

Komplex anaerob mikroba-közösség alkalmazása a „Power-to-Biomethane” technológiában.

Ph.D. értekezés

Szuhaj Márk

Biológia Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Bagi Zoltán



Szegedi Tudományegyetem TTIK

Biotechnológiai Tanszék

2022

Szeged

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	10
2	Célkitűzés.....	12
3	Szakirodalmi áttekintés	13
3.1	A biogáz előállítás története, ipari helyzete hazánkban és az Európai Unióban.....	13
3.2	A biogáz termelés mikrobiológiai háttere	17
3.2.1	Hidrolízis folyamata.....	17
3.2.2	Acidogenezis folyamata.....	18
3.2.3	Metanogenezis folyamata	20
3.3	A mikrobakonzorcium megfelelő működéséhez szükséges fermentációs paraméterek	24
3.3.1	Hőmérséklet	25
3.3.2	Kémhatás szerepe a közösségre	26
3.3.3	Fermentációs maradék és felhasználási lehetőségei	26
3.4	Metagenomika.....	28
3.5	A biogáz tisztítása	31
3.5.1	Fizikai és kémiai eljárások.....	32
3.5.2	Biológiai eljárások	35
3.6	A „Power-to-BioCH ₄ ” technológia.....	39
3.6.1	A „Power-to-bioCH ₄ ” alapú kutatások, eljárások.....	40
3.7	Hidrogén.....	43
3.8	Metán.....	45
4	Felhasznált anyagok és módszerek	47
4.1	Kevert természetes kultúra (oltóiszap).....	47
4.2	Száranyag-tartalom meghatározás	48
4.3	Szervesanyag-tartalom meghatározás	48
4.4	Légtér összetétel meghatározás.....	48

4.5	Illékony szervessav (VFA) összetétel meghatározás	49
4.6	pH meghatározás	49
4.7	Szekvenálás	49
4.8	Nyers szekvenciák szűrése	50
4.9	Leolvasás alapú metagenomika.....	50
4.10	Genom centrikus metagenomika.....	50
5	Eredmények, kiértékelésük	52
5.1	Egyszeri szubsztrát adagolás hatása a PtBioCH ₄ rendszerre	53
5.1.1	Mezofil rendszer	53
5.1.2	Termofil rendszer	59
5.2	Rendszeres szervesanyag-utánpótlás hatása a PtBioCH ₄ rendszerre	63
5.2.1	Mezofil rendszer	63
5.2.2	Termofil rendszer	67
5.3	Exogén H ₂ és CO ₂ hatása a PtBioCH ₄ rendszerre.....	72
5.3.1	Mezofil rendszer	72
5.3.2	Termofil rendszer	76
5.4	A hidrogén adagolásának hatása a fermentációs maradék mikroba konzorciumára..	81
5.4.1	Mezofil rendszer	81
5.4.2	Termofil rendszer	86
5.4.3	H ₂ hasznosító anyagcsere útvonalak keresése	92
5.5	Következtetések, javaslatok	98
6	Köszönetnyilvánítás	100
7	Irodalomjegyzék.....	101
8	Ph.D. dolgozatban bemutatott munka összefoglalása	116
9	Summary of the Ph.D. Thesis.....	119
10	Függelék	121

Ábrajegyzék:

1. ábra: A világszerte elterjedt biogáz fermentorok két típusa: (felül) Fix. kupolás rothasztó (fixed dome digester), (alul) lebegő kupolás rothasztó (floating cover digester) [1].	14
2. ábra: A biogáz erőművek számának gyarapodása évente az Európai Unió területén [6]. ...	15
3. ábra: Biogáz erőművek által termelt energia mennyiségének növekedése évente az Európai Unió területén [6].	15
4. ábra: Biogáz erőművek száma az Európai Unió országaiban [6].	16
5. ábra: A biogáz fermentáció vázlatos bemutatása ([3,12–14] alapján módosítva).	17
6. ábra: A Wood-Ljungdahl anyagcsereútvonal sémája [18].	19
7. ábra: A citokrómmal nem rendelkező hidrogenotróf metanogén mikrobák anyagcseréjének biokémiai sémája (Wolfe-ciklus) [49].	22
8. ábra: A citokrómmal rendelkező hidrogenotróf metanogén mikrobák anyagcseréjének biokémiai sémája [50].	23
9. ábra: Az Ion Torrent szekvenálás technológiai háttere ([77] alapján módosítva).	30
10. ábra: A PSA technológia sematikus működési elve [88,93] alapján módosítva.	33
11. ábra: Bioelektrokémia rendszer sematikus felépítése ([128,132] alapján módosítva).	39
12. ábra: A Power-to-Gas” technológia folyamatának sematikus bemutatása [59].	43
13. ábra: A hidrogén tárolási lehetőségei ([154,159] alapján módosítva).	44
14. ábra: A mezofil biogáztermelő közösség kumulatív metántermelése.	55
15. ábra: A fermentorok légterének CO ₂ tartalma és a visszamaradt H ₂ mennyisége.	55
16. ábra: A fermentorok pH-jának változása.	57
17. ábra: A fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav-összetétel tekintetében.	58
18. ábra: A termofil biogáztermelő közösség kumulatív metántermelése.	60
19. ábra: A fermentorok légterének CO ₂ tartalma és a visszamaradt H ₂ mennyisége.	60
20. ábra: A fermentorok pH-jának változása.	61
21. ábra: A fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav-összetétel tekintetében.	62
22. ábra: A mezofil biogáztermelő közösség napi metántermelése és a visszamaradt H ₂ mennyisége.	64
23. ábra: A fermentorok légterének CO ₂ tartalma.	65
24. ábra: A fermentorok pH-jának változása.	66

25. ábra: A termofil biogáztermelő közösség napi metántermelése és a visszamaradt H ₂ mennyisége.....	69
26. ábra: A fermentorok légterének CO ₂ tartalma.....	69
27. ábra: A fermentorok pH-jának változása.....	70
28. ábra: A fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav-összetétel tekintetében.	71
29. ábra: A mezofil biogáztermelő közösség napi metántermelése.	74
30. ábra: A fermentorok légterének CO ₂ tartalma.....	74
31. ábra: A fermentorok pH-jának változása.....	75
32. ábra: A termofil biogáztermelő közösség napi metántermelése.....	78
33. ábra: A fermentorok légterének CO ₂ tartalma.....	78
34. ábra: A fermentorok pH-jának változása.....	80
35. ábra: A fermentációs maradék mikrobaösszetételének változása a fermentáció során mezofil körülmények között.....	84
36. ábra: A mezofil fermentációs maradék genomcentrikus mikroba összetételének változása fermentáció ideje alatt.	86
37. ábra: A fermentációs maradék mikroba összetételének változása a fermentáció során mezofil körülmények között..	89
38. ábra: A termofil fermentációs maradék genomcentrikus mikroba összetételének változása fermentáció ideje alatt.	91
39. ábra: A metanogenezis 3 fő anyagcsere folyamatának sematikus ábrája.....	92
40. ábra: A genomokban fellelhető hidrogenotróf metanogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.....	94
41. ábra: A genomokban fellelhető acetotróf metanogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.	95
42. ábra: A genomokban fellelhető metilotróf metanogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.....	95
43. ábra: A genomokban fellelhető redukzív acetogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.	97
44. ábra: A genomokban fellelhető szulfát redukció útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.	97
45. ábra: Az általam javasolt „PtBioCH ₄ ” alapú rendszer megvalósításának sematikus elrendezése.	99

46. ábra: A fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav-összetétel tekintetében.	124
47. ábra: A mezofil fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav összetétel tekintetében.....	125
48. ábra: A termofil fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav összetétel tekintetében.....	126

Táblázatjegyzék:

1. táblázat: A biogáz fermentáló mikrobaközösség hőmérséklet optimuma ([3,11,54] alapján módosítva).....	25
2. táblázat: Tiszta gázok cseppfolyósítási hőmérséklete légköri nyomáson [93].....	35
3. táblázat: Fermentációs rendszer összeállításának terve.....	48
4. táblázat: A fermentorok légterébe naponta adagolt H ₂ mennyisége.	53
5. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H ₂ mennyisége.....	59
6. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H ₂ mennyisége és a szubsztrát bevitel mennyisége.....	63
7. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H ₂ mennyisége és a szubsztrát bevitel mennyisége.....	67
8. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H ₂ mennyisége.....	72
9. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H ₂ mennyisége.....	77
10. táblázat: A fizikai és kémiai biogáz tisztító eljárások ([8,231] alapján módosítva)	121
11. táblázat: A mezofil batch kísérlet összesített eredményei.....	122
12. táblázat: A termofil batch kísérlet összesített eredményei	123
13. táblázat: A hosszútávú mezofil kísérlet összesített eredményei.....	127
14. táblázat: A hosszútávú termofil kísérlet összesített eredményei.....	128

Rövidítések jegyzéke:

bioCH₄: biológiai úton előállított metán

PtBioCH₄: „Power-to-BioMethane”- a villamos energia átalakítása biológiai úton metánná

ΔG^0 : szabadentalpia-változás értéke

e⁻: elektron

H₄F: tetrahydrofolát

ATP: adenzin trifoszfát

Formil-H₄F: formil-tetrahydrofolát

NADPH⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

CFeSP: korionoid-vas-kén-fehérje

CODH/ACS: szén-monoxid dehidrogenáz/acetil-koenzimA szintáz

MFR: metanofurán

Fd_{red}: redukált ferredoxin

Formil-MFR: formil-metanofurán

Fmd: molibdén reakciócentrummal rendelkező formil-metanofurán

Fwd: wolfrám reakciócentrummal rendelkező formil-metanofurán

Ftr: formiltranszferáz

H₄MPT: tetrahidrometanopterin

Mch: metenil-tetrahidrometanopterin-ciklohidroláz

Mtd: F₄₂₀-függő metilén-tetrahidrometanopterin dehidrogenáz

Mer: F₄₂₀-függő metilén-tetrahidrometanopterin reduktáz

Metil-H₄MPT: metil-tetrahidrometanopterin

Hmd: metilén-H₄MPT dehidrogenáz

F₄₂₀H₂: redukált F₄₂₀

Frh: F₄₂₀-redukáló [NiFe]-hidrogenáz

Mtr: membrán-asszociált metiltranszferáz komplex

metil-H₄MPT: metil-tetrahidrometanopterin

CoM-SH: koenzim M

metil-S-CoM: metil-koenzim M

ADP: adenzin-difoszfát

CoB-SH: koenzim B

CoM-S-S-CoB: heterodiszulfid

Mcr: metil-S-CoM reduktáz

Mvh-Hdr: [NiFe]-hidrogenáz/heterodiszulfid reduktáz komplex

Fd_{ox}: oxidált ferredoxin

VhoACG: metano-fenazin redukáló [NiFe] hidrogenáz

HdrDE: metanofenazin-függő heterodiszulfid reduktáz

H⁺: proton

NGS: (Next-Generation Sequencing) új generációs szekvenálás

ISFET: ion-szenzitív térvezérlésű tranzisztor

CMOS: komplementer fém-oxid félvezető

MEC: mikrobiális elektrokémiai cella

CSTR: (Continuous Stirred-Tank Reactor) folyamatosan kevertetett reaktor

UASB: (upflow anaerobic sludge blanket) reaktortípus

VDI: Verein Deutscher Ingenieure (Egységesített vizsgálati módszer, VDI Richtlinien 2006)

VFA: (Volatile fatty acid) illékony szervessav

TCD: (Thermal Conductivity Detector) hővezetőképesség detektor

GWP: (Global Warming Potential) Globális felmelegedési potenciál

log₂FC: (log₂Fold Change) 2-es alapú logaritmus alapú, változást meghatározó érték

1 Bevezetés

Földünk élővilágának az elmúlt néhány évtizedben számos és egyre sürgetőbb kihívásokkal kell szembeesülnie. A Föld lakosságának globális és robbanásszerű növekedése nagymértékben fokozza az energia igényt, melynek növekedésének kedvező oldala, hogy újabb és fejlettebb, hatékonyabb technológiák kerülnek kifejlesztésre az energiahordozók által biztosított források kinyerésére. Azonban nem hagyható figyelmen kívül, hogy az életszínvonal növekedése és a fokozott energiaigény enyhítésére továbbra is a fosszilis energiahordozók biztosítják a legnagyobb mennyiségben az energiát. Ezek az energiaforrások limitáltak, újra termelődésük üteme évmilliókban számolható, ezért a könnyen hozzáférhető források kimerülésével az árak rohamosan emelkedik. Ennél sokkal súlyosabb, hogy a fosszilis energiahordozók elégetése során nagy mennyiségű szén-dioxid (CO₂) és egyéb üvegházhatású gázok kerülnek a légkörbe. Az üvegházhatású gázok nagymértékű kibocsátása jelentősen befolyásolja Földünk klíma viszonyait, és elsődleges kiváltója a globális klímaváltozásnak.

Szerencsére az emberiség kezdi felismerni a növekvő CO₂ kibocsátás veszélyeit és új, alternatív megoldásokat keresve egyre nagyobb figyelmet fordít a megújuló energiahordozókra. A korai technológiákat követően (pl.: szél-, vízmalmok) mára jóval hatékonyabb és széles körben alkalmazható eljárások léteznek a víz, szél, nap, geotermikus és a biomassza által biztosított energia hasznosítására. Ennek köszönhetően nem csupán bizonyos régiók teljes energiaellátása biztosítható megújuló forrásokból, hanem a felhasznált mennyiségen felül előállított energia gazdaságos hasznosítása jelent újabb kihívásokat. A megújuló forrásokból előállított villamos energia felhasználását jelentősen befolyásolják az energiahordozók napi vagy szezonális energiaátadási ingadozásai, valamint a geográfiai viszonyok. Az elektromos hálózatok érzékenyek a betáplált villamos energia mennyiségére, az előállított áram hosszabb idejű tárolására nem alkalmasak. Annak érdekében, hogy a megújuló villamos energia a lehető legkisebb veszteséggel tárolható legyen, alternatív megoldásokra van szükség. A korábban alkalmazott technológiák számos esetben már elavultak, illetve kapacitásuk nem kielégítő a tárolandó energia mennyiségéhez képest (pl.: ólom akkumulátorok). Más esetekben földrajzi korlátok nehezítik a termelést (pl.: hidroelektromos erőművek) vagy a technológiák fejlesztése még korai szakaszban áll és hatékonyságuk nem optimális (pl.: szuperkondenzátorok, lendkerekek).

Ezek közül érdekes megoldás a H₂, mint alternatív energiahordozó, amely nem csupán tisztasága és energiatartalma (122 kJ/g), hanem az előállításához szükséges vízbontás ismerete miatt nyújt ígéretes lehetőséget. H₂ számos technológia révén előállítható: szénhidrogének

átalakításával, deszulfurizációval, pirolízissel, plazma-, vizes fázis- (APR) és ammónia átalakítással, különböző biomasszából kinyert eljárásokkal. A legismertebb és legkörnyezetkímélőbb technológia a vízbontás, hiszen a folyamat során csak H₂ és O₂ keletkezik. Az előállított H₂ közvetlen felhasználható üzemanyagként, vagy más alternatív útvonalak során hasznosítható. Mivel a H₂ tárolására és szállítására alkalmazott technológiák jelenlegi hatékonysága, kapacitása alacsony és drága, ezért potenciális felhasználási lehetősége más alternatív energia hordozók előállításában ma még gazdaságosabban megoldható.

A H₂-nél a metán (CH₄) sokkal kényelmesebb lehetőségeket biztosít az energia tárolására, hiszen szállítására és tárolására a meglévő földgáz hálózatok alkalmasak és az energiaraktározó képessége is jelentősen előnyösebb (36 MJ/m³) a H₂-nél (10,88 MJ/m³). CH₄ keletkezik antropogén (emberi) és biogén (mikrobiális) úton. A biogén, mikrobiális CH₄ termelés az anaerob lebontás utolsó lépése során, a metanogén mikrobák anyagcseréje eredményeként keletkezik. A metanogén mikrobák az *Archaea*-k *Euryarcheota* törzsébe tartoznak és szubsztrátspecifitás alapján 3 csoportba sorolhatók: acetotróf, hidrogenotróf és metilotróf metanogének. Az acetotróf metanogének ecetsav hasítása révén állítanak elő CH₄-et és CO₂-ot. A metilotróf mikrobák metilált egy szénatomos (pl.: metanol, metilaminok, dimetilszulfid) molekulák hasznosításával képeznek metánt. A hidrogenotróf metanogének a CO₂-t redukálják H₂ segítségével CH₄-ná. A metanogén és az anaerob lebontási lánc mikrobáinak anyagcseréje révén keletkezik a biogáz (~60-70% CH₄, ~30-40% CO₂, <1% más gázok). Ebben a gázelegyben a CO₂ ipari felhasználás szemszögéből szennyezőként van jelen és jelenléte nem csupán a gázelegyünk energiatartalmát csökkenti, de számos korrozív folyamat kiváltója lehet (pl. szénsav formájában) a biogáz további hasznosítása során.

A biogáz termelő közösség fontos részét képező hidrogenotróf metanogének anyagcseréjének köszönhetően a megújuló által biztosított energia felhasználásával előállítható H₂ segítségével a biogáz fermentációja, vagy egyéb emberi tevékenység során keletkező CO₂ egy megújuló energiahordozóvá, CH₄-ná alakítható. Ha a biogáz CH₄ tartalma eléri, vagy meghaladja a 95-98%-ot már bioCH₄-ról beszélhetünk. Ez gyakorlatilag megfelel a földgáz minőségének, így közvetlen a hálózatba vezethető, tárolható, vagy járművek meghajtására felhasználható. A megújuló energiahordozókból termelt villamos energia magas energiatartalommal rendelkező és könnyen szállítható, tárolható, hasznosítható bioCH₄-ná alakítható („PtBioCH₄”).

