subtilis* azonban eltérően a *Ps. fluorescens*-től nem mutatott kezdeti emelkedést a leoltást követően, számuk jelentősen visszaesett, majd a *B. coagulans* esetében a 7., *B. subtilis* esetében a fermentáció 10. napjától egy alacsony értéken stabilizálódott (39. és 40. ábra).



38. ábra: A *Ps. fluorescens* sejtszám változása a fermentáció során



39. ábra: A *B. subtilis* sejtszám változása a fermentáció során



40. ábra: A *B. coagulans* sejtszám változása a fermentáció során

5.8 Ipari alkalmazhatóság

A bemutatott eredmények igazolták, hogy a biogáz termelő mikroba közösséget hozzá lehet szoktatni nagy fehérjetartalmú szubsztrátok hatékony lebontásához, így a magas ammónia koncentráció elviseléséhez, kiemelkedő biogáz termelés mellett. Munkánk eredményeként tehát a jelentős biogáz potenciállal rendelkező alapanyag féleséget, a fehérjékben gazdag élelmiszeripari melléktermékeket a jövőben nem "hulladék", hanem értékes megújuló energiahordozó alapanyagként lehet hasznosítani. Bizonyítottuk, hogy elkerülhető a C/N arány kedvezőnek tekintett irányba történő eltolását eredményező egyéb szerves hulladékokkal történő együtt emésztés, és az ezzel járó hátrányok. A kidolgozott eljárás emellett legalább két területen járul hozzá a biogáz termelési technológiák hatékonyságának növeléséhez.

1.) A mikroba közösség összetételének vizsgálatával, illetve egyes diagnosztikus jelentőségű mikroba fajok relatív mennyiségének meghatározásával jellemezni lehet a rendszer alkalmasságát fehérjében gazdag alapanyagok feldolgozására. Ezzel a biogáz termelő rendszer üzembiztonsága és hatékonysága növelhető.

2.) Az új ismeret birtokában olyan mikroba készítmények állíthatók elő ismert baktérium törzsek tiszta tenyészete vagy keveréke formájában, amelyeknek a működő biogáz fermentorokba adagolásával a mikroba közösség összetétele gyorsan átalakítható a

változó alapanyag ellátáshoz alkalmazkodva. Fontos megjegyezni, hogy a biotechnológiai megoldások alkalmazásakor nem kell szerkezeti átalakításokat végezni a működő biogáz üzemeken, így nem kell az üzem építésekor eldönteni, hogy a működés évei alatt mikor kívánnak fehérjét bontani. Így a technológiánk költséghatékonyabb és bármikor át lehet rá állni különösebb műszaki átalakítások nélkül.

Az eredményeket P111425SG-PCT számon nemzetközi szabadalom védi a Szegedi Tudományegyetem tulajdonában.

6 Összefoglalás

Dolgozatomban bemutattam, hogy a jelentős mennyiségben keletkező fehérjében gazdag ipari és mezőgazdasági melléktermékek ideálisak anaerob lebontás során történő ártalmatlanításra. Eközben a mikrobák tevékenységének eredményeként biogázt termelődik a fermentorban lévő mikroorganizmusok segítségével.

	Kazein	**Sertésvér**	**Húskivonat**	**Növényi eredetű konyhai hulladék**
C/N arány	3,47	3,20	3,32	12,43
Elméleti metán maximum (Nml/g oTS)	473	494	469	326
Maximális mért gázhozam (Nml/g oTS)	460	480	457	450
Mért metán maximum (Nml/g oTS)	239	245	238	189

41. ábra: A kísérletek során vizsgált alapanyagok paraméterei szakaszos fermentáció során

A kidolgozott eljárás során olyan alapanyagok felhasználására került sor, amelyek C/N aránya jelentősen eltér az iparban nagy mennyiségben használt szubsztrátoktól, és korábbi vizsgálatok alapján ezek felhasználását nem javasolták a biogáz üzemekben. A fermentációk során három nagyon alacsony (kazein, sertésvér, húskivonat), valamint egy közepes C/N arányú alapanyag (növényi eredetű konyhai hulladék) vizsgálata történt (41. ábra). Az elméleti maximum metánhozam Symons és Buswell (1933) által kidolgozott képlet alapján a számolt értékeket jelzik. A szakaszos fermentációk gázhozamát és az átlagos metántartalmat alapul véve kiszámolható a lebontási hatékonyság, amely mind a négy anyag esetében közel azonos, 49,6 és 58,0 % közötti értéket adtak (41. ábra).

Az anaerob degradáció során az anaerob lebontást végző mikroba közösség összetételét monitoroztam, amelynek eredményeként alátámasztást nyert, hogy a mikrobiális közösség megváltozott – a biogáz termelő rendszer fokozatosan hozzászokott a szakmai irodalomban ismert határok többszörösét meghaladó fehérje-alapanyag mennyiségekhez.

Noha a szakirodalomban számos helyen megtalálható, hogy különböző mértékű akklimatizációt megfigyeltek, a közölt eredmények gyakran nem, vagy csak nehezen vethetők össze – különböző fiziko-kémiai körülmények között zajlottak a vizsgálatok, illetve csak a biogáztermelő közösség bizonyos tagjaira gyakorolt hatást vizsgálták. Így az ismert megoldások továbbfejlesztésével olyan eljárást dolgoztam ki, amely során fehérjében gazdag alapanyagokat monoszubsztrátként fokozott mennyiségben juttattam biogáz termelő rendszerekbe. A lebontási folyamat során nyomon követtem a rendszerben végbemenő fiziko-kémiai- (pl. pH, ammóniumion-koncentráció), valamint mikrobiológiai változásokat. Ez utóbbit metagenom vizsgálattal tanulmányoztam és jelentős populáció összetételbeli eltéréseket találtam az adaptáció időtartama alatt. Ezek a relatív gyakoriságban beállt változások annak következtében jöttek létre, hogy csökkent azon mikroorganizmusok száma/gyakorisága, amelyek nem képesek a vizsgált fehérjében gazdag szubsztrátokat, vagy azok valamely lebontási termékét felhasználni energiaforrásként. Ellenben azok, amelyek képesek hasznosítani ezen alapanyagokat, relatív abundanciabeli növekedést mutattak. Egyértelmű különbség mutatható ki az alacsony és a közepes C/N arányú alapanyagok metagenom vizsgálatakor. A magas fehérjetartalmú alapanyagok degradációjakor a domináns Firmicutes törzs gyakorisága változott a leglátványosabban; mennyiségük a kiindulási mintában nagy volt, amely a fermentáció középső szakaszára jelentősen lecsökkent. A 11. heti minták azonban újra, kiugróan magas Firmicutes gyakoriságot mutattak. Ezzel megegyező tendeciát mutatott az adott törzsbe tartozó Clostridia osztály is, míg a Bacilli osztály gyakoriságváltozása épp ellentétes volt az előzőekkel. A növényi eredetű konyhai hulladék esetében a Firmicutes törzs gyakorisága folyamatos csökkenést mutatott a degradáció során. Az alsóbb rendszertani kategóriákban ez a változás úgy mutatkozott meg, hogy a Bacilli fajok mutattak jelentősebb növekedést, ellentétben a Clostridia fajokkal, amelynél ebben az esetben a fermentáció végére jellemző növekedés nem valósult meg. Az Archaea doménen belül eddig is jellemzően sokkal kisebb különbségek voltak kimutathatók, valószínűleg azért, mert a fermentációk során felhasznált szubsztrátok közvetlenül nem érintik a metanogéneket, azokra csak áttételes hatással bírnak a Bacteria domén tagjain keresztül. Így – amint az várható is volt – a szubsztrát metanogén-összetételre gyakorolt hatása kisebb mértékű volt. Különösen igaz ez annak figyelembe vételével, hogy a lebontási folyamat lépésein előre haladva mind kisebb a mikrobák változatossága és mennyisége, a lebontók viszonylag sokan vannak és változatosak, akárcsak a reaktorba betáplálható alapanyagok. A következő szinten már kevesebb és kisebb gazdagságú törzseket-