2 Célkitűzés

Felismerve, hogy a megújuló energiahordozók energiájának hasznosításával előállított elektromos áram nagy mennyiségben elvész napjainkban, aminek oka a megújuló áram termelés és -felhasználás szezonális és napi fluktuációja. A közvetlenül fel nem használt elektromos energia tárolására szolgáló alternatív energiahordozók közül érdemes figyelmet szentelni a H₂-nek, ami az anaerob degradációt végző biogáz termelő mikrobaközösség segítségével, egy sokkal gazdaságosabb, veszélytelenebb gázzá, CH₄-ná alakítható a hidrogenotróf metanogén *Achaea*-k segítségével. Célul tűztem ki a BioCH₄ termelés biotechnológiájának megismerését a következő részfeladatokra osztva:

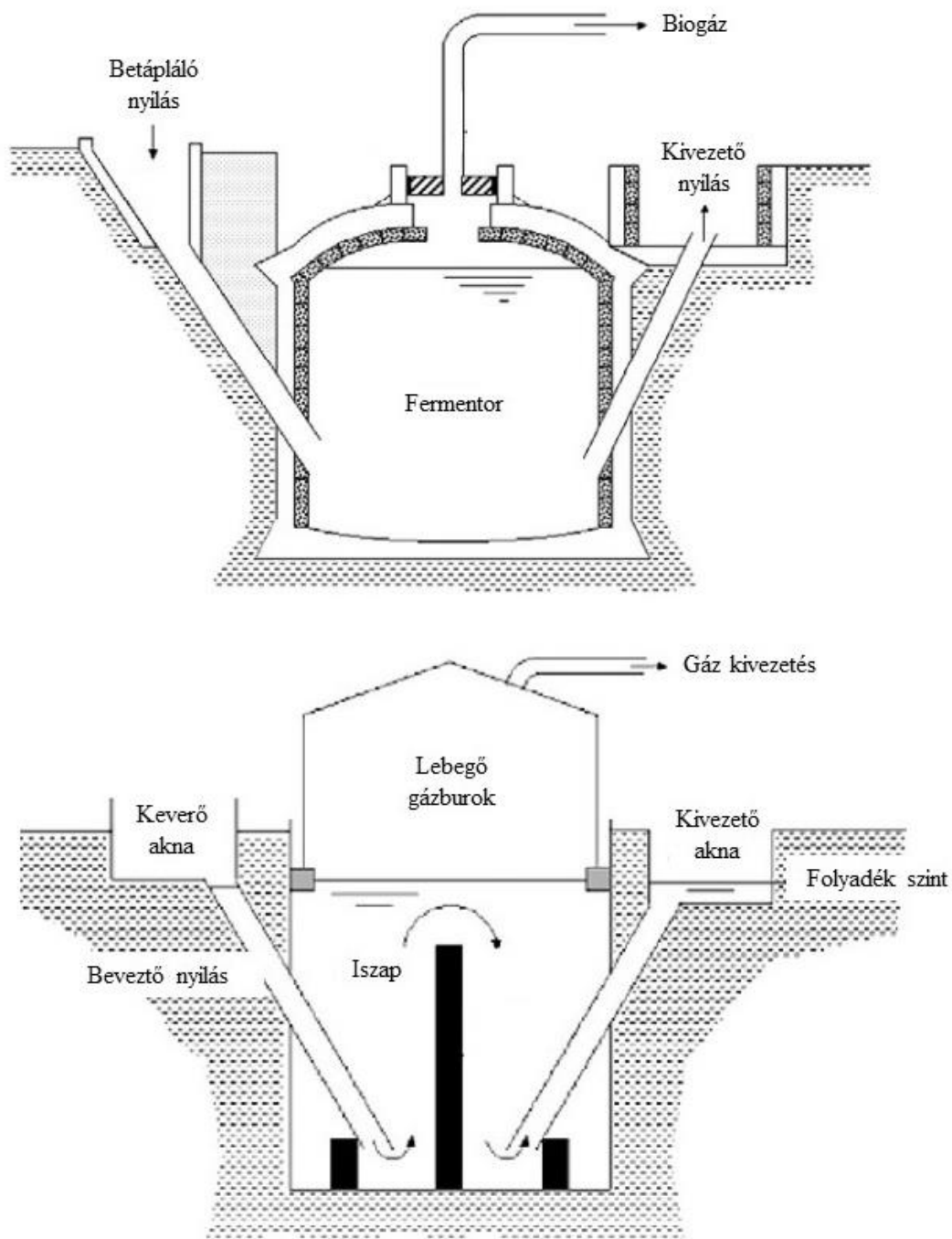
1. Anaerob kevert kultúrájú mikrobaközösség anyagcseréjében bekövetkező változások nyomon követése szakaszos H₂ adagolás hatására mezofil és termofil körülmények között egyaránt.
2. Ipari körülmények modellezése a szakaszos szervesanyag-utánpótlás és az in-situ biogáz minőségjavítás lehetőségeinek vizsgálata fed-batch fermentáció esetén. Mezofil, illetve termofil körülmények között a két különböző hőmérséklettartomány mikroba közösségének anyagcsere folyamatainak jellemzése.
3. Mezofil, termofil fermentációs folyadék mikrobaközösségének hosszú távú felhasználási lehetőségeinek vizsgálata. Szakaszos H₂ betáplálás és szerves szubsztrát bevitelével a fermentációs maradék tározók lehetséges új funkciójának labor szintű tesztelése.
4. Metagenomikai vizsgálatok segítségével a mikrobaközösségben H₂ és CO₂ bevitel hatására bekövetkező változások megismerése. A szerves szubsztrátban szegény és H₂ és CO₂-ban gazdag körülményekhez adaptálódott mikrobák azonosítása.
5. Metagenomikai vizsgálatok eredményeiből mikrobiális genomok összeszerelése, az összeszerelt binek relatív gyakoriság változásának nyomon követése. A genomokban H₂ hasznosító (hidrogenotróf metanogenezis, redukzív acidogenezis, szulfát redukció) és a metanogenezis anyagcsere útvonalakban szerepet játszó enzimek keresése.
6. Összehasonlító vizsgálatok segítségével a fermentációs maradék alkalmazási lehetőségeinek meghatározása, a „Power-to-BioCH₄” folyamat hatékony és gazdaságos katalizátoraként való alkalmazási lehetőségeinek feltárása.

3 Szakirodalmi áttekintés

3.1 A biogáz előállítás története, ipari helyzete hazánkban és az Európai Unióban

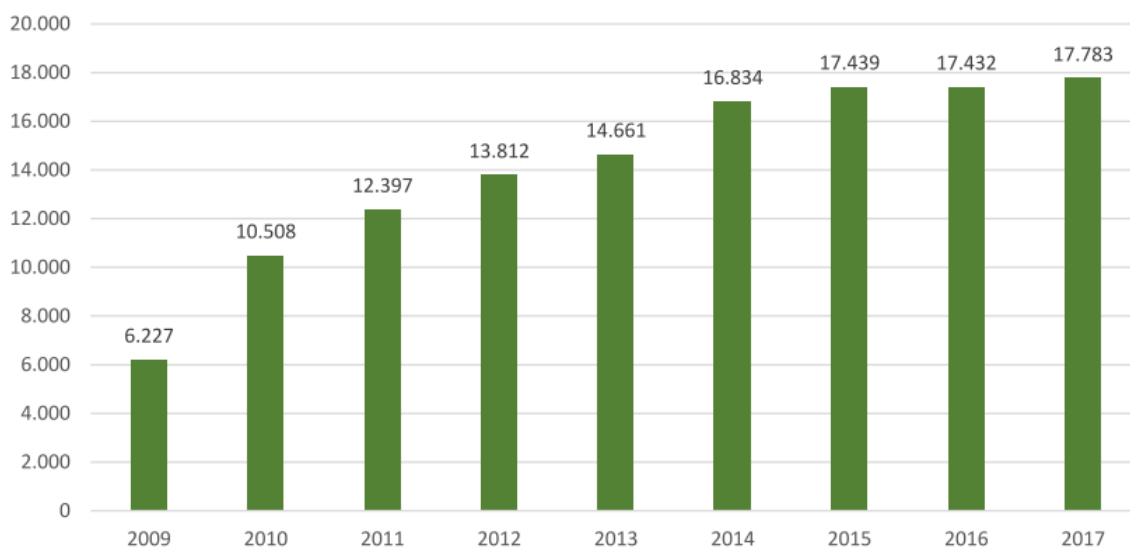
Az első feljegyzések a biogáz ismeretéről az ie. 10. századra tehetők, amikor az Asszír birodalom fürdővizet biogáz segítségével melegítették fel és ókori kínai feljegyzéseket is találtak, amelyek szerint az anaerob lebontást alkalmazták a szerves hulladék kezelésére [1,2]. Jóval később, Shirley 1677-ben fedezte fel a mocsárgázt, ezt követően 1776-ban Volta bizonyította éghető mivoltát. A biogáz legfontosabb összetevőjét a CH₄-t Daltonnak sikerült azonosítani, de azt, hogy az egész biogáz képződés folyamatért mikroorganizmusok a felelősek Pasteur-nek sikerült bizonyítania. A XIX. században felgyorsultak az események a biogáz hasznosítását illetően. 1856-ban Indiában, Matungában létrehozták a világ első biogáz telepét és 1888-ban Gayton már 35°C-on anaerob közegben inkubált trágya és víz segítségével meggyújtható biogázt állított elő (1. ábra) [3]. 1890-ben a nagy-britanniai Exeterben biogáz segítségével működött a közvilágítás [1]. A biogáz ipari felhasználása az 1900-as évek elején kezdett világszerte elterjedni, szabványosított, több m³ térfogatú reaktorokat fejlesztettek ki Kínában [2]. Németországban 1920-ban kezdett működni az első szennyvíziszap alapú biogáz reaktor, mely biogázt táplált be a lakossági gáz hálózatba. Az első mezőgazdasági hulladékkal táplált biogáz erőmű beüzemeléséig egészen 1950-ig kellett várni, melyet szintén Németországban hoztak létre. Az 1970-es évektől kezdve világszerte, Ázsiában, Afrikában és Amerikában is megkezdődött a biogáz fermentáló erőművek elterjedése, amelynek kiváltó oka a dráguló olajárak voltak. 1988-ra már 4,7 millió háztartási biogáz fermentort jelentettek be csak Kínában, ami 2007-re 26,5 millióra nőtt, ezek többsége 6-8 m³-es háztartási méretű reaktor [4,5].

Magyarországon a XX. század elejétől indultak be a biogáz alapú kutatások és számos kísérleti üzemi reaktor épült. Nemzetközi viszonylatban Dr. v. Bartha István tervei alapján Indiában 2 biogáz üzem is felépült 1959-65 között [3].

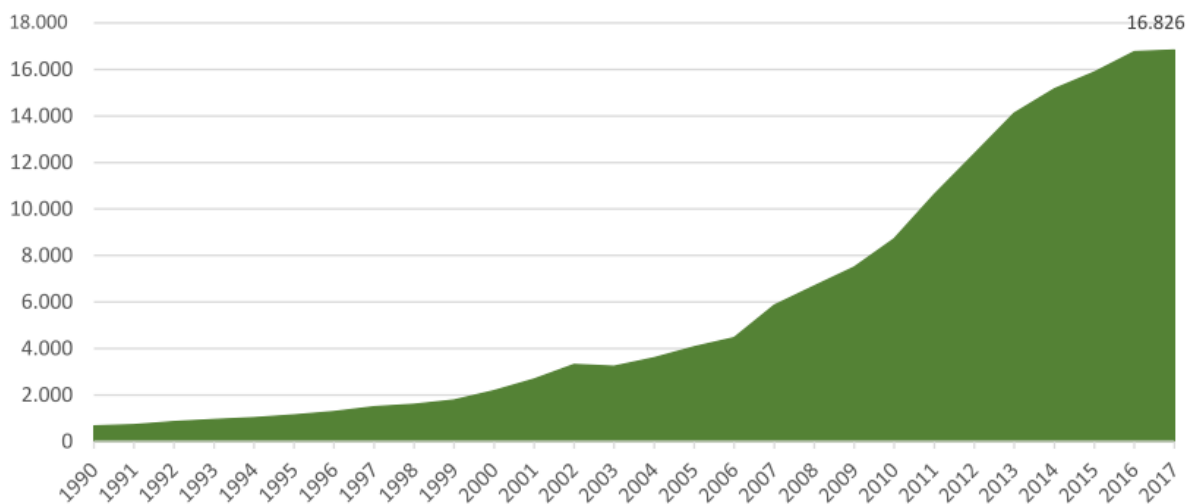


1. ábra: A világszerte elterjedt biogáz fermentorok két típusa: (felül) Fix. kupolás rothasztó (fixed dome digester), (alul) lebegő kupolás rothasztó (floating cover digester) [1].

Európában, különösen az Európai Unió tagállamai körében, az elmúlt években folyamatosan növekedett a biogáz erőművek száma, 2017-ben már 17 783 üzemelt (2. ábra) [6]. Az erőművek száma és az előállított és felhasznált biogáz mennyisége dinamikusan nő [6,7]. Mára 25-ször annyi energiát (16 826 ktoe= 704 470 970 GJ) állít Európa elő, mint a 1990-es évek elején (3. ábra). A további fejlesztési lehetőségeket mutatja, hogy ez az energia mennyiség csupán az 1%-át fedezi az Európai Unió teljes energia felhasználásának [6].



2. ábra: A biogáz erőművek számának gyarapodása évente az Európai Unió területén [6].

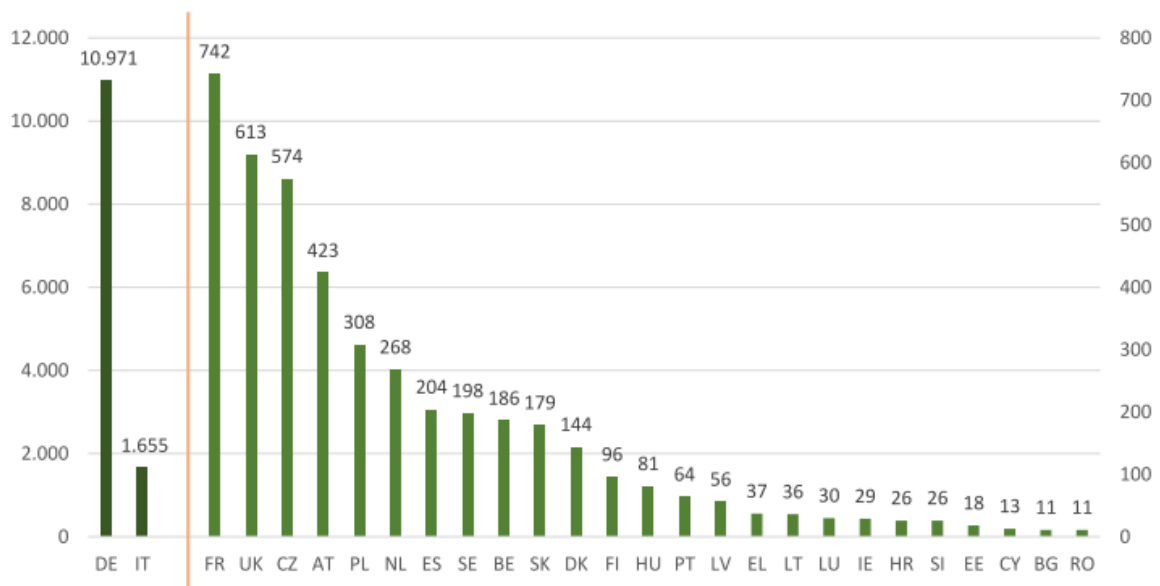


3. ábra: Biogáz erőművek által termelt energia mennyiségének növekedése évente az Európai Unió területén [6].

A nyers biogáz számos szennyezőt is tartalmaz a CH₄ mellett, amelyek csökkentik a kalória értékét és néhány vegyület korrozív. A szennyező komponensek eltávolítása energetikai és

technológiai szempontból is fontos. A tisztított biometán (bioCH₄) 95%-nál magasabb CH₄-t tartalmaz, a földgázzal közel azonos energiataralommal rendelkezik, ezáltal a földgáz hálózatokba bevezethető. 2017-ben már 69 668 350 GJ (1 664 ktoe) bioCH₄-t állítottak elő az Európai Unió területén [6–8].