osztályokat találhatunk. Az általuk felhasználható szubsztrátok már koránt sem olyan sokfélék, mint az előző csoport számára voltak. A biogázelőállítás utolsó fokán már kevés csoportot találunk és a többiekhez viszonyított mennyiségük is csekély. A metanogének által felhasználható szubsztrátok száma kevés és ezek sem igazán energiagazdagok.

A metagenom-analízis alapján kiválasztottam három törzset, amelyek tiszta tenyészeteit visszajuttattam a természetes biogáz termelő közösségbe. A kísérletek bizonyították, hogy a fehérjebontó mikroorganizmusok fermentorba való bevitelével jelentősen rövidíthető, illetve elhagyható az adaptációs időszak, ami komoly előnyt jelent az ipari alkalmazás során. A pozitív hatások közé sorolható, hogy ezen az úton fokozható volt a biogáztermelés és kismértékű metán koncentrációbeli növekedés is megfigyelhető volt. További előnye a kiválasztott mikrobáknak, hogy mivel eleve megtalálhatók a rendszerben, nem kell „beilleszkedési nehézségekkel" számolni, és amint a kvantitatív PCR eredmények mutatták, mindössze egyszeri leoltás elég volt a rendszer teljesítményének fokozásához. A leoltást követően beállt egy alacsonyabb, de egyensúlyinak tekinthető szintre mindhárom vizsgált baktérium koncentrációja, tehát a kihígulást a baktériumok szaporodása részben ellensúlyozni tudta.

A biogáz üzemek hatékony működtetésének egyik sarkalatos pontja az anaerob fermentáció biokémiai és mikrobiológiai folyamatainak alapos megismerése. Azonban még messze állunk attól, hogy pontosan értsük a komplex szerves szubsztrátok anaerob lebontásának biológiáját, különösen azért, mert több száz, különböző környezeti igényekkel rendelkező mikroorganizmus-féleség együttes munkájaként keletkezik a folyamat végterméke, a biogáz. A biogáz képződés megismerése tehát még mindig sok kihívást tartogató, izgalmas kutatási terület (Lema és Omil, 2001, Bai és mtsai., 2005, Kovács és mtsai., 2014).

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Kovács L. Kornélnak a dolgozat elkészítésében adott tanácsait, valamint, hogy a biotechnológia iránti lelkesedése a tanszékre vezetett. Hálával tartozom a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék Biogáz Csoport tagjainak segítségükért, különös tekintettel Wirth Rolandnak a DNS izolálás és a metagenomikai adatok kiértékelése során végzett munkájáért és Dr. Bagi Zoltánnak hasznos tanácsaiért. Dr. Maróti Gergely és jelenleg az MTA SzBK Biokémiai Intézetében dolgozó munkatársai az új generációs DNS szekvenálásban és a metagenomikai adatok értelmezésében nyújtottak értékes segítséget. Munkám befejezéséhez Dr. Rákhely Gábor tanszékvezető docens biztosított helyet, amiért köszönettel tartozom.

A dolgozatban bemutatott munka a HUSRB/1002/214/041 IPA, HURO/1001/193/2.2.2 CBC, és IEE/10/235 SI2.591589 GreenGasGrids EU projektek, valamint a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 támogatásával készült. A dolgozat elkészüléséhez jelentős segítséget nyújtott a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 jelű Jedlik Ányos ösztöndíj támogatás.

8 Irodalomjegyzék:

Ahring, B. K. (Ed.) (2003) Biomethanation I Series: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Vol. 81. ISBN 978-3-540-44322-3

Ahring, B. K., Angelidaki, I., Johansen, K. (1992) Anaerobic treatment of manure together with industrial waste. Water Sci Technol 30: 241–249.

Al Seadi, T. (2002) Good practice in quality management of AD residues from biogas production. IEA Bioenergy, Task 24 – Energy from Biological Conversion of Organic Waste. (www.iea-biogas.net)

Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1992) Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. Appl Microbiol Biotechnol 37(6): 808-812.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1993) Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. Appl Microbiol Biotechnol 38: 560–564.

Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B. K. (1999) A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. Biotechnol Bioeng 63: 363-372.

Bai, A., Bagi, Z., Bartha, I., Boruzs, L., Fenyvesi, L., Kovács, K. L., Mátyás, L., Mogyorósi, P. (2005) A biogáz előállítása. *Jelen és jövő Szaktudás Kiadó Ház Rt., Budapest* (ISBN: 963 9553 39 5)

Banks, C. J., Wang, Z. (1999) Development of a two phase anaerobic digester for the treatment of mixed abattoir wastes. Water Sci Technol 40/1: 69–76.

Batstone, D. J., Jensen, P. D. (2011) Anaerobic Processes. In: Peter, W. (ed.) Treatise on Water Science. Oxford: Elsevier. ISBN: 978-0-444-53193-3.

Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhny, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H. and Vavilin, V. A. (2002) The IWA anaerobic digestion model no 1. (ADM1). Water SciTechnol 45(10): 65-73.

Batstone, D. J., Keller, J., Newell, R. B., Newland, M. (2000) Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. I: model development. Biores Technol 75: 67-74.

Biomass Program (2010) http://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/biomass_mypp_november2010.pdf

Bhattacharya, S., Parkin, G. (1989) The effect of ammonia on methane fermentation process. J Wat Pol Cont Fed 61: 55-59.

Borja, R, Banks, C. J, Sanchez, E. (1996) Anaerobic treatment of palm oil mill effluent in a two- stage up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. J Biotech, 45: 125-135.

Braun, R., Brachtl, E., Grasmug, M. (2003) Codigestion of proteinaceous industrial waste. Appl Biochem Biotechnol 109: 139-153.

Braun, R., Huber, P., Meyrath J. (1981) Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. Biotechnol Lett 3: 159-164.

Broughton, M. J., Thiele, J. H., Birch, E. J., Cohen, A. (1998) Anaerobic batch digestion of sheep tallow. Water Res 32(5): 1423-1428.

Brummeler, E., Hulshoff Pol, L. W., Dolfing, J., Lettinga, G. and Zehnder, A. G. B. (1985) Methanogenesis in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at pH 6 on an acetate-propionate mixture. Appl Environ Microbiol 49: 1472-1477.

Chen, K., Pachter, L. (2005) Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. PLoS Comp Biol 1(2): 24.

Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. Biores Technol 99: 4044–4064.

Chynoweth D. P., Owens, J. M., Legrand, R. (2001) Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. Renewable Energy 22(3): 1–8.

Conrad, R., Bak, F., Seitz, H. J., Thebrath, B., Mayer, H. P., Schütz, H. (1989) Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. FEMS Microbiol Lett 62(5): 285–293.

Danish Environmental Protection Agency*: Survey of wastes spread on land – Final report study contract B4-3040/99/110194/MAR/E3*

de Baere L. A., Devocht, M., van Assche, P., Verstraete, W. (1984) Influence of high NaCl and NH_4Cl salt levels on methanogenic associations. Water Res 18: 543–548.

Demirbas, A. (2008) Biofuel sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energy Conversion and Management 49:2106-2116.

Demirel, B., Yenigun, O. (2002) Two-phase anaerobic digestion processes: a review. J Chem Technol Biotechnol 77: 743–755.

DOE/EIA-0484 (2013) International Energy Outlook U.S. Energy Information Administration Washington DC. www.eia.gov/forecasts/ieo/ pdf/0484(2013).pdf

Edström, M., Nordberg, A., Thyselius, L. (2003) Anaerobic treatment of animal byproducts from slaughterhouses at laboratory and pilot scale. Appl Biochem Biotechnol A Enzyme Eng Biotechnol 109: 127-138.

Ekama, G. A., Sötemann S. W., Wentzel M. C. (2007) Biodegradability of activated sludge organics under anaerobic conditions. Water Res 41(1): 244-252.

Energia a Napból (2013) http://www.kzs.hu/nap/hungarian/b_napjaink_vilagenergiafogy.htm

FAO Investment Centre Division and FAO's Rural Infrastructure and Agro-Industries Division (2010) http://www.fao.org/documents/en/Rural%20infrastructure%20and%20agro-industries/topicsearch/9

Federal waste management plan (2006) Vienna: FEAA (Federal Environment Agency – Austria) 2006. www.bundesabfallwirtschafts**plan**.at/dms/bawp/BAWP_Band_1_EN.pdf

Fetzer, S., Conrad, R. (1993) Effect of redox potential on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. Arch Microbiol 160: 108-113.

Gallert, C., Bauer, S., Winter, J. (1998) Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. Appl Microbiol Biotechnol 50: 495–501. doi:10.1007/ s002530051326. PubMed: 9830101.

Garrity, G., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. R. (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer, 2nd ed. XXVIII, 1106 p. 222 illus. ISBN 978-0-387-28022-6

Gerardi, M. H. (2003) The Microbiology of Anaerobic Digesters. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.* ISBN: 978-0-471-20693-4

Gottschalk, G. (1986) Bacterial metabolism. Springer-Verlag, 1986. pp. 359. ISBN: 9783540961536.

Grabkowsky, B., Windhorst, H-W. (2009) Shifts and patterns in global poultry meat trade. World Poultry 25:09.

Gujer, W., Zehnder, A. J. B. (1983) Conversion processes in anaerobic digestion. Water Sci Technol 15(8-9): 127-167.

Hajarnis, S. R., Ranade, D. R. (1994) Inhibition of methanogens by n- and iso-volatile fatty acids. World J Microbiol Biotechnol 10: 350–351.

Hallenbeck, P. C., Ghosh, D., Skonieczny, M. T., Yargeau, V. (2009) Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. Indian J Microbiol 49: 48-59.

Hammer, B. W. (1915) Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. Iowa Agric. Exp. Stn. Res. Bull. 19:119-131.

Hanaki, K., Nagase, M., Matsuo, T. (1981) Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. Biotechnol Bioeng 23 (7): 1591-1610.

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. Chem Biol 5 (10): 245–249.

Hanreich, A., Schimpf, U., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Bendorf, D., Klocke, M. (2011) Monitoring of changes within a microbial, biogas producing community. In *Proceedings of the First International Conference on Biogas Microbiology: 14–16 September 2011; Leipzig.* Edited by Kleinsteuber S, Nikolausz M. UFZ Press, Leipzig; 2011:49.

Hansen, H. K., Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1998) Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. Water Res 32 (1): 5-12.

Hashimoto, A. G. (1986) Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. Agricultural Wastes 17: 241-261.

Hattori, S. (2008) Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. Microbes Environ 23/2: 118-127. doi: 10.1264/jsme2.23.118. PubMed: 21558697.

Hendriksen, H. V., Ahring, B. K. (1991) Effects of ammonia on growth and morphology of thermophilic hydrogen-oxidizing methanogenic bacteria. FEMS Microbiol Lett 85: 241-245.

Holm-Nielsen, J. B., Al Seadi, T., Oleskowicz-Popiel, P. (2009) The future of anaerobic digestion and biogas utilization. Biores Technol 100: 5478-5484.

Huser, B. A., Wuhrmann, K., Zehnder, A. J. B. (1982) *Methanothrix soehngenii gen. nov. sp. nov.,* a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch Microbiol 132: 1–*9.*

Jain, S. R., Mattiasson, B. (1998) Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biomethanation process. Biotech Lett 20(8): 771-775.

Jarrell, K. F., Kalmokoff, M. L. (1988) Nutritional requirements of the methanogenic archaebacteria. Can J Microbiol 34(5): 557-576.