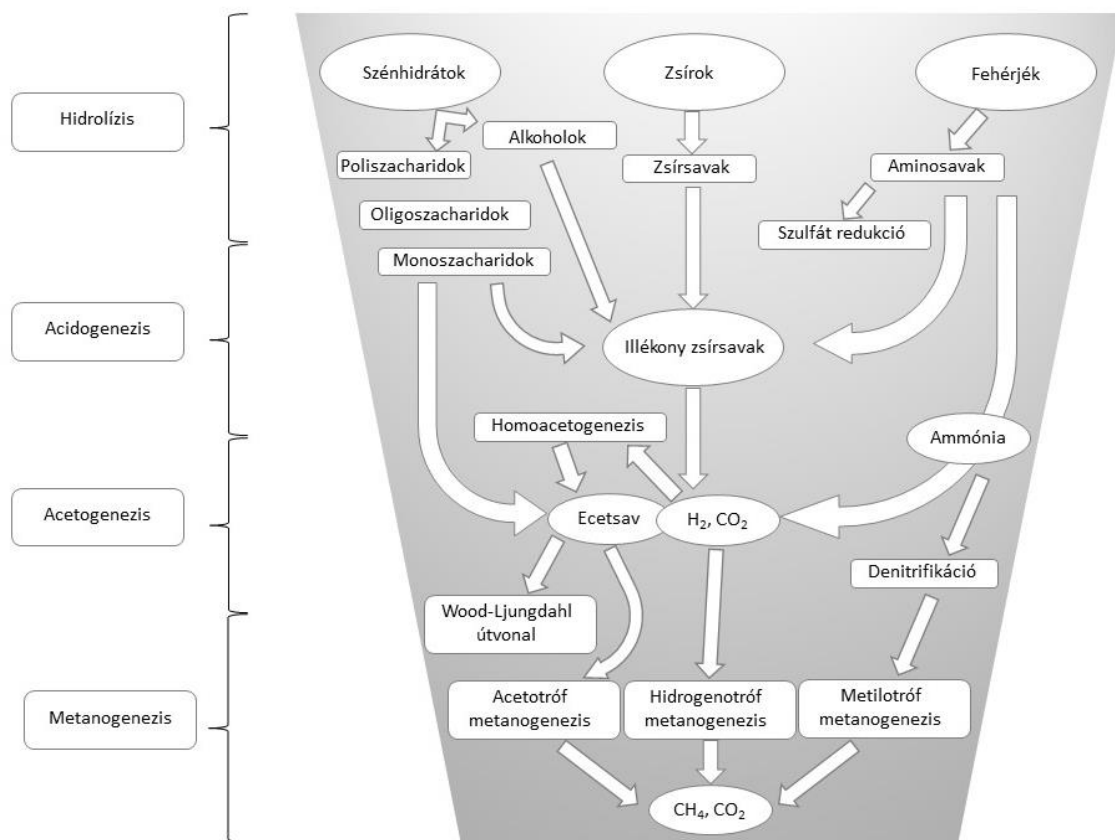
Hazánkban annak ellenére, hogy geográfiai és gazdasági viszonyai alapján az ország biogáz potenciálja jelentős, az ipari biogáz üzemek nagyszámú telepítése és beüzemelése sokáig váratott magára. 2014-re a hazánkban beüzemelt biogáz erőművek száma 74-re emelkedett, amelyek közül 47 db szervesanyag ellátását biztosította háztartási, mezőgazdasági és állattartási hulladék, 11db szennyvíztisztítóhoz kapcsolt biogáz üzem és 16 db hulladéklerakóra települt [9]. Sajnálatos módon az ország gazdaságpolitikája nem megfelelően támogatja a megújuló alapú energiatermelést Magyarországon, így a biogáz szektor fejlődése is lassúnak mondható. 2017-re Magyarországon mindössze 81 db biogáz üzem működött, ezzel szemben a hazánkhoz hasonló adottságokkal rendelkező Csehország már 574, Ausztria 423, Észtország 204 működő biogáz erőművel rendelkezett (4. ábra).



4. ábra: Biogáz erőművek száma az Európai Unió országaiban [6]

3.2 A biogáz termelés mikrobiológiai háttere

A biogáz fermentáció hátterében egy összetett mikrobiológiai folyamat rejlik, amelyet különböző mikrobák összehangolt anyagcsere aktivitása biztosít [10]. Ahhoz, hogy a biogáz fermentáció végbe menjen 4 fő mikrobacsoport jelenlétére van szükség. A hidrolizáló-, acidogén, acetogén és metanogén mikroorganizmusok anyagcseréjük révén szorosan összekapcsolt működése biztosítja a közösség minden csoportjának a megfelelő tápanyag utánpótlást [3,11].



5. ábra: A biogáz fermentáció vázlatos bemutatása ([3,12–14] alapján módosítva).

3.2.1 Hidrolízis folyamata

A biogáz fermentáció első lépése a rendelkezésre álló komplex szerves molekulák bontása, vagyis a hidrolízis. A fehérjék, szénhidrátok zsírok hasítását végzik a hidrolizáló mikroorganizmusok extracelluláris enzimeik (cellulázok, lipázok, proteázok) segítségével. A vizes fázisba oldódva ebben a formában már a mikrobák számára is felvehetőek lesznek. Itt további lebontási lépések következhetnek be. A végtermékként keletkezett szénhidrát

monomerek, -oligomerek, zsírsavak, aminosavak és illékony szerves savak szolgálnak tápanyagul a savképző mikrobák számára [3,11,13,15]. A hidrolízis a biogáz termelődésének sebesség meghatározó lépése [3,14].

3.2.2 Acidogenezis folyamata

Az acidogenezis két fő lépésre tagolható. Az első lépésben a hidrolízis során előállított szerves szubsztrátot bontják a mikrobák és alkoholok, valamint hosszabb szénláncú szerves savak (propionsav, vajsav) keletkeznek. Ezeket a szerves savakat a metanogén mikrobák nem képesek anyagcseréjük során felhasználni, ezért más acetogén baktériumok oxidálják tovább ecetsavvá, amely az acetotróf metanogének számára már hasznosítható szubsztrát [14,16]. A szerves savak átalakítása során H_2 és CO_2 keletkezik melléktermékként, amely két másik mikrobacsoportnak a homoacetogén baktériumoknak és a hidrogenotróf metanogéneknek szolgálnak szubsztrátul [13].

Az acetogén mikroorganizmusok közé tartoznak egy egészen egyedülálló csoportot alkotva a homoacetogén baktériumok. Ezek a mikrobák H_2 -t felhasználva redukálják a CO_2 -t acetáttá (1. egyenlet). Ezért nevezik a folyamatot reduktív acidogenezisnek is [17,18]. A homoacetogén mikrobák ezért szintrófikus kapcsolatban állnak az acetotróf metanogénekkal, ugyanakkor versengenek a CO_2 , H_2 -ért a hidrogenotróf metanogénekkal. Mezofil és termofil hőmérsékleten a homoacetogén baktériumok nem képesek felvenni a versenyt a hidrogenotróf metanogénekkal, mert az utóbbiak energetikailag kedvezőbb helyzetben vannak (-75,7 kJ/mol)[19–21]. Pszikrofil hőmérsékleti tartományban már a homoacetogenezis a hatékonyabb [21,22]. Kérődző állatok, nyulak, kenguruk és természetek emésztőrendszerében is megfigyelték ezeket a folyamatokat [23–28].

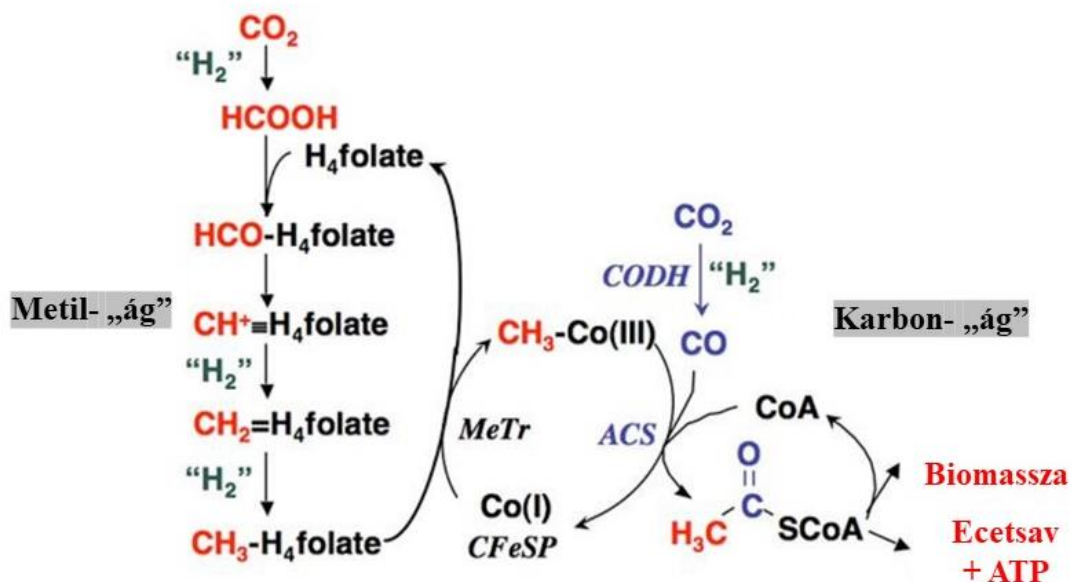


1. egyenlet: A homoacetogenezis jellemző folyamata [21].

Az aceto- és acidogenezis során keletkező termékek a fermentáció jó indikátorai. A szerves savak felhalmozódása túlzott szervesanyag ellátásra utal, ami a közeg pH-jának csökkenéséhez vezet. A nagy mennyiségű H_2 felszabadulás szintén a szerves savak hasítását végző mikrobák túlzott aktivitására utal [15,29].

3.2.2.1 A redukzív acidogenezis biokémiai háttere

A Wood-Ljungdahl útvonal első lépéseken a CO_2 a metil-„ágon” a wolfrám vagy szelenocisztein tartalmú formát dehidrogenáz enzim és 2 elektron (e^-) segítségével hangyasavvá redukálódik. A hangyasav kötődni tud a tetrahidrofoláthoz (H_4F) az adenzin-5'-trifoszfát (ATP) függő formil- tetrahidrofolát szintáz segítségével és formil-tetrahidrofolátot (Formil- H_4F) hoz létre. Formil- H_4F víz kilépése mellett metenil-tetrahidrofoláttá alakul, majd a metenil-tetrahidrofolát dehidrogenáz $2 e^-$ segítségével metilén-tetrahidrofoláttá redukálja. A metil-„ág” következő lépését a metenil-tetrahidrofolát reduktáz katalizálja, ez a metilén-tetrahidrofolát metil-tetrahidrofoláttá redukálása nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (NADPH^+) használva elektron donorként. A metil-„ág” cilusát a metil transzferáz enzim működése teszi teljessé, a metil-tetrahidrofolát metil csoportját a korrioid-vas-kén-fehérje (CFeSP) kobalt centrumához szállítja, míg a szabaddá vált tetrahidrofolát újrahasznosulhat a ciklus kezdetén. A metil csoport a CFeSP-ről a CO dehidrogenáz/acetil-CoA szintáz (CODH/ACS) segítségével válik le. A CODH/ACS egyrészt köti a CFeSP-ről származó metil csoportot, másrészt hozzákapcsol egy másik CO_2 molekulából származó CO-t , így képződik az acetil-koenzimA (acetil-CoA). Az acetil-CoA foszfoetranszacetiláz segítségével alakul acetil-foszfáttá, amiből az acetát kináz enzim készít acetátot ATP képződés mellett [18,30,31].



6. ábra: A Wood-Ljungdahl anyagcsereútvonal sémája [18]

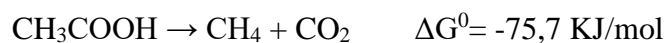
3.2.3 Metanogenezis folyamata

A metanogenezis az anaerob lebontás utolsó lépése. A folyamatot végző mikroorganizmusok az *Archaea*-k *Euryarcheota* törzsébe tartoznak [3,14]. A metán előállítására a következő 7 rend tagjai képesek: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* és a *Methanomassiliicoccales* [32,33]. Előfordulásuk alapján igen változatos mikrobacsoportról beszélhetünk, metanogéneket izoláltak már mélytengeri hőforrások mellől, extrém sós tavakból, savas tőzeglápokból, hegyi tavakból, permafrosztból [34–37] és számos élőlényből is [38,39].

Mivel a legősibb mikrobákat képviselik, felépítésük is nagyban különbözik az Eubaktériumoktól. Ezek az obligát anaerob mikroorganizmusok murein helyett, pszeudomurein alkotta sejtfallal rendelkeznek [40]. Membrán összetételük is különbözik a bakteriális glicerinn alapú észter kötésekkel rögzített struktúrától, az *Archaea*-k membránjának kötéseit éter kötések stabilizálják [41].

A metanogén mikrobák szubsztrát specificitásuk alapján 3 csoportba sorolhatók: acetotróf-, hidrogenotróf-, metilotróf metanogének [11].

Az acetotróf vagy acetoklasztikus metanogének az acetogén baktériumok által előállított ecetsavat használják anyagcseréjük során és abból állítanak elő CH_4 -t és CO_2 -t (2. egyenlet). Ezen kívül előfordulnak olyan acetotróf metanogének is, amelyek képesek az ecetsavnál hosszabb szénláncból felépülő szerves savak (pl.: propionsav, vajsav) hasítását végezni és CH_4 -t előállítani belőle, annak ellenére, hogy ez az útvonal kevésbé domináns. A propionsav és a vajsav teljes átalakítása és CH_4 előállítása rendszerint 2 vagy több mikroba törzset érint és 2 lépésben történik a teljes átalakítás [11].



2. egyenlet: Az acetotróf metanogenezis [42].

A hidrogenotróf metanogének a CO_2 -t redukálják H_2 segítségével CH_4 -ná (3. egyenlet). Fontos szerepük van a H_2 parciális nyomásának alacsonyan tartásában, mivel mind az acetotróf metanogének mind az acetogén baktériumok érzékenyek a magas H_2 koncentrációra.



3. egyenlet: a hidrogenotróf metanogenezis [21].

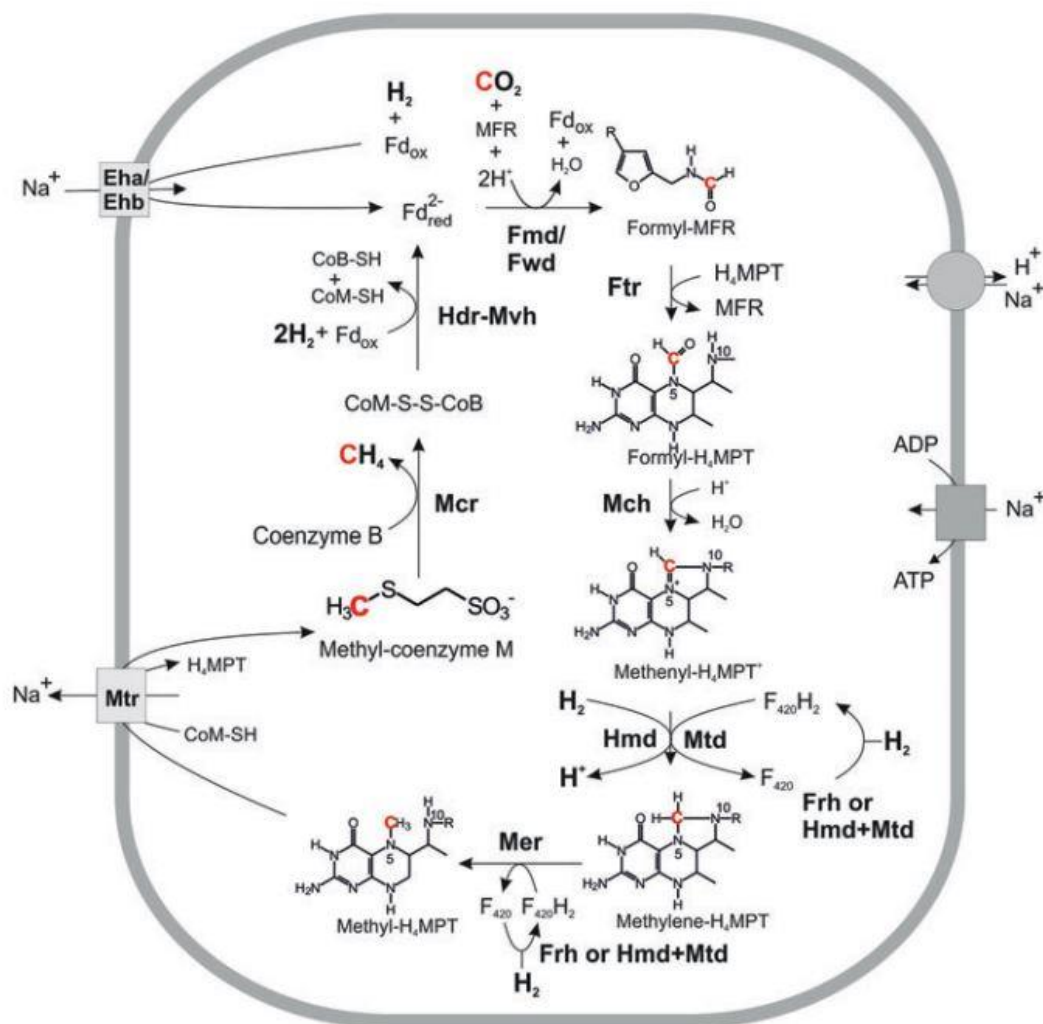
A metanogén mikrobák harmadik csoportja a metilotróf metanogének. Ezek metilált egy szénatomos (pl.: metanol, metilaminok, dimetilszulfid) molekulák átalakítását végzik CH₄-ná. A metilotróf metanogének viszonylag szűk csoportot alkotnak és a *Methanosarcinales* rend tagjai egy faj, a *Methanospaera sp.* kivételével, amely a *Methanobacteriales* rendbe tartozik [11,14].

Jellemzően a keletkező CH₄ mennyisége nem egyenlő arányban oszlik meg a 3 metanogén csoport közt, általában az acetotróf metanogének által előállított mennyiség (~70%) dominál. A maradék 30%-ot elsősorban a hidrogenotróf metanogének állítják elő és elenyésző 1-2 %-os CH₄ termelés tudható be a metilotróf metanogenezis eredményeként [14]. Megjegyzendő, hogy a metanogén mikroorganizmusok általában lassan növekednek, ezért az anaerob mikroba közösségekben kis hányadot képviselnek [11,43].

3.2.3.1 A hidrogenotróf metanogenezis biokémiai háttere

A citokrómmal nem rendelkező metanogénekben a CH₄ termelés első lépése a CO₂ redukciója a metanofurán (MFR) és redukált ferredoxin (Fd_{red}) segítségével, ami formil-metanofuránná alakul (formil-MFR). A reakciót a formil-metanofurán dehidrognáz enzim katalizálja. Ennek az enzimnek két izoformája fordul elő metanogénekben; az egyik molibdén (Fmd), míg a másik wolfrám (Fwd) iont tartalmaz a reakciócentrumában. A formil-metanofurán formil csoportját a formiltranszferáz (Ftr) enzim egy tetrahidrometanopterinhez (H₄MPT) kapcsolja. Az így létrejött N⁵-formil-tetrahidrometanopterin 3 lépéses enzimatiszus átalakuláson megy keresztül metenil-tetrahidrometanopterin-ciklohidroláz (Mch), F₄₂₀-függő metilén-tetrahidrometanopterin dehidrogenáz (Mtd) és a F₄₂₀-függő metilén-tetrahidrometanopterin reduktáz (Mer) enzimek segítségével. A képződő termék a metil-tetrahidrometanopterin (metil-H₄MPT). Ennek a reakciósornak az utolsó lépésénél a metenil-H₄MPT⁺ redukciójánál használdik fel H₂, mint elektron donor metilén-H₄MPT dehidrogenáz (Hmd) vagy a metilén-tetrahidrometanopterin dehidrogenáz (Mtd) segítségével. Ha a metilén-tetrahidrometanopterin dehidrogenáz (Mtd) katalizálja a redukciót, akkor a F₄₂₀ redukált formája biztosítja a H₂ forrást (F₄₂₀H₂), ezt a F₄₂₀-redukáló [NiFe]-hidrogenáz (Frh) vagy a Hmd és a Mtd végzi H₂ jelenlétében. A membrán-asszociált metiltranszferáz komplex (Mtr) által katalizált reakció során a metil-tetrahidrometanopterin (metil-H₄MPT) a koenzim M (CoM-SH) segítségével létrehozza a metil-koenzim M-et (metil-S-CoM). Ez a reakció Na⁺ kiürítéssel jár együtt, ami az A₁A₀- típusú adozin-trifoszfát (ATP) szintáz működését aktiválja. Ezáltal Na⁺ kerül a sejtbe

és adenzin-difoszfát (ADP) foszforilálódik, a mikroba energiához jut. Ezt követően a metilkoenzim M-et (metil-S-CoM) redukálja a koenzim B (CoB-SH) és heterodiszulfid (CoM-S-S-CoB), CH₄ keletkezik. A reakciót a metil-S-CoM reduktáz (Mcr) katalizálja. A ciklus utolsó, összekapcsoló eleme az elektron bifurkációs rendszer, amely a [NiFe]-hidrogenáz/heterodiszulfid reduktáz komplex (Mvh-Hdr) segítségével katalizálja a heterodiszulfid (CoM-S-S-CoB) redukcióját H₂ jelenlétében koenzim M-mé (CoM-SH) és koenzim B-vé (CoB-SH). A heterodiszulfid (CoM-S-S-CoB) redukciójával párhuzamosan történik a ferredoxin (Fd_{ox}) redukciója is H₂ segítségével. Az így keletkezett redukált ferredoxin forma (Fd_{red}²⁻) egy új hidrogenotróf folyamat kiindulópontja [44–48].



7. ábra: A citokrómokkal nem rendelkező hidrogenotróf metanogén mikrobák anyagcseréjének biokémiai sémája (Wolfe-ciklus) [49].

A 7. ábra által összefoglalt hidrogenotróf metanogén útvonal mellett létezik egy, citokrómokkal kapcsolt CH₄ bioszintézis is (8. ábra), amely a *Methanosarcinales* rend tagjai

3.3 A mikrobakonzorcium megfelelő működéséhez szükséges fermentációs paraméterek

Ahhoz, hogy a biogáz fermentációja a lehető leghatékonyabban menjen végbe, a szerves biomassza lebontását, a biogáz képzését végző mikrobák számára biztosítani kell a megfelelő környezeti paramétereket. A mikroba közösség összetételét és anyagcsere folyamatait a legnagyobb mértékben a hőmérséklet befolyásolja. A hőmérséklet befolyásoló hatását részletesen a 3.3.1-es fejezetben mutatom be. A közeg pH-ja szintén fontos paraméter a fermentáció minősége szempontjából. A neutrálistól kevéssé eltérő pH (7-7,5) kedvez a leginkább a biogáz fermentáló közösség mikrobáinak. A lebontásban résztvevő mikrobák kapcsolatát az anyagcseretermékeik révén a pH szabályozásában a 3.3.2-es fejezetben ismertetem részleteiben. A pH-nak, a gázösszetételnek, a szervessav összetételnek és a hőmérsékletnek fontos jelentősége van az eredményeim bemutatása során, azonban más, a kutatáshoz szorosan nem kapcsolódó paraméterek is befolyásolják a fermentációban résztvevő mikrobák anyagcsere folyamatait. Ilyen paraméterek közé tartoznak a redox potenciál, szén/nitrogén (C/N) arány, ammónium-ion (NH_4^+) koncentráció, nyomelem összetétel, a szerves szubsztrát beviteli mennyiségét meghatározó ORL (Organic Loading Rate) és az ezzel szorosan összefüggő HRT (Hydraulic Retention Time) [11,51]. Az ORL értéke határozza meg a reaktorokba bevitt szerves szubsztrát mennyiségét adott időegység alatt (térfogat/idő) [51]. A HRT értéke a fermentációs folyadék, iszaprothasztókban eltöltött (fermentáció) idejét fejezi ki [11]. A fermentációs közeg redox potenciáljának az anaerob mikroba közösség megfelelő működése szempontjából van fontos szerepe. A biogáz fermentációja szempontjából legjelentősebb mikrobák obligát anaerob körülmények között (O_2 hiányában) képesek csak túlélni, anyagcsere folyamataikat végezni. A metanogenezis megfelelő működéséhez a közegnek alacsony elektronelnyelő képességgel kell rendelkeznie, a mikrobák anyagcsere folyamataihoz minél alacsonyabb, -200 és -400 mV közötti redox potenciál érték az optimális [11,52]. A C/N arány és az NH_4^+ egymástól nem teljesen független paraméter. A fermentáció során bejuttatott szerves szubsztrát összetétele nagyban meghatározza a fermentáció minőségét. Ha a bevitt szubsztrát C/N aránya alacsony, akkor túl sok nitrogénben magas biomassza kerül a rendszerbe, amelynek a bomlástermékeként NH_4^+ keletkezik. Az NH_4^+ sejtekbe jutva a mikrobák intracelluláris pH-jának változását eredményezi, ami gyakran a mikrobák pusztulását váltja ki. Az NH_4^+ 3-4 g/l feletti koncentráció esetén citotoxikus. Annak érdekében, hogy az NH_4^+ felhalmozódását elkerülhessük a bevitt szubsztrát C/N arányát 15-30:1 érték között kell tartani [51,53].

3.3.1 Hőmérséklet

A hőmérséklet nagyban befolyásolja minden élőlény életfolyamatait, így a szerves biomassza anaerob lebontását végző mikrobaközösséget is. A biogáz fermentációt végző mikroorganizmusokat széles hőmérséklet skálán, a pszikrofilról egészen a hipertermofilig megfigyelhetjük (1. táblázat). A hatékony CH₄ termelés szempontjából a két legjelentősebb hőmérsékleti tartomány a mezofil és a termofil [54]. Ipari körülmények között a mezofil az elterjedtebb, annak ellenére, hogy számos eredmény azt bizonyítja, hogy 25-50%-kal magasabb CH₄ hozam érhető el termofil fermentáció esetén. Azonban a termofil reaktorok teljesítményének ingadozását is eredményezheti a termofil közösség [11]. A fő kiváltó oka ezeknek az ingadozásoknak a termofil közösségek alacsonyabb mikroba diverzitása, különösen az *Archaea*-k esetében. A nagyobb mikroba változatosság szélesebb szubsztrát specificitást nyújt a teljes közösségnek, valamint biztosítja a közösség hatékony működését bizonyos mikrobák pusztulása esetén is [11,55,56]. A diverzitás csökkenésének eredménye, hogy magas hőmérsékleten a fermentációs közeg patogén mikrobái kis eséllyel élnek túl, így ennek kezelése nagyobb személyes biztonságot nyújt [56]. A kisebb diverzitás mellett további stabilitási problémákat válthat ki, hogy a termofil mikrobák kisebb sejtsűrűséget képesek csak elérni, szemben a mezofil kultúrákkal. Termofil hőmérséklet-tartományban a gyorsabb enzimatikus folyamatok eredményeként a közösség mikrobáinak pusztulási gyakorisága és sebessége magasabb [11]. Ezen folyamatok eredményeként a termofil hőmérséklet-tartományban végzett fermentáció kezelése sok esetben nehézségeket okoz és teszi ezzel kedvezőbb lehetőséggé a mezofilt.

Mikroba közösség	Hőmérséklet-tartomány [C°]
Pszikrofil	5-25
Mezofil	30-40
Termofil	50-60
Hipertermofil	65≤

1. táblázat: A biogáz fermentáló mikrobaközösség hőmérséklet optimuma ([3,11,54] alapján módosítva).

3.3.2 Kémhatás szerepe a közösségre

Ahogy a legtöbb mikroorganizmusnak, a metanogén mikrobáknak is a neutrális pH (7-7,5) a legideálisabb a megfelelő anyagcsere megvalósulásához. A mikroba közösségekben megtalálható mikroorganizmusoknak eltér a pH optimuma, ahogyan sok más élőlényénél, a biogáz fermentációban résztvevő mikrobáknál is megfigyelhető az átfedő pH tartomány, ahol a közösség minden tagjának az anyagcsereje aktív marad [57,58]. Az acidogén, acetogén baktériumok enzimatikus folyamatai optimális körülmények között pH 5 felett működnek megfelelően. Ez a közeg a metanogén mikrobák megfelelő működéséhez túl savas, mivel utóbbiak a neutrálistól jelentősen nem eltérő pH tartományt kedvelik [11]. Emiatt, ahogy a természetben a közösség tagjai alakítják anyagcserejük révén a közeg pH-ját, úgy szükséges egy jól működő ipari biogáz fermentáció pH-ját szabályozni, hogy a biogáz termelő közösség minden tagjának megfelelő legyen.

A mikrobák anyagcserejük, anyagcseretermékeik által szabályozzák, befolyásolják a fermentációs közeg pH-ját. Az acidogenezis során illékony szerves savak kerülnek a fermentációs elegybe, amelyek savasítják a közeg pH-ját. Szintén savas irányba tolja a pH-t a szerves savak hasítása révén felszabaduló, és a folyadék fázisban karbonátok/bikarbonátok formájában oldott CO_2 . Ezeket a savasító anyagcseretermékeket felhasználva ellensúlyozzák a pH változását a hidrogenotróf és acetotróf metanogén *Archaea*-k. Ez a két fő metanogén mikrobacsoport CH_4 -t állít elő azáltal, hogy savas pH-t eredményező oldott CO_2 /bikarbonátokat és ecetsavat használnak fel. Ezzel a lúgosítják a közeg pH-ját. A szervessav-képző és a metanogén mikrobák anyagcsere-folyamataik által szabályozzák a fermentációs közeg pH-ját, a közösség megfelelő, összehangolt működése esetén a folyamatok kiegyenlítik egymást és az optimális tartományban tartják azt, hogy a CH_4 termelő mikrobaközösség megfelelően működhessen [11,59].

Megfigyelhetők extremofil kultúrák is környezetünkben, amelyek akár pH 9,5-ön, extrém sós körülményekhez alkalmazkodta, valamint laboratóriumi körülmények között is bizonyított, hogy pH 9-9,5 között is működőképes CH_4 termelő közösség jöhet létre [59,60].

3.3.3 Fermentációs maradék és felhasználási lehetőségei

A fermentációs maradék az anaerob fermentáció többnyire folyékony halmazállapotú végterméke [61]. A fermentációs maradék tárolása, kezelése fontos része az ipari biogáz előállításnak. Mivel igen nagy mennyiségben keletkezik, ezért fontos kutatások irányulnak

megfelelő felhasználására. Napjainkban is folyik a vita, hogy a fermentációs maradék hulladék, vagy értékes végtermék, ami számos gazdasági-, környezeti és ökológiai haszonnal kecsegtet [62]. A fermentációs maradék szervesanyag tartalma viszonylag magas (63-75%), habár ennek jelentős része a mikrobák számára nehezen hozzáférhető formában van jelen. Az anaerob lebontás során a könnyen hozzáférhető szerves komponensek 20-95%-át a mikrobák felhasználják anyagcseréjük során energianyerő folyamataikhoz, melléktermékként ipari, gazdasági jelentőséggel rendelkező CH_4 keletkezik [63,64]. Így a fermentációs maradék összetételében szervesetlen komponensek és nehezen lebontható és kevésbé oldékony szervesanyagok és igen fontos mikro- és makro elemek maradnak vissza [62].

A magas nyomelem és szervesanyag tartalmának köszönhetően a fermentációs maradék alkalmazható termőföldek tápanyag utánpótlására, mezőgazdasági területek trágyázására, ezzel a növények növekedéséhez megfelelő nyomelem bevitt elérve, amivel terménynövekedés érhető el. Ez természetesen csak ellenőrzött körülmények között alkalmazható, hiszen nagy mennyiségben történő kihelyezése a földekre nemcsak a talaj mikrobiológiai egyensúlyát és növényvilágát veszélyezteti, hanem onnan a talajvízbe jutó nitrogén és nehézfémek akár az emberi egészséget is. A nehézfémek felhalmozódást követően válhatnak ki súlyos egészségügyi problémákat, míg a nitrit (NO_2^-) és nitrát (NO_3^-) formában a talajvízbe, onnan az emberi szervezetbe kerülve methemoglobinémiát, „gyermek kékülést” és súlyosabb esetekben gyomorrákot is okozhat [62,65]. Az ehhez hasonló esetek elkerüléséről, a termőföldekre kivihető nitrogén mennyiségéről az Európai Unió nitrát direktívája gondoskodik, amely a talajvíz maximális nitrát koncentrációját 50 mg/l-ben határozza meg és az évente 1 hektár termőföldre kivihető nitrogén mennyiségét 170 kg-ban maximalizálja [66]. A fermentációs maradék továbbá alkalmazható állatok számára készített takarmányok keverékeként, valamint tápoldatok előállítására. Csirketápra keverve kimutatták, hogy 5%-kal gyakrabban raktak tojást és a tojás héja is vastagabb volt a fermentációs maradék adalékkal táplált baromfik esetén. Haltápra kevert fermentációs maradék növelte a planktonok szaporodásának intenzitását [62], felgyorsította a halnövekedés gyorsaságát, fejlődését, ezzel csökkentve a farmok kitermelési ciklusainak hosszát, valamint egészségesebb környezetet teremt, jelentősen visszavetve a halakat fertőző betegségek gyakoriságát [62]. A fermentációs maradék felhasználása tápokban is számos előnnyel rendelkezik magas nyomelem tartalma miatt. A hagyományos gombatáp 1:1 arányú keveréke a tisztított biogáz maradékkal magas fehérje tartalmú, nagyobb termőtesteket eredményez, valamint nyomelem tartalmát is jelentősen gazdagítja [67]. Számos zöldség növesztéséhez használják kiegészítő tápanyagként, ezzel növekedését elősegítve és vitaminokban, nyomelemekben gazdag egészséges zöldségeket eredményeznek [62].

A fermentációs elegy mikroba összetétele nagyban befolyásolja a fermentáció minőségét, amit a biogáz reaktor fermentációs paraméterei, a betáplált szubsztrát összetétele befolyásol. Ez az anaerob mikrobaközösség lehetőséget biztosíthat további anaerob folyamatok katalizálására, oltóanyagként szolgálhat más fermentációs folyamatok beindítására. A fermentáció során alkalmazott szubsztrát hatékony lebontására, hasznosítására képes mikroba közösség sok esetben képes adaptálódni új környezethez, szubsztráthoz. A korábban alkalmazott összetételtől eltérő szerves szubsztrát alkalmazása esetén a lebontása hatékonyságában visszaesés figyelhető meg, a közösség alkalmazkodásáig az új közeghez [53,68]. A dolgozatom szempontjából jelentősége lehet a fermentációs maradék alkalmazásának a „PtBioCH₄” technológia során előállított H₂ átalakításában CH₄-ná, hiszen a fermentációs maradék tartalmazza a folyamat katalizálásához szükséges mikrobákat, amelyek adaptáció során hatékony bioCH₄ termelő közösséggé alakíthatók. A hidrogenotróf mikrobaközösség alkalmas az exogén forrásból származó H₂ hasznosítására CO₂ redukciójára elektron donorként és a mikrobák biomassza mellett CH₄-et állítanak elő. A fermentációs maradék a fő reaktortól elkülönített tárolóban van elhelyezve, így a „PtBioCH₄” folyamat során fennálló magas H₂ parciális nyomás gátlása nem jelentkezik a gazdasági szempontból jelentős fő reaktorban. A fermentációs maradék alkalmazása a „PtBioCH₄” folyamatban lehetőséget biztosít a termelt biogáz tisztítása során keletkező CO₂ gazdaságos felhasználására CH₄-ként [59].

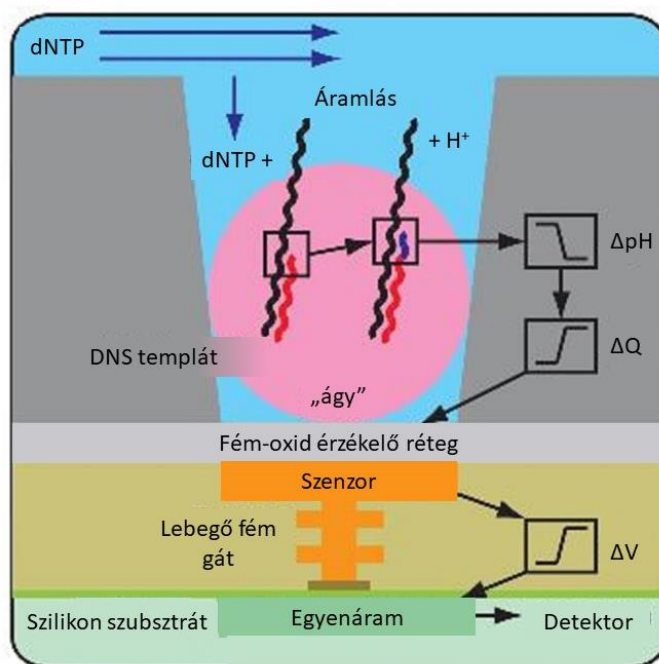
A biogáz-fermentáló mikrobaközösség nemcsak gazdasági szempontból jelentős, hanem patogén mikrobákat is tartalmaz. Ezek ártalmatlanítása elengedhetetlen a termőföldekre való kihelyezés, tápként való alkalmazás előtt. Két leggyakrabban alkalmazott eljárás a hőmérséklet és a nyomás növelése. Ahogy azt korábban bemutattam a 3.3.1 Hőmérséklet című fejezetben, már termofil körülmények között is a patogén mikrobák előfordulása, hőmérséklet toleranciája a mezofil közösségekkel szemben jelentősen csökken. Így további hőmérséklet- és nyomás-növeléssel a szabványoknak megfelelő fermentációs maradék állítható elő, amely patogén mikrobáktól és gyomok csírázóképes magjaitól mentes [69].