Jeris, J. S., McCarty, P. L. (1965) The biochemistry of methane fermentation using C^{14} tracers. J Water Pollution Control Federation 37(2): 178-192.

Johansen, S. D., Karlsen, B. O., Furmanek, T., Andreassen, M., Jørgensen, T. E., Bizuayehu, T. T., Breines, R., Emblem, A., Kettunen, P., Luukko, K., Edwardsen, R. B., Nordeide, J. T., Coucheron, D. H., Moum, T. (2011) RNA deep sequencing of the Atlantic cod transcriptome. Comp Biochem Physiol Part D: Genomics and Proteomics 6: 18-22.

Kaparaju, P., Luostarinen, S., Kalmari, J., Rintala, J. (2002) Co-digestion of energy crops and industrial confectionery by-products with cow manure: batch-scale and farm-scale evaluation. Water Sci Technol 45: 275–280. PubMed: 12188558. 17.

Kayhanian, M. (1994) Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. J Chem Technol Biotechnol 59(4): 349-352.

Kellogg, R. L., Lander, C. H., Moffitt, D. C., Gollehon, N. (2000) Manure nutrients relative to the capacity of cropland and pastureland to assimilate nutrients: spatial and temporal trends for the United States available. http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs143_012133.pdf.

Kleiner, D. (1993) NH_4^+transport systems. In: Bakker, E. (Ed.) Alkali cation transport systems in prokaryotes. CRC Press. ISBN: 9780849369827.

Koster, I. W. (1986) Characteristics of the pH-influenced adaptation of methanogenic sludge to ammonium toxicity. J Chem Technol Biotechnol 36: 445-455.

Koster, I. W., Koomen, E. (1988) Ammonia inhibition of the maximum growth rate of the hydrogenotrophic methanogens at various pH-levels and temperatures. Appl Microbiol Biotechnol 28: 500-505.

Koster, I. W., Lettinga, G. (1984) The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. Agric Wastes. 1984;9:205–216.

Koster, I. W., Lettinga, G. (1988) Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. Biol Wastes 25: 51–59. doi: 10.1016/0269-7483(88)90127-9.

Kotsyurbenko, O. R., Chin, K.-J., Glagolev, M. V., Stubner, S., Simankova, M. V., Nozhevnikova, A. N., Conrad, R. (2004) Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. Env Microbiol 6: 1159-1173.

Kovács, K. L., Ács, N., Böjti, T., Kovács, E., Strang, O., Wirth, R., Bagi, Z. (2014) Biogas producing microbes and biomolecules. In: Biofuels: From Microbes to Molecules. Caister Acad. Press., Ed. Xuefeng Lu ISBN: 978-1-908230-63-8.

Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. A., Gartemann, K-H., Krömeke, H., Neuweger, H., Pühler, A., Runte, K. J., Schlüter A., Stoye J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Goesmann, A. (2008) Taxonomic composition and gene content of a methane- producing microbial community isolated from a biogas reactor. J Biotechnol 136: 91-101. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.07.206. PubMed: 18611419.

Kroeker, E. J., Schulte, D. D., Sparling, A. B., Lapp, H. M. (1979) Anaerobic treatment process stability. J Water Pollut Contr Fed 51: 718–727.

Kröber, M., Bekel, T., Diaz, N. N., Goesmann, A., Sebastian, J. (2009) Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. J Biotechnol 142: 38-49. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.010. PubMed: 19480946.

Lalman, J. A., Bagley, D. M. (2000) Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. Water Res 34(17): 4220-4228.

Lalman, J. A., Bagley, D. M. (2001) Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. Water Res 35(12): 2975-2983.

Lapp, H. M., Schulte, D. D., Kroeker, E. J., Sparling, A. B., Topnik, B. H. (1975) Start-up of pilot scale swine manure digesters for methane production. Managing livestock wastes. ASAE publication Proc. 275: 234-237.

Lema, J. M., Omil, F. (2001) Anaerobic treatment: a key technology for sustainable management of wastes in Europe. Water Sci Technol 44: 133-140.

Liu, Z., Klatt, C. G., Wood, J. M., Rusch, D. B., Ludwig, M., Wittekindt, N., Tomsho, L. P., Schuster, S. C., Ward, D. M., Bryant, D.A. (2011) Metatranscriptomic analyses of chlorophototrophs of a hot-spring microbial mat. IJSEM 5: 1279-1290.

Luste, S., Luostarinen, S. (2010) Anaerobic co-digestion of meat-processing by-products and sewage sludge – Effect of hygienization and organic loading rate. Biores Technol 101: 2657-2664. doi:10.1016/ j.biortech.2009.10.071.

Macias-Corral, M., Samani, Z., Hanson, A., Smith, G., Funk, P., Yu, H., Longworth, J. (2008) Anaerobic digestion of municipal solid waste and agricultural waste and the effect of co-digestion with dairy cow manure. Biores Technol 99: 8288–8293. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.057. PubMed: 18482835.

McCarty, P. L. (1972) Energetics of organic matter degradation. In Mitchell, R. (Ed.), *Water Pollution Microbiology.* John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 91–118.

McCarty, P. L., McKinney, R. (1961) Salt toxicity in anaerobic digestion. J Water Pollut Control Fed 33: 399–415.

McCarty, P. L., Mosey, F. E. (1991) Modeling of anaerobic-digestion processes (a Discussion of Concepts). Water Sci Technol 24(8): 17-33.

McCarty, P. L., Smith. D. P. (1986) Anaerobic waste-water treatment 4. Environ Sci Technol 20(12): 1200–1206.

McGhee, T. J. (1968) A method for approximation of the volatile acid concentrations in anaerobic digesters. Water Sewage Works 115: 162-166.

McInerney, M. J. (1988) Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: Zehnder, A. J. B. (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms, Wiley, New York (1988).

McKernan, K. J., Peckham, H. E., Costa, G., McLaughlin, S., Tsung, E., Fu, Y., Clouser, Y. C., Dunkan, C., Ichikawa, J., Lee, C., Zhang, Z., Sherdian, A., Fu, H., Ranade, S., Dimilanta, E., Sokolsky, T., Zhang, L., Hendrickson, C., Li, B., Kotler, L., Stuart, J., Malek, J., Manning, J., Antipova, A., Perez, D., Moore, M., Hayashibara, K., Lynos, M., Beaudoin, R., Coleman, B., *et al*. (2009) Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two base encoding. Genome Res 19: 1527-1541.

Mitchell, R., Gu, J. (2010) Environmental Microbiology, Second Edition. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey* ISBN: 978-0-470-17790-7**Nakano MM, Zuber P.** (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). Annu Rev Microbiol 52: 165-190.

Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M. (2008) Lehninger principles of biochemistry. W.H. Freeman, New York,ISBN: 978-0716771081.

Nemzetgazdasági Tervezési Hivatal (2013) http://www.nth.gov.hu/files/download_files/504/oftk_tarsadalmi_egyeztetes_1217.pdf

Nielsen, H. B., Ahring, B. K. (2006) Responses of the biogas process to pulses of oleate in reactors treating mixtures of cattle and pig manure. Biotechnol Bioeng 95(1): 96-105.

Nielsen, H. B., Uellendahl, H., Ahring, B. K. (2007) Regulation and optimization of the biogas process: propionate as a key parameter. Biomass and Bioenergy 31: 820-830.

Nielsen H. B., Angelidaki I. (2008) Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. Biores Technol 99: 7995-8000.

Nordmann, W. (1977) Die Überwachtung der Schlammfaulunk. KA- Informationen für das Betriebspersonal, Beilage zur Korrespondenz Abwasser. (3):77.

Novak, J. T., Carlson, D. A. (1970) Kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. J Water Pollut Control Fed 42(11): 1932.

Nyns, E. J. (1986) Biomethanation processes. In: Schonborn W. (ed), Microbial Degradations, 18, 207-267, ISBN: 978-1-4020-9941-0.

Parkin, G. F., Speece, R. E., Yang, C. H. J., Kocher, W. M. (1983) Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. J Water Pollut Control Fed 55: 44–53.

Patel, G. B. (1984) Characterization and nutritional properties of *Methanothrix concilii* sp. nov., a mesophilic acetoclastic methanogen. Can J Microbiol 30: 1383–1396.

Pavlostathis, S . G., Giraldo-Gomez, E. (1991) Kinetics of anaerobic treatment - a critical-review. Critical Rev Env Control 21(5-6): 411-490.

Perle, M., Kimchie, S., Shelef, G. (1995) Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. Water Res 29(6): 1549-1554.

Rajeshwari, K. V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Kusum, L., Kishore, V. V. N. (2000) State of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. Renew Sustain Energy Rev 4: 135–156.

Ramsay I. R., Pullammanappallil P. C. (2001) Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. Biodeg 12(4): 247-257. doi:10.1023/A:1013116728817. PubMed: 11826907.

Reményi, K. (2007) Megújuló energiák. Akadémiai Kiadó, Budapest, 290 p. ISBN:978-963-05-8458-6.

Robbins, J. E., Gerhardt, S. A., Kappel, T. J. (1989) Effects of total ammonia on anaerobic digestion and an example of digestor performance from cattle manure-protein mixtures. Biological Wastes 27: 1-14.

Rosenzweig, A.C., Ragsdale, S.W.(Ed.) (2011) Methods in methane metabolism, Part A. Methanogenesis. Methods in Enzymology. Vol. 494. ISBN:978-0-12-385112-3.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor. ISBN: 978-0879693091.

Scherer, S., Neuhaus, K. (2006) Life at low temperatures. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E., (Eds.), The Prokaryotes: A

Handbook on the Biology of Bacteria. Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry, 3rd edition, October 6, 2006, Springer-Verlag, New York. ISBN 978-0-387-25497-5.

Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse, O., Mussgnug, J. H., Neuweger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte, K. J., Szczepanpwski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P., Goessmann, A. (2008) The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analyzed by the 454-pyrosequencing technology. J Biotech 136: 77-90.

Schmid, L.A., Lipper, R. I. (1969) Swine wastes, characterization and anaerobic digestion. Animal Waste Management. Cornell Agr Waste Manage. Conf. Proc. p. 50.

Schnürer, A., Nordberg, A. (2008) Ammonia, a selective agent for methane production by synthrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. Water Sci Technol 57(5): 735-740. doi:10.2166/wst. 2008.097. PubMed: 18401146.

Schnürer, A., Zellner, G., Svensson, B. H. (1999) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. FEMS Microbiol Ecol 29: 249-261.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Harada, H. (2001) Recent advances in methane fermentation technology. Curr Opinion Biotechnol 12: 277-282.

Sevier, C. S., Kaiser, C. A. (2002) Formation and transfer of disulphide bonds in living cell. Nat Rev Mol Cell Biol 3(11): 836-847.

Sprott, G. D., Patel, G. B. (1986) Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. Syst Appl Microbiol 7: 358–363. doi:10.1016/ S0723-2020(86)80034-0.

Sprott, G. D., Shaw, K.M., Jarrell, K.F. (1984) Ammonia/potassium exchange in methanogenic bacteria. J Biol Chem 259: 12602-12608. PubMed: 6490632. 30.

Stams, A. J. M. (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie van Leeuwenhoek 66: 271–294.

Stroot, P. G., McMahon, K. D., Mackie, R. I., Raskin, L. (2001) Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions - II: Microbial population dynamics. Water Res 35(7): 1817-1827.

Sundberg, C., Abu Al-Soud, W., Larsson, M., Svennson, B., Sörensson, S., Karlsson, A. (2011) 454-pyrosequencing analyses of bacterial and metagenomic Archaea DNA and RNA diversity in 20 full-scale biogas digesters. In *Proceedings of the*

First International Conference on Biogas Microbiology: 14–16 September 2011; Leipzig. Edited by Kleinsteuber S, Nikolausz M. UFZ Press, Leipzig; 2011:47.

Symons, G. E., Buswell, A. M. (1933) The methane fermentation of carbohydrates. J Am Chem Soc 55: 2028-2036.

Szabó, I. (1999) Hulladékelhelyezés. Miskolci Egyetemi Kiadó. Miskolc pp. 369-392.

Tafdrup, S. (1995) Viable energy production and waste recycling from anaerobic digestion of manure and other biomass. Biomass Bioenerg 9: 1-5: 303-314 doi:10.1016/0961-9534(95)00075-5.

Tamás, J., Blaskó, L. (2008) http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0032_kornyezettechnologia/ch05s02.html)

Temudo, M. F., Poldermans, R., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. C. M. (2008) Glycerol fermentation by open mixed cultures: A chemostat study. Biotechnol Bioeng 100(6): 1088-1098.

Thauer, R. K., Kaster, A-K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. Nature Rev Microbiol 6: 579-591.

The Biomass Economy (2002) http://www.neo.ne.gov/publications/PDFs/TheBiomassEconomy.pdf

Tong, X., Smith, L. H., McCarty, P. L. (1990) Methane Fermentation of Selected Lignocellulosic Materials. Biomass (21): 239-255.

Tyler, H. L., Roesch, L. F. W., Gowda, S., Dawson, W. O., Triplett, E. W. (2009) Confirmation of the sequence of '*Candidatus liberibacter asiaticus*' and assessment of microbial diversity in Huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. Mol Plant-Microbe Interactions 22: 1624-1634.

Uemura, S., Harada, H. (1995) Inorganic composition and microbial characteristics of methanogenic granular sludge grown in a thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor. Appl Microbiol Biotechnol 43: 358–364.

USEPA. 2000. Guide To Field Storage of Biosolids and Other Organic By-Products. Used in Agriculture and for Soil Resource Management, U.S. Environmental Protection Agency, pp. 134. http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/2000415S.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2000+Thru+2005&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&Q

FieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A\zyfiles\Index%20Data\00thru05\Txt\00000001\2000415S.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h|-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=p|f&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL

Van Velsen, A. F. M. (1979) Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations. Water Res 13: 995-999.

Verein Deutcher Ingenieure VDI 4630 (2006) Fermentation of organic materials, characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. Beuth Verlag GmbH, Düsseldorf, ICS 13.030.30; 27.190.

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B. (Eds.) (2009) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3: The Firmicutes Springer, 2nd ed. XXVI, 1450 p. ISBN 978-0-387-68489-5

Westerholm, M., Hansson, M., Schnürer, A. (2012) Improved biogas production from whole stillage by co-digestion with cattle manure. Biores Technol 114: 314–319. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.005. PubMed: 22464422.

Whitman, W. B. Jeanthon, C. (2006) Methanococcales. In The Prokaryotes, 3rd ed, vol. 3, New York: Springer, ISBN: 978-0-387-25493-7.

Wiegant, W. M., Zeeman, G. (1986) The mechanism of ammonia inhibition in the thermophilic digestion of livestock wastes. Agr. Wastes 16: 243-253.

Wirth, R., Kovács, E., Maróti G., Bagi Z., Rákhely, G., Kovács, K. L. (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation sequencing. Biotechnol Biofuels 5: 41.

Yadvika, S., Sreekrishnan T. R., Kohle, S., Rana, V. (2004) Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review. Biores Technol 95:1-10.

Yang, S. T., Okos, M. R. (1987) Kinetic study and mathematical modeling of methanogenesis of acetate using pure cultures of methanogens. Biotechnol Bioeng 30(5): 661-667.

Yen, H. W., Brune, D. E. (2007) Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. Biores Technol 98: 130-134.

Zehnder, A. J. B., Huser, B. A., Brock, T. D., Wuhrmann, K. (1980) Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch Microbiol 124: 1-11.

Zeikus, J. G. (1977) The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol Rev 41(2): 514–541.

Zeikus, J. G., Weimer, P. J., Nelson, D. R., Daniels, L. (1975) Bacterial methanogenesis: acetate as a methane precursor in pure culture. Arch Microbiol 104: 129-134.

A Ph.D. dolgozat összefoglalása

Napjainkban szembesülnünk kell a világ energiaválságával, ezért mihamarabb szükségessé válik, hogy rendelkezzünk olyan zöldenergia-forrásokkal, amelyek képesek hatékonyan helyettesíteni a fosszilis tüzelőanyagokat. A biogáz egy olyan megújuló energiahordozó, amely számos előnnyel jár; választ tud nyújtani számos környezeti problémára és egyúttal energiaforrásként is funkcionál. A fermentáció eredményeként visszamaradó iszap hatékonyan használható talajjavításra, ezáltal csökkenthető egy adott terület műtrágyaigénye, amelyről köztudott, hogy előállítása kifejezetten energiaigényes folyamat. Ezáltal az anaerob lebontással kapcsolt biogáz termelés számos környezetvédelmi problémát egyszerre orvosló folyamat, lehetőséget biztosít a szerves eredetű hulladékok ártalmatlanítására, a környezetszennyezés csökkentésére épp úgy, mint a CO_2-semleges megújuló energia előállítására. A biogázt elégetve hőenergiát állíthatunk elő, továbbá gázmotorban felhasználva elektromos áramot termelhetünk, tisztítást követően pedig betáplálható a földgázhálózatba. Az iparból származó hulladékok anaerob ártalmatlanítása és alapanyagként történő felhasználása így több szempontból is kiemelkedő jelentőségű. Az Európai Unióban több mint 8000 biogáz üzem működik napjainkban, ezek közül egy sem használ elsődleges alapanyagként fehérjében gazdag szubsztrátot annak ellenére, hogy folyamatosan, nagy mennyiségben termelődnek ezek a hulladékok. Az élelmiszer előállítás során keletkező mellék- és végtermékek közé tartoznak a jelentős mennyiségű keratin fehérjéből felépülő tollat is tartalmazó, szárnyas tartásból kikerülő hulladékok, amelyekből évente világviszonylatban több millió tonna képződik (2009-ben 4 millió tonna) (Danish Environmental Protection Agency: Survey of wastes spread on land –Final report study contract, 2001). A broiler csirke nevelés gyorsabban nő, mint bármelyik egyéb húsipari felhasználás. Az Európai Unió adatai alapján a világ szárnyas hús előállításának 13 %-át az EU 28 tagországa állítja elő (Grabkowsky és Windhorst, 2009). Csak ebben a régióban évi 1 millió tonna fehérje-gazdag hulladék termelődik. Brazília és a muszlim országok szárnyas hús termelése szintén jelentős. Fehérje tartalmú melléktermékek, hulladékok azonban nem csak a húsiparból kerülhetnek ki, a tejgyári hulladék jelentős része tartalmazhat különböző mennyiségű proteint. A fehérjék aminosavakból épülnek fel, amelyeket peptid-hidak kötnek össze, amely elhasítása proteázok segítségével lehetséges a fehérjék lebontása esetén. Az aminosavak lebontására a továbbiakban két útvonal áll rendelkezésre, attól függően, hogy

mely aminosavakról van szó és azok milyen koncentrációban fordulnak elő az adott reakcióközegben. A lebontás eredményeként rövid szénláncú szerves savak, NH_3, CO_2 és H_2. Az előzőekben említett két útvonal egyike a Stickland-reakció, amely során az aminosavak lebontása párban történik. Illékony szerves savak az aminosavak reduktív deaminációjával is létrejöhetnek. Ezek a folyamatok termodinamikailag azonban csak akkor lehetségesek, ha egy hidrogént felhasználó metanogén reakcióval kapcsoltak. A Stickland-reakció a legegyszerűbb módja az aminosavak lebontásának, amely során átalakított aminosavból mólonként 0,5 mol ATP képződik.