3.4 Metagenomika

Az elmúlt évtizedben nagyon fontos fejlődésen mentek keresztül a mikrobiális közösségeket vizsgáló eljárások, közülük is kiemelkedve a metagenomika. Ezt követően vált a metagenomika az egyik, ha nem a legfontosabb tudományággá a környezeti- és biológiai kutatások területén. A bioinformatikai elemzések fejlődésével, melynek alapját a mikrobaközösségek összetételét

vizsgáló szekvenálási eljárások jelentették, biztos alapot szolgáltatottak a metagenomika elterjedésének, melynek eredményét a publikációk számának stabil növekedése támasztja alá [70]. A metagenomika módszere környezeti minták élővilágának valós idejű összetételét vizsgálja a benne felelhető genomok genetikai analízisén keresztül [71,72]. A metagenomikai vizsgálatok nem csak a környezeti minta összetételéről adnak információt, hanem fiziológiai funkciót is képesek kapcsolni az egyes gének aktivitása, enzimikus folyamatok alapján [73].

Az új generációs szekvenálási eljárások elterjedése felgyorsította a metagenomika elterjedését és segítségével egyre szélesebb képet kaphatunk környezetünk mikroba közösségeiről, így az anaerob fermentáció mikrobiológiai összetétele és anyagcsere útvonalai is könnyebben megérthetővé váltak [74]. Az általam alkalmazott Ion Torrent szekvenálási technológia 2011-12 között robbant be a tudományos közéletbe, mint egyike az új generációs szekvenálási (NGS) technológiáknak [75]. Az új generációs szekvenálási technológiák két csoportba sorolhatók; a hibridizáció és a szintézis alapú eljárásokba. A hibridizációs új generációs szekvenálások a Sanger típusú módszert emelik hatékonyabb szintre a megismételt szintézissel, fejlettebb képalkotással és hatékonyabb módszerekkel a nukleotidok beépítésére a nukleotid láncba. Az Ion Torrent eljárás a szintézis alapú technológiák közé tartozik. A szintézis alapú technológiákra jellemző, hogy a Sanger szekvenálással szemben jóval rövidebb 200-500 bp (bázispár) leolvasásokon alapulnak (az Ion Torrent esetében ~200 bp) és a korábbi technológiához képest magasabb hibarátaival (az Ion Torrent esetében 1,71%) dolgozik, amit viszont a nagyméretű lefedettséggel kompenzál számos esetben [75,76]. Az Ion torrent szekvenálás alapja, hogy a DNS szál szintézise során protonok szabadulnak fel a nukleotidok beépülése nyomán, ami pH változást eredményez és a rendszer alapját képező félvezető detektor segítségével ez nyomon követhető (9. ábra) [75,77]. A H⁺ felszabadulásának detektálására számos elektrokémiai eljárást vizsgáltak, mégis az érzékenységének és skálázhatóságának köszönhetően a leggyakrabban alkalmazott chip az ion-szenzitív térvezérlésű tranzisztor (ISFET), aminek további előnye az összehangolhatósága a leggyakrabban alkalmazott a komplementer fém-oxid félvezetővel (CMOS) [77]. Az Ion Torrent előnye a többi új generációs szekvenáló eljárásokkal szemben az olcsóbb műszerár, ezzel kompenzálva a szekvenálási költségeket, ami az Illumina készülékek esetében olykor jelentősen alacsonyabb. A drágább költségeket viszont jelentősen gyorsabb szekvenálási sebességgel hálálja meg a készülék, hiszen az Ion Torrent 2 órás futási idejével csak a PacBio RS képes versenyezni és ez eltöri az Illumina gyártmányok 1-11 napig terjedő teljesítményétől [75].



9. ábra: Az Ion Torrent szekvenálás technológiai háttere ([77] alapján módosítva)

Az anaerob degradációt végző mikrobaközösség igen sokféle, mind a természetben, mind az ipari körülmények között, ezeknek az összetételét a rendelkezésre álló szerves szubsztrát összetétele és egyéb környezeti faktorok (pl.: fermentációs elrendezés, hőmérséklet, szervesanyag betáplálás mértéke, stb.) befolyásolják [78]. *Archaea* domén mikroorganizmusai uralják [73]. A *Bacteria* domén leggyakoribb osztályai a *Clostridia* és a *Bacteroidetes* [79]. A *Clostridia* taxon mikrobái felelősek a cellulóz bontásáért, így a növényi alapú biomassza degradációjában rendkívül fontos szerepet töltenek be, valamint az aceto-, acidogenezis folyamatának legjelentősebb képviselője. Második legjelentősebb osztályként van jelen a Bacteria doménen belül a *Bacteroidetes* osztály mikrobái, amelyek a növényi komponensek degradációja során felszabaduló poliszacharidok bontását végzik és anyagcseréjük révén szerves savak maradnak vissza [73,80,81]. A CH₄ előállítására azonban a másik domén, csak az *Achaea*-k alkalmasak a közösségből. Az *Archaea* közösség leggyakoribb képviselő a *Methanomicrobiales* és a *Methanosarcinales* rend képviselői. A *Methanosarcinales* rend metanogén mikrobái az acetotróf anyagcsere útvonalat használják fel energianyerésre, mely folyamat során ecetsav hasításának melléktermékeként állítanak elő CH₄-t és CO₂-t. Míg a *Methanomicrobiales* tagjai a hidrogenotróf útvonalat részesítik előnyben és az acetogenezis és az acetotróf metanogenezis során felszabaduló CO₂-t redukálják H₂ segítségével CH₄-ná [73,79,81–83].

A „PtBioCH₄” technológia ipari megvalósítása során, jelentős mennyiségű H₂ és CO₂ kerül a környezetbe, ami nagyban befolyásolja a mikrobák összetételét is. A H₂ szelektív nyomást gyakorol a mikrobaközösségre, hiszen számos acetotróf, acetogén mikroba anyagcsere folyamatai lassulnak, leállnak. A magas H₂ parciális nyomás hosszabb távon pusztulásukhoz vezet. Elsődlegesen a hidrogenotróf metanogének feldúsulása jelzi a H₂ adagolás hatását, ennek megfelelően a *Methanomicrobiales* rend fajainak dominanciája figyelhető meg az *Archaea*-k között. Mezofil hőmérsékleti tartományban a *Methanoculleus* és a *Methanothrix*, még termofil körülmények között *Methanothermobacter* genusok törzsei szaporodnak fel a H₂ és CO₂ gazdag körülmények között. Ezzel szemben a *Bacteria* domén mikrobáinak többsége csupán a rendszeres szervesanyag-utánpótlás jelenlétében képesek fennmaradni. A *Desulfovibrio* baktériumok számának növekedése figyelhető meg, hiszen ezen nemzetség fajai között bizonyos fajok képesek szulfát hiányában CO₂, H₂ és ecetsav előállítására a hidrogenotróf metanogén mikrobák jelenlétében. A domén többi taxonjába tartozó mikrobák száma és diverzitása a H₂ adagolás hatására csökken az eredeti közösséghez képest, viszont a konzorciumban továbbra is jelentős szerepet töltenek be a *Pseudomonadales* renden belül az *Acinetobacter* és a *Clostridiales* rend fajai [84–86].

3.5 A biogáz tisztítása

A mikrobák által termelt biogáz az alkalmazott technológiától és a lebontott szervesanyag összetételétől függően 60-70% metánból 30-40% szén-dioxidból áll, de a két fő komponens mellett vízgőz, hidrogén-szulfid, nitrogén, ammónia, oxigén, halogén szénhidrogének és sziloxánok is megfigyelhetők [87]. A biogáz tisztítása alapvetően két célt szolgál: (1) a folyamat során alkalmazott eszközöket, műszereket, magát a gázhálózatot károsító komponensek eltávolítása, (2) egy minőség javító lépés, amely során a szén-dioxidot eltávolítják a rendszerből és a termék energiatartalmát a Wobbe-Index követelményeinek megfelelőre alakítják [85-87]. A biogáz megtisztítására a szennyező komponensektől számos lehetőség létezik. A szennyezőket el lehet távolítani a fizikai és kémiai tulajdonságaik alapján, vagy a természetben előforduló mikrobák anyagcsere útvonalait felhasználva, biológiai úton. Ezeket a technológiákat alkalmazva érhető el a gázhálózatok által befogadásra alkalmas gázelegy, amelynek CH₄ tartalma legalább 95%-ot kell, hogy elérjen [8]. A fizikai, kémiai eljárások közül napjainkban a biogáz tisztítására adszorpciós eljárások (vizes, szerves oldószeres és kémiai gázmosás), adszorbensek (PSA), a gázok permeabilitását (membrán szűrési technológia) és a

gázelegy komponenseinek molekuláris tulajdonságait felhasználó cseppfolyósítási (kriogén gázválasztás) eljárások állnak rendelkezésre (10. táblázat, függelék). Míg a biológiai úton történő biogáztisztítás történhet elektrolízis cellák, kemoautotróf, fotoautotróf, mikrobiális és más fermentációs rendszerek segítségével [8,87,89].

3.5.1 Fizikai és kémiai eljárások

3.5.1.1 Vizes gázmosás (Water scrubbing)

Napjainkban a vizes gázmosás technológiája egy jól leírt és igen széles körben alkalmazott eljárás a CO₂, H₂S szennyezők eltávolítására, amely lehetőséget biztosít a nyers biogáz tisztítására. A módszer a CH₄ és a H₂S, CO₂ eltérő vízben való oldhatóságán alapul különböző hőmérsékleti tartományokban. A H₂S, CO₂ nagyobb mértékben képes vízben oldódni, mint a CH₄, ennek mértéke a hőmérséklet csökkentésével növelhető [87,89]. A nyers biogáz komponensei diszpergálást követően az immár folytonos fázisban az abszorpciós oszlopon válnak el egymástól, a H₂S és a CO₂ oldódik a vízbe, míg a CH₄ a gáz fázisban marad. A nyomás és hőmérséklet szabályzásával az abszorpciós és a deszorpciós tartályban a vizes gázmosás segítségével 99%-os CH₄ tartalom érhető el [87–91].

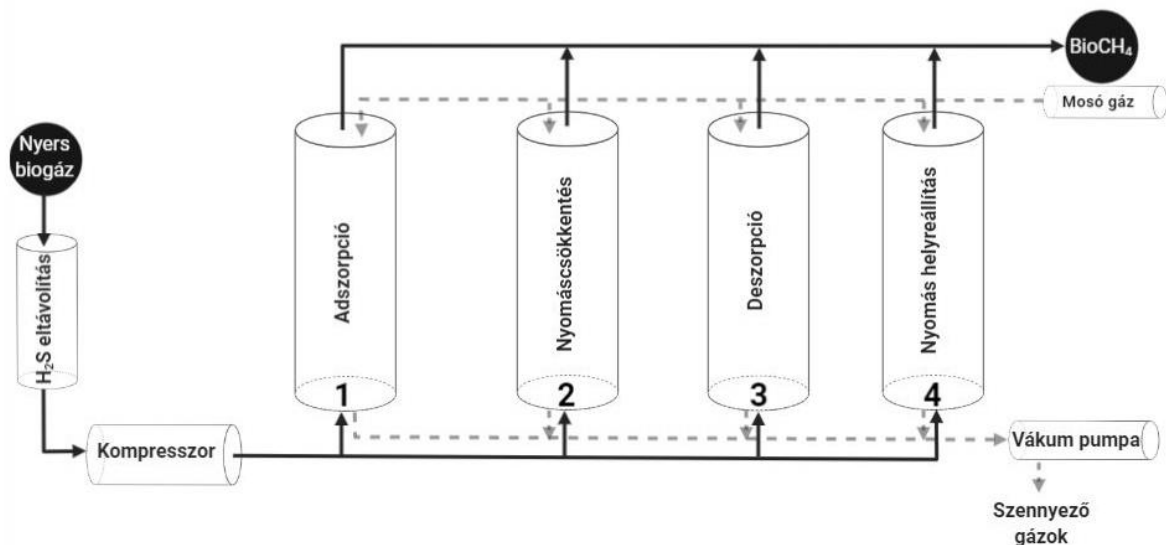
Az oldószeres frakcionált extrakciós biogáz tisztítási technológiák közé tartoznak a szerves oldószeres és a kémiai gázmosási eljárások. Mindkét folyamat elvben hasonlít a vizes gázmosás folyamatára. A szerves oldószeres technológia esetében a vizet polietilén-glikol alapú vegyületekkel helyettesítik. Ennek előnye, hogy akár ötször nagyobb affinitással abszorbeálja a CO₂-ot, mint a víz, valamint a CO₂ mellett a H₂, O₂, H₂S, N₂ és a H₂O eltávolítására is alkalmas. A szerves oldószer alkalmazása nagyban csökkenti a rendszer recirkuláció igényét, ezáltal csökkentve az infrastruktúra szükséges méreteit és ezzel együtt a befektetési és üzemeltetési költségeit [87,88,92]. A szerves oldószeres gázmosás segítségével konzisztensen 96-98,5%-os tisztaságú CH₄ érhető el [93,94].

A kémiai gázmosási technológia elvei megegyeznek a korábban bemutatott vizes és szerves oldószeres gázmosási eljárásokkal, az üzemeltetési különbséget az jelenti, hogy a CO₂ abszorpciója során alkalmazott vegyületek alkanol-aminok (monoetanol-amin, dietanol-amin, stb.) vagy hidrofил oldatok (NaOH, KOH, CaOH, K₂CO₃, stb.) lehetnek [95]. A folyamat előnye, hogy a CO₂ nem csak abszorbeálódik a folyadékba, hanem kémiai reakcióba lép vele, majd hőmérséklet emelésével könnyedén kinyerhető onnan. A reakció előnye a nagyfokú szelektivitás, hiszen ez az eljárás kevesebb, mint 0,1%-os CH₄ veszteséget eredményez [87]. A

folyamat végtermékeként keletkező elegy CH_4 tartalma 99,5-99,9%, így a mosási technológiák közül a leghatékonyabb [88,93].

3.5.1.2 PSA (Pressure swing adsorption)

A PSA technológiájának segítségével különböző gázokat tudunk egymástól elválasztani azok szerkezeti és adszorpciós affinitásuk alapján. Az elválasztás általában nagy felületű adszorbensek (zeolitok, alumínium, szilika gél vagy aktív szén) segítségével történik magas nyomáson [87,96]. A biogáz tisztítása során a szelektíven alkalmazott adszorbens képes megkötni a felületével érintkező H_2O , CO_2 , N_2 , O_2 -t, vagy akár a H_2S -t is, mindeközben a CH_4 -t keresztül engedi [87–89,93]. A CO_2 adszorpciója a kolonnákon magas nyomáson (1-es kolonna, 4-10 bar) történik, míg a CH_4 akadály nélkül halad tovább. Az egymás után kötött adszorpciós kolonnákon történő másod-, harmadlagos tisztító lépések (2-3-as kolonna) sora biztosítja az elérhető legkisebb CO_2 koncentrációt. A gázelegy recirkuláltatásával a CH_4 veszteség a PSA során minimálisra csökkenthető. Az adszorpciós felület a nyomás csökkentésével regenerálható (4-es kolonna), továbbra is alkalmas a biogáz tisztítására [93,97]. A tisztítás végeredményeként 96-98%-os CH_4 tartalom érhető el, azonban gyakran 4% körül CH_4 veszteséggel kell számolni, ami a szennyező gázeleggyel együtt távozik a rendszerből [88,93]. A PSA sematikus működése a 10. ábra mutatja be.



10. ábra: A PSA technológia sematikus működési elve [88,93] alapján módosítva

3.5.1.3 Membrán szűrési technológia

A membrán szűrési technológia a tisztításra szánt gázelegy komponenseinek permeabilitásán alapuló, permeszelektív terminuszt alkalmazó eljárás [93]. A membrán legtöbb esetben acetát-cellulóz, vagy ehhez hasonló polimer szerkezetű anyag, amely alkalmas a CO₂, O₂, vízgőz, H₂S, NH₃ elválasztására a CH₄-tól [87,88,93,98]. A membrán szűrési technológiának két típusa létezik: a száraz (gáz-gáz) technológia, ahol a szelektív membrán mindkét oldalán gáz áramlik és a nedves (gáz-folyadék) technológia, amely esetében az elválasztó membrán túloldalán folyadék abszorbeálja az átdiffundált molekulákat [88]. A recirkuláltatott száraz membránszűrés esetén egy második membránfelület alkalmazásával és a nedves tisztítás segítségével a megfelelő membrán alkalmazása esetén 98-99%-os CH₄ tartalom érhető el. Összetettebb rendszerek használata esetén a tisztítási lépések szűrletét recirkuláltatva, többszöri szűrés segítségével 99-99,5%-os CH₄ tartalom érhető el [89].

3.5.1.4 Kriogén gázválasztás

A kriogén gázválasztás a gázok szelektív elkülönítését teszi lehetővé azért, hogy a gázelegy komponenseinek cseppfolyósítása különböző hőmérsékleten következzen be [99]. Amennyiben a H₂O és a H₂S tisztítása nem történt meg külön lépésként, akkor a gázelegy -25°C-ra való lehűtésével kezdődik a tisztítás, ekkor a H₂O, H₂S, halogének és a sziloxánok kinyerhetők, ezzel elejét véve a fagyás és korrozív károknak. A H₂O és a H₂S mentes elegyet tovább hűtve -55°C-ig, a CO₂ cseppfolyós állapotba kerül, és lehetővé válik a CO₂ elválasztása a CH₄-tól. A további hőmérséklet csökkentés eredményeként -85°C-on a maradék CO₂ már szilárd formában tisztítható ki [88,89]. A tisztítás során alkalmazott magas nyomás biztosítja a CO₂ lassú fagyását, ami óvja a vezetéket fagyási károktól és maximálizálja folyamat végén kinyerhető CH₄ mennyiségét [93]. A CO₂ eltávolítását követően a nyomás csökkentésével és a hőmérséklet fokozatos emelésével a gázáram immár tiszta CH₄-et tartalmaz [88].

A kriogén elválasztás egyelőre még nagyon fiatal technológia, többnyire kísérleti biogázüzemekben terjedtek el [91,100,101], annak ellenére, hogy a szénhidrogének kitermelése és tisztítása során évek óta gazdaságosan alkalmazott rendszer [102]. A folyamat hatékonysága igen magas (~97%) és a korábbi eljárásokkal szemben a legkevesebb CH₄ veszteséggel jár (~2%) [89,95]. A rendszer befektetési és üzemeltetésének költségeiről eddig csak becslések vannak, amelyek jelenleg még igen magasnak számítanak, de számos kutatás foglalkozik az olcsóbbá tétel lehetőségein [89,99].

Tiszta gáz	Kondenzációs hőmérséklet [C°]
H ₂ S	-60
CO ₂	-78
CH ₄	-161
O ₂	-183
N ₂	-196

2. táblázat: Tiszta gázok cseppfolyósítási hőmérséklete légköri nyomáson [93].

3.5.2 Biológiai eljárások

A biológiai biogáz tisztítási eljárásokban dolgozó mikrobákat általánosan két útvonal mentén csoportosíthatjuk: megkülönböztetünk kemoautotróf (energiáját kémiai úton, szerves forrásból nyeri) és fotoszintetikus (energiáját fényből nyeri) élőlényeket, amelyek a feladat szempontjából számításba jöhetnek [8].

3.5.2.1 Kemoautoróf útvonalak

A biogáz kemoautotróf mikrobiológiai tisztítását a biogáztermelő mikrobaközösségének fontos csoportja a hidrogenotróf metanogén Archaea törzsek katalizálják, amelyek anyagcsere folyamataik révén képesek a rendelkezésükre álló CO₂-t H₂ jelenlétében CH₄-ná redukálni (3. egyenlet, metanogenezis) [8,103]. A hidrogenotróf metanogének anyagcseréje révén az anaerob degradációt végző mikrobaközösség alkalmas H₂ jelenlétében a biogáz CO₂ tartalmának csökkentésére, valamint a folyamat termékeként CH₄-t állítanak belőle elő, ezáltal tovább növelve a keletkezett gáz értékét, minőségét [8].

3.5.2.1.1 In-situ biológiai metántermelés

Az in-situ CO₂ redukció során a folyamatosan biogázt termelő, szervesanyag-lebontást végző reaktorba van adagolva a redukáló szerként szolgáló H₂. A stratégia előnye a többi technológiával szemben, hogy nem igényel külön reakcióedényt, hiszen ugyanabban a

reaktorban megy végbe, mint az anaerob degradáció [104]. Ilyenkor tehát nemcsak a hidrogenotróf metanogének, hanem a biomassza teljes lebontási útvonalát végző komplex mikrobaközösség is aktív [105]. A H₂ megfelelő ütemű adagolásával megközelítőleg 99%-os CO₂ konverzió érhető el, de a fermentációs paramétereket és H₂ adagolást nagyon pontosan kell végezni. A szervesanyag lebontó (CO₂ termelő) és CH₄ előállító mikroba-csoportok ugyanis igen érzékeny szintrópus kapcsolatban élnek egymással, amit éppen a rendszerben levő H₂ koncentrációja szabályoz. A H₂ túladagolásának, a magas parciális H₂ nyomásnak az egyik következménye a lebontási folyamatban fontos szerepet játszó acetogén mikrobák működésének gátlása, a fermentációs közeg savasodása és a mikrobák pusztulása [13,106,107]. Ugyanakkor természetesen minél több H₂ van a rendszerben, a hidrogenotrófok annál több CO₂-t tudnak elredukálni. További nehézségeket okoz, hogy az aktív hidrogenotróf metanogenezis hasznosítja az oldott CO₂ nagy részét, ettől a rendszer puffer kapacitása csökken, emelkedik a pH, és pH ≥ 8.5 a metanogén mikrobák pusztulását okozhatja [85,108]. CO₂ hiányában nem csak a hidrogenotróf metanogén mikrobák szénforrása fogy el, hanem a homoacetogenezist végző mikrobák acetát termelő képessége is csökken. A homoacetogén mikroorganizmusok a Wood-Ljungdahl anyagcsere útvonal alapján (1. egyenlet, acidogenezis) képesek a CO₂ redukálására, H₂ segítségével acetát képzésre. Az így keletkező acetát szolgálhat szerves szubsztrátként a metanogének másik csoportja, az acetotróf metanogének számára [109,110].

Az in-situ mikrobiológiai rendszer stabilitását könnyen felboríthatja a H₂ adagolás, technikailag nehezen oldható meg a paraméterek pontos ellenőrzése és szabályozása a gyakran 2-3000 m³ biogáz üzemi reaktorokban, ezért ez a megközelítés nem ajánlott.

3.5.2.1.2 Ex-situ biológiai metántermelés

Az ex-situ technológiák lényege, hogy a biogáz minőségének javítása a hidrogenotróf útvonal segítségével egy külön reaktorban zajlik. A H₂ megújuló „zöld” áram felhasználásával a víz elektrolízise során állítható elő és adagolható a rendszerbe. A CO₂ származhat füstgázból, depóniagázból, biogázból és szintézis gázból. A két gáz elegyét egy független reaktorban feldúsított hidrogenotróf metanogén kultúra képes átalakítani a CO₂-ot elektron akceptorként és szénforrásként, a H₂-t redukálószerként felhasználva [104,108].

Az eljárás nyilvánvaló hátránya a beruházási költség, ami egy újabb reaktor edény és azt kiszolgáló berendezések beépítésével jár. Ezt több, technológiai előny ellensúlyozza. A

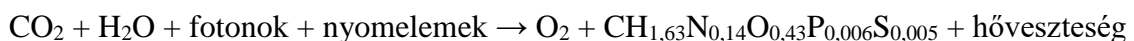
legfontosabb ezek közül, hogy nem kell számolni a H₂ bevitel mikrobiológiai hatásaival, hiszen ebben az esetben csak a hidrogenotróf metanogének tevékenységét használjuk ki. Az exogén CO₂ származhat bármilyen forrásból tehát csökkenti a káros üvegházhatású gáz kibocsátását a környezetbe és könnyen tárolható energiahordozóvá alakítható át CH₄ formájában [8].

A legnagyobb kihívást az ex-situ technológiák esetében is a H₂ rossz oldódása jelenti a légtérből a vizes fázisba. Az oldott H₂ koncentráció növelését intenzív keveréssel, a gáz-folyadék felület növelésével és/vagy a H₂ nyomás fokozásával lehet elérni. CSTR (continuous stirred tank reactor = folyamatosan kevert reaktorok) berendezésekkel végzett kísérletek során 60:25:15 arányú H₂:CH₄:CO₂ elegyből kiindulva értek el 95,4 %-os CH₄ tartalmat azáltal, hogy a kevertetés sebességét 500-800 fordulat/percre növelték, ami persze megemelkedett energiabefektetés-igénnyel járt [111].

Az ex situ biogáz-összetétel javítására irányuló legfrissebb kutatási eredményeket, eljárásokat a 3.6.1-es fejezetben taglalom részletesen.

3.5.2.2 Fotoautotróf módszerek

A fotoszintetikus biogáztisztítás során a biogázból mikroalgák kivonják a CO₂-t, így CH₄-ben gazdag gázelegyet kapunk. A módszer előnye, hogy a fotoszintetizáló szervezetek (eukarióta mikroalgák, cianobaktériumok) képesek a biogázban jelenlevő CO₂-t megkötni és mikroalga biomasszává alakítva, feljavítva ezáltal a gázelegy összetételét. Ez egy redox CO₂-t redukáló folyamat, amely során aerob körülmények között a víz elektrolízise által keletkeznek az elektronok (4. egyenlet). A folyamat kulcsfontosságú lépése a CO₂ megfelelő hatékonyságú oldódása a biogázból a folyadék fázisba. A fotoautotróf rendszer elméleti potenciálja alapján, amennyiben a CO₂ oldékonysága nem gátolja a folyamatot, 1 g mikroalga biomassza előállításához a rendszer 1,8 g CO₂-t használ fel [89,112,113]. A fotoautotróf rendszerek alkalmazásának nagy előnye a biogáz tisztítása során, hogy a H₂S-t is megkötik ezzel tovább tisztítva a gázelegyet.



4. egyenlet: A cianobaktériumok által katalizált fotoautotróf reakció egyenlete [89].

Alapvetően két típusa létezik a fotobioreaktor rendszereknek: a zárt (cső vagy téglatest formában) és nyitott (high rate algal ponds). A zárt rendszerek hatékonysága, kis helyigénye és vízszükséglete kedvezőbb a nyitott rendszerekkel szemben, de a felállításához és

működtetéséhez szükséges befektetés mértéke és energiaszükséglete nagyban megrágítja a technológiát. Ezzel szemben a nyitott rendszerek igen alacsony beruházási és fenntartási költséget igényelnek, azonban kevésbé hatékony CO₂ felvétellel rendelkeznek, valamint a kultúrák befertőződése más fajokkal is könnyebben bekövetkezik. Mindkét rendszer képes a biogázban a CO₂ koncentrációját az előírt 2-6%-ra csökkenteni [8,114]. További előnye a fotoautotrófokkal végzett biogáz tisztításnak, hogy a folyamatban képződő biomassza értékes összetevőket tartalmaz (pl.: fehérjék, antioxidánsok, poliszacharidok), amik hasznosíthatók, vagy maga az organizmus szolgálhat szubsztrátként a biogáz reaktorban [115–118].

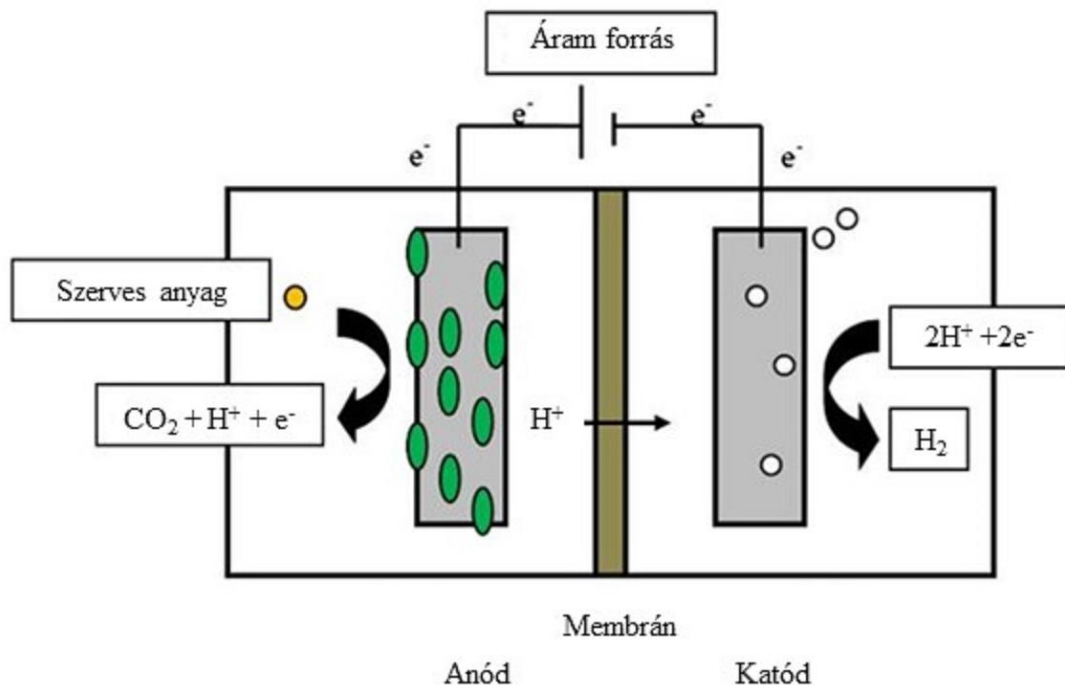
3.5.2.3 Biogáztisztítás fermentációs rendszerek segítségével

Habár a biológiai biogáz tisztítási technológiák leggyakoribb terméke a CH₄, más stratégiák figyelembevétele is jelentős lehet. A H₂-nel történő CO₂ redukció által a CH₄ mellett számos más értékes vegyületet is elő tudunk állítani biotechnológiai úton, ilyenek pl. az ecetsav, a vajsav, az etanol és a butanol [119]. Különböző mikroorganizmusok (pl. *Acetobacterium woodii*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium scatologenes*, stb.) képesek a CO₂-t a H₂ segítségével szerves savakká és/vagy alkoholokká alakítani, amik értékes termékek illetve vegyipari, gyógyszeripari alapanyagokként hasznosíthatók [17,120,121]. A legnagyobb kihívást a fermentációs rendszerekben a H₂ olcsó beszerzése jelenti, ami az eljárás nyereségességét leginkább befolyásolja. Alternatív megoldás lehet a H₂ előállítására a fermentációs rendszer összekapcsolása a cukrok anaerob fermentációjával. A rengeteg fermentációs lehetőség közül egy a borostyánkősav előállítása glükózból *Actinobacillus succinogenes* segítségével [122]. *Actinobacillus succinogenes* alkalmazása borostyánkősav előállítására egy új technológia, előnye, hogy a korábban alkalmazott mikrobákkal ellentétben a kizárólagos foszfoenol-piruvát karboxikináz anyagcsereútvonal hasznosítása, amelynek előnye, a nagy koncentrációjú termék (110 g/l) és a borostyánkősav sóinak magas fokú toleranciája. A borostyánkősav, mint a biogáz CO₂ tartalmának terméke prekurzorként szolgál mezőgazdasági (pl.: állati táplálékkiegészítő, növény növekedés stimulátor), élelmiszeripari és gyógyszeripari termékek (pl.: biológiai úton lebomló műanyagok, detergensok, felületaktív anyagok) szintézisében [122,123].

3.5.2.4 Bioelektrokémiai rendszerek (BES)

Az egyik legköltséghatékonyabb és megújuló energiaforráson alapuló megoldás a biogáz biológiai úton történő tisztítására a bioelektrokémiai (BES) rendszerek alkalmazása [124,125].

A BES rendszerek által végzett biogáz tisztítás során a cellában az anódon mikrobiális oxidáció segítségével elektronokat állítanak elő a mikrobák szerves, szervesetlen elektron donorokat használva fel [126,127]. Az elektronok a katódra kerülnek, ahol értékes vegyületek (pl.: H_2 , CH_4) keletkeznek [128,129]. Az így előállított H_2 felhasználható a CO_2 redukciójára, a biogáz tisztítására, CO_2 tartalmának csökkentésére. A mikrobiális elektrokémiai cellák biokatód használatával a CH_4 előállítására is alkalmasak a CO_2 redukciója által. A redukcióhoz szükséges H_2 extracelluláris elektrontranszferrel és abiotikus úton előállítható a katódon [130,131].



11. ábra: Bioelektrokémia rendszer sematikus felépítése ([128,132] alapján módosítva)

3.6 A „Power-to-BioCH₄” technológia

Egyre inkább kutatott és biztató lehetőség a biogáz összetételének javítására, CH_4 tartalmának növelésére a Power-to-BioCH₄ (PtBioCH₄) technológia. A fosszilis energiahordozók kimerülése és a környezettudatos életvitel és az egyre nagyobb energianyereség elérése érdekében eredményeként egyre jobban előtérbe kerül a megújuló energiahordozók (szél-, víz-, fotovoltaikus energia, biomassza) által biztosított energiatermelő

technológiák felhasználása. A biomasszából biogázt előállító technológia (pl.: biomassza égetés) és a hőt termelő technológiák (pl.: napkóhó) kivételével a legtöbb megújuló elektromos áramot ad. Az áramtermelést jelentősen befolyásolja az energiahordozók napi vagy szezonális energiaátadási ingadozása. Az intenzív időszakokban a megújuló energiahordozókból előállított elektromos áram mennyisége fejlettebb régiókban meghaladja a felhasznált mennyiséget, ami az elektromos hálózatok túlterheltségét okozza és az energiatöbblet tárolása hiányában energiaveszteséghez vezet. A hullámzó túltermelés csillapítására, az elektromos energia tárolására kedvező megoldás a plusz áram alternatív energiahordozókká, vegyületekké történő alakítása. Ilyen technológiai lehetőség a „felesleges” áram felhasználása hidrogén (H_2) előállítására a víz elektrolízisével. Ez egy jól jellemzett és világszerte alkalmazott eljárás, habár az előállítást követően az energetikailag, financiálisan és technológiai szempontból kedvező H_2 tárolási és szállítási megoldások még váratnak magukra [133]. Ezért egy lehetséges és igen kecsgetető megoldás lehet az elektrolízis során előállított H_2 átalakítása CH_4 -ná. A CH_4 nagy előnye a H_2 -nel szemben, hogy tárolási és szállítási költsége a töredéke a H_2 -nek és a kiépített földgáz hálózatok infrastruktúrái is megfelelnek erre a funkcióra. A földgázhálózat sokkal rugalmasabban tudja kezelni a hullámzó betáplálást, a metán kisebb veszteséggel szállítható, tárolható, mint az áram. A folyamat katalízisére napjainkban számos jól leírt módszer alkalmas, de az egyik legköltséghatékonyabb megoldást a biogáz fermentorok mikrobaközösségének, azon belül is a hidrogenotróf metanogének anyagcseréjének felhasználása a CH_4 előállítására jelenti.