A biogáz-fermentáció szempontjából optimálisnak tekintett szén/nitrogén/foszfor (C/N/P) arány 100:3:1. A szénhidrát-gazdag hulladékokat gyakorta keverik magas nitrogéntartalmú alapanyagokkal, így állítva be az optimális elemarányt. Az anaerob fermentációban résztvevő különböző mikroorganizmus csoportok nem csak fiziológiájukban, de tápanyagszükségleteikben, növekedési kinetikájukban és a különböző környezeti hatásokkal szembeni érzékenységükben is jelentős eltéréseket mutatnak Amennyiben a mikrobacsoportok közötti egyensúly megbomlik az egyben a fermentáció instabilitásához, végső soron pedig az anaerob rendszer összeomlásához is vezethet. A magas fehérjetartalmú hulladékok nagy mennyiségben képződnek, azonban felhasználásukat nem ajánlják anaerob reaktorokban az ammóniagátlás fokozódó veszélye miatt. A szakirodalomban a gátlónak tekintett ammóniakoncentráció tág határok között változik a vizsgálati körülményektől függően, mint például az inokulum összetétele, a vizsgálathoz használt alapanyag, az adaptációs folyamat megléte vagy hiánya, valamint az üzemeltetési paraméterek, hőmérséklet és pH. Ezek függvényében jelentősen változhat a szabad NH_3 koncentrációja, amely toxikus hatását a protonegyensúly felborításával éri el. Az ammóniumion (NH_4^+) kevésbé toxikus a korábban bemutatott NH_3-nál.

A dolgozatban bemutatott eredmények prezentálásához számos molekuláris módszert alkalmaztam: kvantitatív polimeráz láncreakciót alkalmazva a rendszerbe juttatott három vizsgálni kívánt mikroorganizmus relatív mennyiségváltozását követtem nyomon. Metagenom-analízissel sikerült a biogáz-fermentorok számos állandó tagját azonosítani és időbeli változásukat nyomon követni. A rendszerbe juttatott fehérje fokozta a baktériumok fehérjebontó enzimjeik termelését, ezáltal fokozódott a proteáz aktivitás, amelyet rendszeres időközönként ellenőriztem. A fehérje-lebontásnak köszönhetően nagy mennyiségben szabadult fel a rendszerben ammóniumion, amely koncentrációjának meghatározását hetente végeztem. Az illékony szerves savak minőségi és mennyiségi analízisét HPLC segítségével végeztem, hogy követni tudjam a reaktorban zajló

mikrobiológiai folyamatokat. A vizsgálni kívánt anyagok C/N-tartalmának kalkulálásához megmértem az összes szén-, valamint az összes szerves szén tartalmakat. A termelt biogáz mennyiségét, valamint összetételét folyamatosan követtem, hogy segítségével információt nyerjek a lebontás hatékonyságáról.

A vizsgálatokhoz négy fehérje-gazdag szubsztrátot választottam: kazeint, sertésvér koagulátumot, húskivonatot, valamint növényi eredetű konyhai hulladékot. A vizsgálatokat laboratóriumi folyamatos üzemű fermentorokban, mezofil körülmények között végeztem. A gázhozam eredmények minden vizsgált alapanyag esetében magasak voltak, ezzel is alátámasztva, hogy a megfelelő adaptációs eljárást alkalmazva a fehérjék lebonthatók és jelentős energia nyerhető belőlük. A vizsgálatok során sikerült azonosítani a lebontás limitáló tényezőit is, amelyek az ammónia és a kén-hidrogén.

A fehérjével táplált fermentorokban a biogáz termelő közösség nagy mértékben átalakult a megváltozott alapanyag és annak környezetmódosító hatására, mind a hidrolizáló-, mind a szintrófikus ecetsav oxidáló baktériumok aktivitása megnőtt. A biogáz hozam jelentősen nőtt a fermentáció során a mikrobiális közösség adaptációja hatására, és ez utóbbi tényező nagyban segítette a későbbiekben megvalósított intenzifikáció folyamatát. A bemutatott adatok jól mutatják, hogy a fehérjebontás sikeres volt és eredményeként magas biometán hozam érhető el: a protein szubsztrátokból átlagosan 0,45 L CH_4/g oTS jelentősen magasabb az általában használt mezőgazdasági alapanyagokénál (0,25-0,28 L CH_4/g oTS). Mindezek alátámasztják, hogy a hulladékok ezen nagy energiatartalmú köre jól használható a fosszilis tüzelőanyagok helyettesítésére. A mikrobiális közösségek metagenom-analízise lehetőséget biztosít számunkra, hogy pontos képet kapjunk rendszer összetételéről és az abban végbemenő változásokról. A fehérjével táplált anaerob reaktorokban a mikrobiális összetétel változását követtem nyomon, mintát véve metagenom-analízishez a fermentáció három kitüntetett időpontjában: fermentáció indulásakor, félidőben, valamint a rendszer összeomlásakor. Az eredmények elemzése során egyértelműen kirajzolódik a populációváltozás a fehérje-monoszubsztráttal etetett fermentorok esetében. A teljes adaptációs folyamatot figyelembe véve a Bacteria domén, továbbá a Firmicutes és Proteobacteria törzs mutatta a legjelentősebb változásokat. A Clostridia, Bacilli és Gammaproteobacteria osztály tette ki az előző törzsek jelentős részét a vizsgálatba vont minták esetében.

Alapvető jenetőségű a biogáz kutatás és ipar számára, hogy minél mélyebb információkkal rendelkezzünk a fermentorokban zajló mikrobiológiai és biokémiai

folyamatokkal kapcsolatban, így többek között a mikrobiális közösség működésével és felépítésével kapcsolatban. A legtöbb esetben a biogáz üzemek természetes anaerob közösségeket alkalmaznak a fermentorok működtetéséhez. Munkámban bemutattam, hogy milyen irányú változások zajlanak le a reaktorokban fehérje alapú monoszubsztrátokat alkalmazva.

Az eredményeket P111425SG-PCT számon nemzetközi szabadalom védi a Szegedi Tudományegyetem tulajdonában.