3.6.1 A „Power-to-bio CH_4 ” alapú kutatások, eljárások

A biológiai úton történő biogáz minőség javítás során mikrobákat alkalmazva tudunk megszabadulni a fő szennyezőként jelen levő CO_2 -tól. A mikrobák anyagcseréjük révén képesek átalakítani a biogázban jelen levő CO_2 -ot CH_4 -ná H_2 segítségével, ez a Power-to-Bio CH_4 (PtBio CH_4) koncepció alapja. A biogáz tisztítása egyre jobban kutatott terület és napjainkban már növekvő számú kísérleti biogáz tisztító, minőségjavító biológiai eljárás létezik, sőt Dánia, Németország, Svédország, Svájc és Nagy Britannia területén már félüzemi és ipari egységek is működnek [134].

A biológiai úton történő „PtBio CH_4 ” katalízise történhet a mikrobák által előállított enzimek segítségével, vagy magukkal az élő mikrobákkal. Habár az enzimikus katalízis hatékonyabb, de az enzimek érzékenysége és aktivitás vesztesége nehezebben kezelhetővé teszi a folyamatot. Az élő organizmusok által biztosított enzimikus és biokémiai komplexitás nagyobb stabilitást

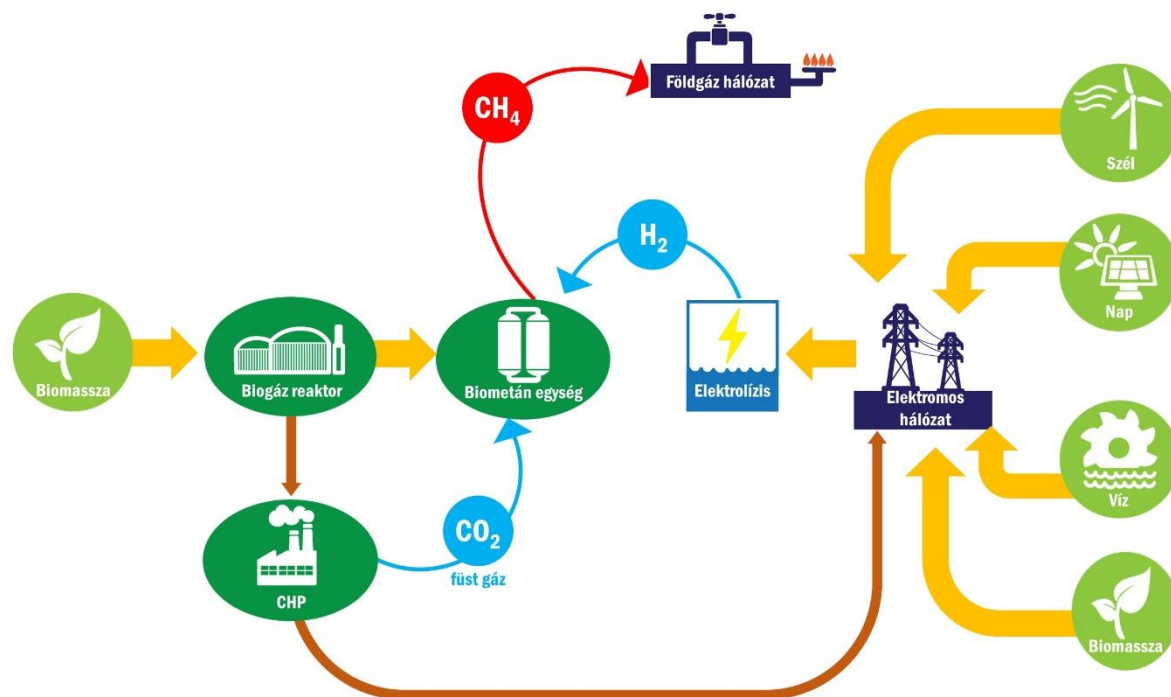
biztosít a rendszereknek. Mikroba segítségével végzett „PtBioCH₄” alapú kutatások, technológiák két csoportra oszthatók: a tiszta kultúrák, és a kevert mikroba közösség segítségével végzett eljárásokra.

A „PtBioCH₄” megvalósítása tiszta metanogén kultúra segítségével egy ismert anyagcsere útvonalon történik a H₂ és a CO₂ átalakítása a mikroba segítségével CH₄-ná. Előnye, hogy a mikrobiológiai komplexitás hiánya és a fermentációs közeg egyszerűsége miatt az anyagcsere folyamatok jól nyomon követhetők és könnyen kiszámíthatók. Hátrányai közé sorolható, hogy a tiszta kultúrák fenntartása nehéz, ehhez szükséges technológiák, tápoldatok és nyomelem keverékek drágák, valamint a tiszta kultúra stabil fenntartása megfelelő szakértelmet igényel. Ezen túl a fermentorok méretének növelésével a kultúra fenntartásának költségei nagyban növekednek és a kultúra tiszta fenntartása tovább nehezedik. Napjaink technológia fejlődésével egyre több hidrogenotróf metanogén mikroba kerül azonosításra a Föld számos pontjáról. Ezek anyagcserejének felfedezésével, leírásával, szaporításával nap mint nap újabb lehetséges jelöltek kerülnek a köztudatba. Ennek ellenére egyedül az 1972-ben izolált *Methanobacterium thermoautotrophicus* az egyetlen hidrogenotróf törzs, amellyel ipari körülmények között is próbálkoznak [135,136]. Mára ez a technológia hazánkban is, mint számos más országokban megvetette lábát és az Electrochaea projekt honosítása laboratóriumi körülmények között sikeresen megvalósult [137].

A kevert kultúrákkal végzett bioCH₄ előállítás előnyei a tiszta kultúrákkal végzett átalakításokkal szemben a költséghatékony kivitelezhetőség és a könnyebb kezelhetőség. A környezetből izolált és aztán ipari körülmények között feldúsított, alkalmazott biogáz termelő közösségek összetettsége stabilitást biztosít a kevert kultúrák eljárásoknak. Mezofil és termofil fermentációs technológiák egyaránt elterjedtek [59,85,108,111,138–140]. Ezeknek a technológiáknak a fejlesztését, hatékonyságának növelését két megközelítéssel célozza meg napjaink tudományos társadalma. A kevert közösségek összetételének nyomon követésével, és a „PtBioCH₄” fermentációs körülményei szempontjából hasznos hidrogenotróf közösségek feldúsításával fokozható a létrehozott rendszerek hatékonysága, stabilitása. A „PtBioCH₄” alapú rendszerek mikrobiális összetételét célzó kutatások napjaink egyik leginkább kutatott területe [84,85,105,138]. Mikroba összetétele mellett a kiépített rendszer struktúrája, hatékonyság fokozó technológiák alkalmazása is jelentősen befolyásolja a „PtBioCH₄” rendszerek teljesítményét. Legegyszerűbb fermentációs elrendezések a batch, fed-batch rendszerek, azonban a H₂ rossz oldékonysága miatt a fejlesztések ennél hatékonyabb eljárásokat igényelnek [59,111,141]. Az egyéb reaktor geometriai megoldások közül az egyik leggyakoribb a CSTR (continuous stirred-tank reactor; folyamatosan kevertetett reaktor), ahol a keverés

sebességének fokozásával a H_2 gáz-folyadék tömegáramlásának hatékonysága fokozódik [133,142,143]. Egy másik fermentor konstrukció az UASB (upflow anaerobic sludge blanket), amely esetében a gáz és a folyadék fázis nagyobb felületen való érintkezése érdekében alulról jut a reaktorokba a H_2 diffúzorok, porlasztó membránok segítségével [105,144]. Szintén a H_2 és a mikrobák érintkezési felületét növelő rendszer a trickle-bed, fixed-bed reaktorok. Ebben a két esetben a mikrobák a fermentációs folyadékkal együtt inert felületen vannak immobilizálva nagy érintkezési felületű biofilmet létrehozva. Ez a biofilm réteg folyamatosan nedvesen van tartva folyékony halmazállapotú tápoldattal, ami tartalmazza a mikrobák számára szükséges vegyületeket, ionokat, nyomelemeket. A gáz az általában hengeres alakú reaktor aljától van recirkuláltatva újra-és újra, ezzel a H_2 és CO_2 elegy oldódási esélyeit megnövelve. Az immobilizált felület a korábban bemutatott fermentációs elrendezéseknél jelentősen nagyobb aktív felületet biztosít a gáz-folyadék transzferhez [145–149].

A reaktorok kialakításán kívül fermentációs paraméterek változtatásával is befolyásolni lehet a H_2 és CO_2 elegy oldékonyságát. Ilyen lehetőség a reaktor belső nyomásának növelése, ezzel fokozva a gázelegy oldékonyságát a folyadék fázisba [133,150]. A trickle-bed, fixed-bed, UASB reaktorok alkalmazása esetén megfigyelhető technológia a gázelegy folyamatos, vagy szakaszos recirkuláltatása a fermentációs elegyen keresztül. Ezzel növelni lehet a gázelegy érintkező felületét a folyadék fázissal, a mikrobákkal, emellett a be nem oldott H_2 és CO_2 újra oldódásának hatékonyságát fokozza [105,138,147]. A H_2 és CO_2 oldékonyságát azzal is fokozni lehet, ha a hagyományos gázinjektorok helyett diffúzereket, membránokat alkalmazunk a gáz „porlasztására”. Ezzel a cél, hogy a gáz a lehető legkisebb buborékok formájában jusson a fermentációs folyadékba, ezzel is növelve a gáz retenciós idejét a folyadékban, gáz-folyadék tömegáramlás hatékonyságának lehetőségét [138,151,152].

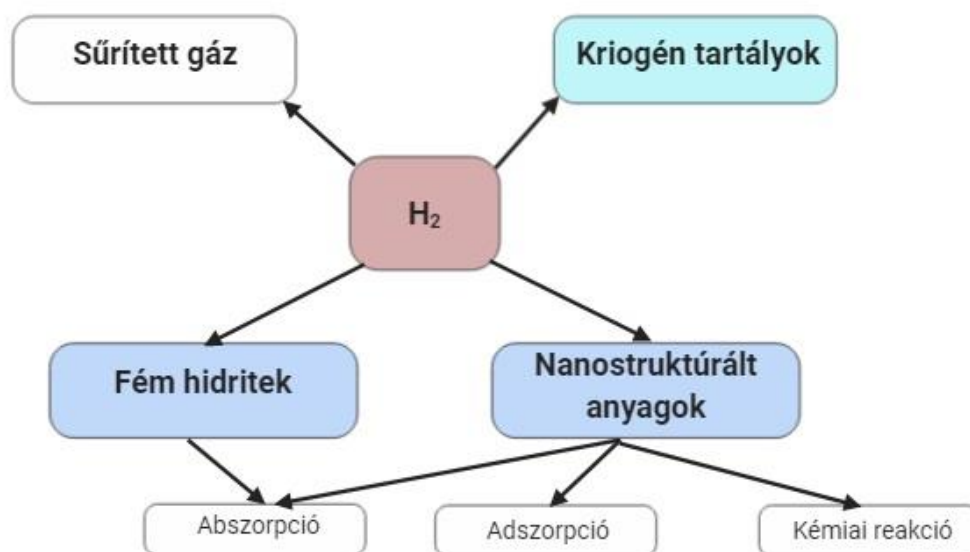


12. ábra: A Power-to-Gas” technológia folyamatának sematikus bemutatása [59].

3.7 Hidrogén

A rohamos gazdasági fejlődés és a népesség növekedés kétségtelenül növeli az emberiség energiaigényét. Ennek fedezésére szerencsére egyre több kutatás irányul a megújulókkal termelt energia tárolásának fejlesztésébe, így a H₂, mint a megújuló úton előállítható egyik legtisztább energiahordozó is előtérbe került [153,154]. A H₂ a leggyakoribb elem a naprendszerünkben és energiasűrűsége az összes hagyományos üzemanyagnál magasabb (122 kJ/g), ami majdnem háromszorosa a szénhidrogén alapú üzemanyagoknak [155]. Manapság egyre több területen fordulnak elő technológiák, amelyek lokálisan kielégítik a H₂ szükségleteket, de a H₂ globális igényeinek fedezésére még számos infrastrukturális és technológiai fejlesztés szükséges [156]. H₂ számos technológia révén előállítható: szénhidrogének átalakításával, deszulfurizációval, pirolízissel, plazma-, vizes fázis- (APR) és ammónia átalakítással, különböző biomasszából kinyert eljárásokkal és vízbontás segítségével [157]. Ezek közül a legmegfelelőbb eljárások a „zöld technológiák” lehetnének. Ilyenkor a megújuló energiahordozók energiája aknázható ki, és így tiszta, nagy energia tartalmú és változatos felhasználási lehetőséget biztosító energiahordozó állítható elő [154]. A H₂

lehetőséget biztosít a légkörbe juttatott szén alapú, üvegházhatást kiváltó és növelő gázok kibocsátott mennyiségének csökkentésére, ezáltal a globális klímaváltozás mértékét csökkenti. A H₂ segítségével ezek az üvegházhatású gázok megköthetők és átalakíthatók más alternatív üzemanyaggá (pl.: metánná). Ez a folyamat teljesen környezetkímélő módon kivitelezhető, hiszen a H₂ termelést megújuló energia biztosítja [158]. A H₂ előállítására számos technológia létezik, viszont a tárolása és szállítása sajnálatos módon még a mai napig kihívást jelent. Hátránya, hogy tárolása, határfoka, és a szállításával, felhasználásával kapcsolatos veszélyek miatt ma még nem ideális. [154,159]. A H₂ tárolható gáz, szilárd, vagy cseppfolyósított halmazállapotban (13. ábra) [159,160].



13. ábra: A hidrogén tárolási lehetőségei ([154,159] alapján módosítva).

A H₂ tárolásának és szállításának nehézségeire nyújthat megoldást, a H₂ alternatív, biztonságosabban, költséghatékonyabban tárolható, szállítható bioüzemanyaggá történő átalakítása pl. CH₄-ná. A hidrogenotróf metanogén mikrobák, melyek fontos csoportjai a biogáz fermentáló mikroba konzorciumnak, képesek a H₂-t átalakítani CH₄-ná a 3. egyenlet alapján [161]. A biogáz termeléshez kapcsolva a hidrogenotróf metanogének nem csak átalakítják a H₂-t CH₄-ná, hanem a keletkező biogáz CO₂-jét használják fel szénforrásként a reakcióhoz, a keletkező gázelegy minőségét javítva [8].

H₂ nem csak külső forrásból vihető be a biogáz termelő közegbe, hanem a szerves szubsztrát hidrolízise során is keletkezik. Ha a mikrobakonzorcium szervesanyag ellátása megfelelő, akkor a szubsztrát fermentációja során felszabaduló H₂-t a biogáz fermentáló mikrobaközösség

fontos tagjai, a hidrogenotróf metanogének, CH_4 -t állítanak elő, ezzel biztosítva a H_2 alacsony parciális nyomását a közegben [162].

A H_2 nem csak kedvező, hanem nagy mennyiségben káros is lehet a mikrobiális közösség működésére. A hidrogenotróf metanogén mikrobák a H_2 felhasználásával a közeg CO_2 , HCO_3^- tartalmát redukálják el, amelyek felelősek a fermentációs folyadék pH-jának puffereeléséért. Abban az esetben, ha túl sok H_2 kerül a közegbe, az a fermentációs közeg pH-jának lúgosodásához, hosszú távon a közösség pusztulásához vezethet [111]. Másik oldalról megközelítve, ha olyan nagy mennyiségben keletkezik, vagy juttatunk be H_2 -t, hogy a hidrogenotróf mikrobák nem képesek felhasználni, akkor az az acidogenezist vagy acetogenezist végző baktériumok anyagcseréjének leállításához vezethet [163]. A H_2 magas parciális nyomása ($> 10 \text{ Pa}$) az anaerob degradáció gátlásához, az illékony szerves savak felhalmozódásához, a pH elsavasodásához és végül a CH_4 , biogáz termelődés leállításához vezethet [164,165].

3.8 Metán

A „Power-to-Bio CH_4 ” technológia másik fontos komponense a „zöld energia” tárolásának végső energiahordozója, a CH_4 . A H_2 -nél a CH_4 sokkal kényelmesebb lehetőségeket biztosít az energia tárolására, hiszen szállítására és tárolására a meglévő gázhálózatok alkalmasak. Az energiaraktározó képessége jelentősen nagyobb (36 MJ/m^3) a H_2 -nél ($10,88 \text{ MJ/m}^3$) [111], ez mellett a szénhidrogénekénél is jobb energiasűrűséggel rendelkezik, mivel elégetése során $\sim 56 \text{ kJ/g}$ energia szabadul fel [166].