Summary of the Ph.D. Thesis

Facing energy crisis, the world is in need of green, efficient, carbon-neutral energy sources to replace fossil fuels. Biogas is a renewable energy carrier and the production of biogas is associated with double benefits: elimination of environmental pollution problems is coupled with the generation of useful energy. The utilization of the digestion effluent as fertilizer for agricultural application facilitates nutrient recovery and eliminates the need for artificial fertilizers, the production of which is a highly energy demanding process. Anaerobic digestion with concomitant biogas production is an environmentally attractive technology for the treatment of organic waste. Biogas provides environmental benefits with regard to waste treatment, pollution reduction, the production of CO_2-neutral renewable energy and the improvement of agricultural practices through the recycling of plant nutrients. Biogas can be burnt to produce heat, or combusted in gas engines for electricity generation, and after purification it can be used in any application for which fossil fuel natural gas is utilized today. Anaerobic degradation is applied to a range of industrial waste streams, especially in the agro industry, which is a source of high concentrations of readily degradable organic material composed mainly of complex molecules. There is a significant potential in biogas production from industrial waste, partly because waste treatment reduces the environmental impact of these materials and partly because biogas can replace fossil natural gas in all of its applications. Despite the industrial-economic importance of the underlying microbiological events, little is known about the roles and activities of the microorganisms which inhabit the anaerobic niches. In the European Union, more than 8,000 biogas plants are currently operating, but none of them process primarily protein-rich waste, despite huge amount of such materials being generated continuously. These pollutants mount up in consuming. The roughly 1 million tons of protein-rich waste produced annually by pig, cattle and bird breeding worldwide contains manure, blood and feathers, a biomass type classified as hazardous waste in several countries. This means 500,000 tons of protein-rich waste per year in the EU alone. Many other parts of the world faces similar problem. Proteins are composed of amino acids linked by peptide bonds, which are hydrolyzed by proteases upon decomposition. Amino acids are fermented via different pathways, depending on the nature and concentrations of the amino acids present. The degradation products include short- or branched-chain organic acids, NH_3, CO_2 and H_2. Amino acids are metabolized through two main routes:

pairs of amino acids can be decomposed through the Stickland reaction; and single amino acids can be degraded in the presence of H_2-utilizing bacteria. The Stickland reaction is the simplest way to degrade amino acids and provides the cell with 0.5 mole of ATP per mole of amino acid transformed. AD demands the concerted action of many groups of microbes, each performing their special role in the overall degradation process.

The optimal carbon/nitrogen/phosphorus (C/N/P) ratio for a high methane yield is around 100:3:1. The digestibility of carbohydrate-rich wastes can be improved by mixing them with substrates of high nitrogen content, thereby improving the C/N ratio. In anaerobic fermentation, the acidogens and methanogens differ in their physiology, nutritional needs, growth kinetics and sensitivity to the environmental conditions. Failure to sustain the balance between these two groups is the main cause of process instability. The introduction of energy-rich proteinaceous waste products in large quantities into the anaerobic degradation process is not recommended in view of the increased risk of inhibition by ammonia. In the literature, the inhibitory level of the total ammonia concentration varies, depending on conditions such as the inoculum, the substrate, the acclimation need, the operation period, pH and temperature. Free NH_3 is the main cause of inhibition since it is membrane-permeable and it causes a proton imbalance and/or a potassium deficiency. The ammonium ion (NH_4^+) is less toxic.

In this study several molecular detection methods were used: the quantitative polymerase chain reaction was employed to identify the three added bacteria. Changes in time in the composition of the microbiological community were determined by next-generation sequencing-based metagenomic analyses. Proteinase activities of the consortia were monitored regularly. The changes in ammonium-nitrogen concentrations were followed during the fermentations. Volatile fatty acid compositions (acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, caproic acids) were determined using HPLC to monitor the microbiological activity in the reactors. Total carbon and total organic carbon contents have been examined to determine the C/N ratio of the biomass. Volumetric biogas yields gave information about the efficacy of the anaerobic digestion process. The composition of the evolved gas was determined by gas chromatography.

This common belief has been challenged by using protein-rich substrates, i.e. casein, precipitated pig blood protein, meat extract and kitchen waste in laboratory scale continuously stirred mesophilic fed-batch biogas fermenters. All substrates proved suitable for sustained biogas production (0.447 L CH_4/g protein oDM, i.e. organic total solids) in high yield without any additives, following a period of adaptation of the microbial

community. The apparent key limiting factors in the anaerobic degradation of these proteinaceous materials were the accumulation of ammonia and hydrogen sulfide. Characteristic rearrangements of the biogas-producing community upon protein feeding and specific differences due to the individual protein substrates were recognized. The biogas yield from the substrate (decomposition rate of the protein substrates) increased and both the activities of hydrolyzers and syntrophic acetate oxidizing bacteria (SAOB) were remarkably amplified. The results substantiated that the adaptation of the microbial community to the high protein content substrate is achievable and this modification leads to the intensification of biogas production. The results clearly demonstrate that sustained biogas production is readily achievable, provided the system is well-characterized, understood and controlled. Biogas yields (0.45 L CH_4/g oDM) significantly exceeding those of the commonly used agricultural substrates (0.25-0.28 L CH_4/g oDM) were routinely obtained. The results amply reveal that these highenergy-content waste products can be converted to biogas, a renewable energy carrier with flexible uses that can replace fossil natural gas in its applications. Process control, with appropriate acclimation of the microbial community to the unusual substrate, is necessary. Metagenomic analysis of the microbial community by next-generation sequencing allows a precise determination of the alterations in the community composition in the course of the process. The new generation SOLiD DNA metagenomic sequencing technique was employed to determine the taxonomic distribution and relative abundance of the members of the microbial community. During the anaerobic degradation fermentations, fed with protein-rich substrates and the sole source of biomass, the composition of microbial community was tested at three time points: at the start, halftime and at the end of the adaptation process. A shift in the population balance was clearly observed as part of the adaptation process to protein-rich substrates. Considering the entire period to adapt the microbial community to this unconventional substrate, the Bacteria domain, and within Bacteria the Firmicutes and Proteobacteria phyla showed the greatest alterations. The classes Clostridia and Bacilli and Gammaproteobacteria, belonging to these phyla, constitute the majority of the Bacteria in the biogas fermentor.

It is essential for optimizing the biogas-forming process to know detailed information about the diversity and a deeper knowledge of composition of the participating microbial community structure. In most cases biogas technologies commonly apply natural anaerobic consortia of microbes. We demonstrated that the composition of microbial

community of the anaerobic reactor changed after feeding with protein-rich substrates as the sole carbon source.

The findings extend the range of organic “waste” substrates, which are suitable for renewable energy production and predict routes for rational design of more effective microbial communities for industrial scale biogas production technologies.

Our work related to the anaerobic digestion of protein-rich biogas substrates has been recognized as intellectual property (Patent number: EP-12805746.0) by the European Patent Office.