A CH_4 a szén legredukáltabb formája és a légkörünk legnagyobb relatív gyakoriságú szerves gáza [167]. Légköri koncentrációja az ipari forradalom (1750) előtt becsült értékének megközelítőleg a 2,6 szorosára emelkedett 2018-ra (1857 ppb), ily módon legnagyobb mértékben járul hozzá Földünk globális klímájának változásához [168]. CH_4 keletkezhet antropogén (emberi tevékenység révén) és biogén (mikrobiális anyagcsere révén) úton. Napjaink CH_4 termelésének jelentős része antropogén eredetű, melynek fő forrásai a szénhidrogének égetése, szén bányászat, szennyvízkezelés és más mezőgazdasági tevékenységek [169–171]. Biogén eredetű CH_4 a szerves vegyületek anaerob lebontása és redukciója révén keletkezik [172]. A mikrobiális eredetű CH_4 legjelentősebb forrásai Földünk nedves-, vizes élőhelyei, amelyek évente akár 35 Tg (10^{12} g) CH_4 kibocsátásáért felelősek [168]. Jelentős mennyiségű CH_4 szabadul fel továbbá a rizsföldekről, valamint a kérődzők emésztőrendszerében élő mikrobák anyagcseréjének melléktermékeként [167]. Bizonyos

becslések szerint azonban mégsem a korábban említett források jelentik Földünk legnagyobb CH₄ készleteit, hanem a sarkkörökön túl található permafroszt. Tarnocai és munkatársai eredményei alapján Földünk teljes szénkészletének 50%-át a permafroszt zárja magába [173,174].

A mikrobiális CH₄ képzésért a metanogén mikrobák felelősek, melyeknek fontos szerepe van a „Power-to-BioCH₄” technológiában is. A metanogén mikrobák taxonómiáját, morfológiáját és anyagcsere-folyamatait a 3.2.3 Metanogenezis folyamata című fejezetben taglaltam.

A CH₄ energiaraktározó képessége miatt kiváló energiahordozó, melyet napjainkban számos technológia segítségével hasznosíthatunk. A CH₄ leggyakoribb felhasználási formái az elégetése során keletkező hő (pl.: fűtés, főzés), gázmotorok segítségével előállított villamos energia (pl.: világítás) [3] alkalmazása, vagy alternatív energiahordozókká alakítása (pl.: metanol, szénhidrogének) [175].

A CH₄ nem csak számunkra jelentős energiahordozó, mikrobák számára is nyújthat energiaforrást. A leginkább tanulmányozott CH₄ hasznosító mikrobák az aerob metilotróf α -, γ *Proteobacteria*-k [176]. Ezek a mikrobák a CH₄ oxidációja révén O₂ segítségével állítanak elő metanolt anyagcseréjük során, amely további útvonalakon fajspecifitástól függően oxidálódik és biomassza és egyéb melléktermékek keletkeznek (pl.: formaldehid, szerves savak, ectoin, zsírsavak, B₁₂ vitamin) [177]. A CH₄ oxidációja anaerob útvonalon is végbe mehet. Anaerob metanotróf *Archaea*-k megfelelő elektron akceptor (pl.: Fe³⁺, NO₃⁻, SO₄²⁻) jelenlétében CH₄ oxidációja révén jutnak energiához [178].

A CH₄ fiziko-kémiai tulajdonságai miatt a Föld légkörében felhalmozódva jelentős szerepet játszik Földünk globális klímaváltozásában, az üvegházhatás mértékének fokozásában. A CH₄ annak ellenére, hogy légköri tartózkodási ideje jelentősen rövidebb (~10-12 év), mint a CO₂-é (évezredek), a CH₄ által abszorbeált hő mennyisége (28-36 GWP-global warming potential) jóval meghaladja a CO₂ értékét (1 GWP) [179]. A CH₄ légköri koncentrációjának csökkentésére és ezzel a üvegházhatás mértékének kontrollálására célzott stratégiák (pl.: húsfogyasztás-szarvasmarha tenyésztés-csökkentése, gyárak ventilációs rendszereinek fejlesztése,- szivárgás mentesítése, bányászat során melléktermékként keletkező gázok kezelése, stb.) nyújthatnak megoldást [180].

4 Felhasznált anyagok és módszerek

4.1 Kevert természetes kultúra (oltóiszap)

A kísérleteim során alkalmazott mezofil oltóiszapot, amely tartalmazta a biogáz fermentációhoz szükséges mikrobaközösséget a Zöldforrás Energia Kft. biogázüzeme biztosította. Az üzem által alkalmazott szubsztrát kukorica siló-cukorcirok és sertéstrágya 80:20 arányú keveréke.

A termofil kísérletekhez alkalmazott oltóiszap a Bátortrade Kft. (Nyírbátor) biogáz erőművéből származott, amit fél-folyamatos üzemű, 5 literes laboratóriumi termofil fermentorokban tartottam fent. Szubsztrátként kukorica silót alkalmaztam.

Kísérleteim során batch fermentációt alkalmaztam. A rendszer összeállításához 160 ml térfogatú Hypo-Vial üvegeket (Wheaton szérum üveg, Z114014 Aldrich) használtam. A fermentációs elegyet a következőképpen állítottam össze: 40 ml oltóiszap (Zöldforrás Energia Kft. biogáz üzem) került a Hypo-Vial üvegekbe, ehhez szükség esetén hozzáadtam a megfelelő mennyiségű szubsztrátot (α -cellulóz (C8002 Sigma), 3. táblázat), aminek mennyiségét a VDI (Verein Deutscher Ingenieure 4630) protokoll irányelvei szerint megmért szárazanyag és szerves szárazanyag tartalom alapján számoltam ki. Alumínium gyűrű és gumiszeptum segítségével légmentesen zártam a reakció edényeket. Ezt követően a reakció edényt anaerobizáltam oxigénmentes nitrogén gázzal (Messer N₂ 4.5) történő 5 perces átfúvatás segítségével. Az átfúvás során keletkezett nyomást kiegyenlítettem. A reaktor légterébe műanyag fecskendővel adagoltam a különböző mennyiségű H₂-t, CO₂-t az 3. táblázat alapján bemutatott stratégiát követve. A rendelkezésemre álló, nem nyomásálló műanyag fecskendő használata miatt a bemért H₂, CO₂ pontos mennyiségét gázkromatográffal határoztam meg.

Az első kísérlet sorozat során (5.1 Egyszeri szubsztrát adagolás hatása a PtBioCH₄ rendszerre) szerves szubsztrát bevitel csupán a reaktorok indításakor, egyszer történt, a későbbiekben ez nem ismétlődött meg (3. táblázat). A második mérési sorozat során (5.2 Rendszeres szervesanyag-utánpótlás hatása a PtBioCH₄ rendszerre) a szerves szubsztrátot periodikusan, szakaszos rendszerességgel pótoltam, amelynek pontos idejét, az eredmények bemutatása során pontosan jeleztem. A harmadik kísérlet során semmilyen szerves szubsztrátot nem adtam a fermentációs maradékhoz. Mindhárom mérés során a H₂-t és a 3 mérés során a CO₂-ot szükség esetén napi rendszerességgel adagoltam a reaktorok légterébe.

Kísérletsorozat:		1: szervesanyag bevitel a kísérlet indításakor				2: szakaszos α -cellulóz hozzáadás				3: szervesanyag bevitel nélkül			
H ₂ (ml) ^a		0	20	40	60	0	20	40	60	0	20	40	60
Szubsztrát (α -cellulóz) (g)	0	X				X				X	X	X	X
	0,3	X ^d	X ^d	X ^d	X ^d	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c				
CO ₂ (mL)	sztöchiometrikus									X ^b	X ^b	X ^b	X ^b

3. táblázat: Fermentációs rendszer összeállításának terve; ^anapi adagolás, ^ba CH₄ termelés leállítását követően adagolva; ^cszubsztrát heti adagolása; ^dszubsztrát hozzáadása a reaktorok összeállítása során egyszeri alkalommal

4.2 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.

4.3 Szervesanyag-tartalom meghatározás

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

4.4 Légter összetétel meghatározás

A reaktorok légtéréből vett minta CH₄ és H₂ tartalmának meghatározásához Agilent 6890N típusú gázkromatográfot használtam. Az inletben a vivőgáz áramlási sebessége 22,4 ml/perc volt, 1,1:1-hez split aránnyal. A kromatográfiás eljárás során HP-MOLESIEVE 5Å kolonnát és argon vivőgázt használtam, melynek áramlási sebessége a kolonnán 9,6 ml/perc volt. A kolonnátér hőmérséklete 47°C, TCD detektor hőmérséklete 160°C volt.

A reaktorok légtérének CO₂ tartalmát TCD detektorral és HP PlotQ (30 m × 0,5 mm × 40 µm) kolonnával felszerelt Shimadzu GC 2010 (Shimadzu Corporation) segítségével határoztam meg. Az inletben a vivőgáz áramlási sebessége 10 ml/perc volt, 4:1-hez split aránnyal. A

vivógáz N₂ volt, amelynek áramlási sebessége a kolonnán 1,25 ml/perc áramlási volt. A kolonnátér hőmérséklete 80°C, TCD detektor hőmérséklete 160°C volt.

A kromatográfias mérések során kapott eredményeket a továbbiakban a H₂ átalakítási hatékonyságának számítására használtam fel, amelyet hidrogén hidrogenotróf metanogenezis sztöchiometrikus reakcióegyenletét felhasználva számoltam ki [59,138,144].

$$\eta = \frac{(r_{CH_4A} - r_{CH_4B})}{(r_{H_2A} - r_{H_2B}) * 4} * 100$$

η - átalakítási hatékonyság [%]

r_{CH_4A} - a vizsgált reaktor CH₄ mennyisége [ml/nap]

r_{CH_4B} - a kontroll reaktor CH₄ mennyisége [ml/nap]

r_{H_2A} - a befecskendezett H₂ mennyisége a reaktorban [ml/nap]

r_{H_2B} - a fel nem használt H₂ mennyisége a reaktorban [ml/nap]

4.5 Illékony szervessav (VFA) összetétel meghatározás

Fermentorok folyadékfázisából vett mintát lecentrifugáltam, (10 perc 13000 rpm) a felülúszót centrifuga csőbe helyezhető PES alapú membránszűrő (3 kDa) segítségével szűrtem 20 percen keresztül. A szerves savak analízisét, HPLC-vel (Hitachi LaChrom Elite) végeztem el. Az elválasztás Agilent Hi-Plex H kolonna segítségével végeztem, a kolonnátér hőmérséklete 50°C, az eluens 0,01 M-os híg kénsav volt, melynek áramlási sebessége 0,6 ml/ perc volt. A szerves savak minőségi azonosítása L-2490 refraktív index detektor segítségével retenciós idő alapján, mennyiségi meghatározása a csúcs alatti terület alapján az EZChrome Elite program segítségével történt. A detektor hőmérséklete 41°C volt.

4.6 pH meghatározás

A fermentor folyadék pH-ja OP-0808P pH elektróddal felszerelt Radelkis OP-211/2 pH mérővel határoztam meg.

4.7 Szekvenálás

A mikrobiális összetétel meghatározás lépéseit, eredmények kiértékelését, munkatársam Dr. Wirth Roland segítségével közösen végeztük.

A szekvenálás során az Ion Torrent PGM™ szekvenálási útmutatóját követtük (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA). A mintakönyvtár készítéséhez az Ion Xpress Plus Fragment Library Kitet használtuk (Cat. No. 4471269; Thermo Fisher Scientific, USA). A Barcode-olást az Ion Xpress Barcode Adapters 1–16 Kit (Cat. No. 4,471,250, Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével végeztük. A szekvenálás Ion PGM 200 sequencing kit felhasználásával az Ion Torrent PGM 316-os chip-jén készült.

4.8 Nyers szekvenciák szűrése

A nyers szekvenciák szűrése a Galaxy Europe szerveren történt. A gyenge minőségű leolvasásokat Prinseq program segítségével szűrtük (alapbeállítások + min. hosszúság: 150 bp). A szűrt szekvenciákat a FastQC programmal ellenőriztük.

4.9 Leolvasás alapú metagenomika

A szűrt szekvenciákat Kaiju programmal annotáltuk az NCBI-nr adatbázisát felhasználva (beállítás: greedy run mode) [181]. A MEGAN6 programot használtuk a mikrobiális összetétel elemzéséhez, statisztikai kiértékeléséhez [182]. A fermentáció során végbement mikrobiális változások mértékét a log₂FC függvény segítségével számoltuk ki. A nemzetségek fermentáció végi és kezdeti relatív gyakoriságának hányadosának kettes alapú logaritmusát fejezi ki ezt az értéket (5. egyenlet).

$$\log_2 FC = \log_2 \left(\frac{\text{rel. gyak. } X}{\text{rel. gyak. } START} \right)$$

5. egyenlet: A mikrobiális változások mértékét kifejező log₂FC egyenlete (X=a vizsgált fermentor mikroba nemzetségének relatív gyakorisága, START= az X esetében vizsgált mikroba nemzetség relatív gyakorisága a fermentáció kezdetén).

Az eredményeket az iTOL (Interaktive Tree of Life) interaktív program segítségével ábrázoltuk [183].

4.10 Genom centrikus metagenomika

A genom alapú metagenomikai elemzéshez is a szűrt szekvenciákat használtuk fel. A rövid leolvasásokból úgynevezett contig-okat (hosszabb leolvasásokat) építettem össze Megahit programmal (beállítások: minimum contig hossz: 2000 bp, minimum k-mer méret: 21, maximum k-mer méret: 141). A contig összeszerelés után a kapott FASTA (szekvenciák szöveg

alapú formátuma) fájlt módosítottuk (egyszerűsítettük a contig neveket úgy, hogy mindegyik contig egy egyedi számot kapott). Ezután Bowtie 2 programmal a contigokra visszatérképeztük az egyes mintákból származó leolvasásokat (ú.n.: mapping), hogy megkapjam melyik minta melyik leolvasásából származik az adott contig. A contig-okból az Anvi'o V6 (Analysis and Visualization of O'mics data) program segítségével contig adatbázist hoztunk létre a metagenomikai munkafolyamat alapján [184]. Ennek menete röviden a következő volt. Első lépésben nyitott leolvasási kereteket kerestünk a contig-okon Prodigal program segítségével [185]. Az egyedi géneket (SCGs: Single copy core genes) rejtett Markov modell (HMM) HMMER program segítségével azonosítottuk speciális egykópiás géngyűjteményeket felhasználva [186]. A contig-ok taxonómiai, illetve funkcionális illesztéséhez Kaiju és InterProScan programokat használtunk a NCBI-nr és az Pfam adatbázisát felhasználva. Mindezen eredményeket beépítettük a contig adatbázisba [181,187–189]. Majd a Bowtie 2 programmal generált bináris térkép fájlokat (bam fájl) használtam fel a contig adatbázis profilozására, így kaptuk meg a mintaspecifikus információikat (átlagos lefedettség). Ezek után három automata genom összeszerelő (binning) program, nevezetesen a CONCOCT, MAXBIN és METABAT segítségével szereltük össze a mintákban szereplő mikrobiális genomokat [190–192]. Majd a programok által kapott eredmények alapján saját kezűleg is megkíséreltük összeszerelni a genomokat, illetve ezeket minőségileg ellenőriztük (CheckM program). Az Anvi'o anvi-refine szkriptet használtuk az egyes összeszerelt genomok minőségének javítására. Az eredményeket az Anvi'o interaktív felületen keresztül ábráztuk.

5 Eredmények, kiértékelésük

Irodalmi eredmények bizonyítják, hogy az anaerob biogáztermelő mikrobaközösség alkalmas a „Power-to-Gas” technológia katalízisére. Az összetett mikrobiális kultúra azonban jelentősen alacsonyabb H_2 parciális nyomáshoz adaptálódott az anaerob lebontás során, mint amely a H_2 segítségével történő biogáz minőségjavításának gazdaságos folyamatához szükséges. Így a H_2 rendszeres bevitele és ezáltal közel állandó jelenléte változásokat indukál a mikrobiális anyagcsere-folyamatokban és összetételben. A legjelentősebb probléma in-situ fermentáció esetén, hogy a H_2 magas parciális nyomása gátló hatással van az acetotróf és acetogén mikrobák anyagcsere-folyamataira, ami hosszútávon a szerves komponensek lebontása során felszabaduló illékony szerves savak felhalmozódásához vezet, és a fermentációs folyadék savasodását eredményezheti. Emellett a hidrogenotróf metanogenezis során a mikrobák az oldott CO_2 -t redukálják CH_4 -ná. Ennek eredményeként a fermentációs folyadék pH-ját szabályzó karbonátok, bikarbonátok szintje csökken, ami lúgosodást eredményez. Az in-situ H_2 bevétel során keletkező problémákra jelenthet megoldást az ex-situ biogáz minőségjavítása. Az ex-situ H_2 bevétel elkülöníti egymástól a szerves biomassza anaerob lebontásának fő folyamatát és a fermentációs folyadék mikroba összetételét felhasználó másodlagos reaktort, ahol a biogáz összetételének javítása végbe mehetne a H_2 segítségével. Ezzel a lépéssel a fő reaktor működése zavartalan, és csupán a másodlagos reaktorban lezajló folyamatokat kell ellenőrzés alatt tartani a hatékony CH_4 termelés elérése érdekében.

Laboratóriumunkban az in-situ és ex-situ H_2 adagolás által kiváltott mikrobiológiai folyamatokat is vizsgáltam a mikrobák anyagcsere termékeit és a mikroba közösség összetételének változását nyomon követve. A fermentációs maradék ex-situ PtBioCH₄ katalizátorként való felhasználása arra irányult, hogy az egyszerűen és olcsón rendelkezésre álló kevert mikrobiális rendszerek működését összehasonlítsam a sokkal költségesebb, de mikrobiológiai szempontból egyszerűbb tiszta kultúras fermentációk működésével. fermentációs maradék tartalmazza a „PtBioCH₄” folyamathoz szükséges mikrobaközösséget, valamint a mikrobák anyagcsere-folyamataihoz szükséges makro-, mikro- és, nyomelemeket. A biogáz erőművekben folyamatosan keletkező fermentációs maradékot tároló berendezések a biogáz erőművek fontos részét képezik. Ennek a tározónak és a fermentációs maradéknak új funkciót biztosíthat a biogáz üzem és a PtBioCH₄ technológia összekapcsolása.

5.1 Egyszeri szubsztrát adagolás hatása a PtBioCH₄ rendszerre

5.1.1 Mezofil rendszer

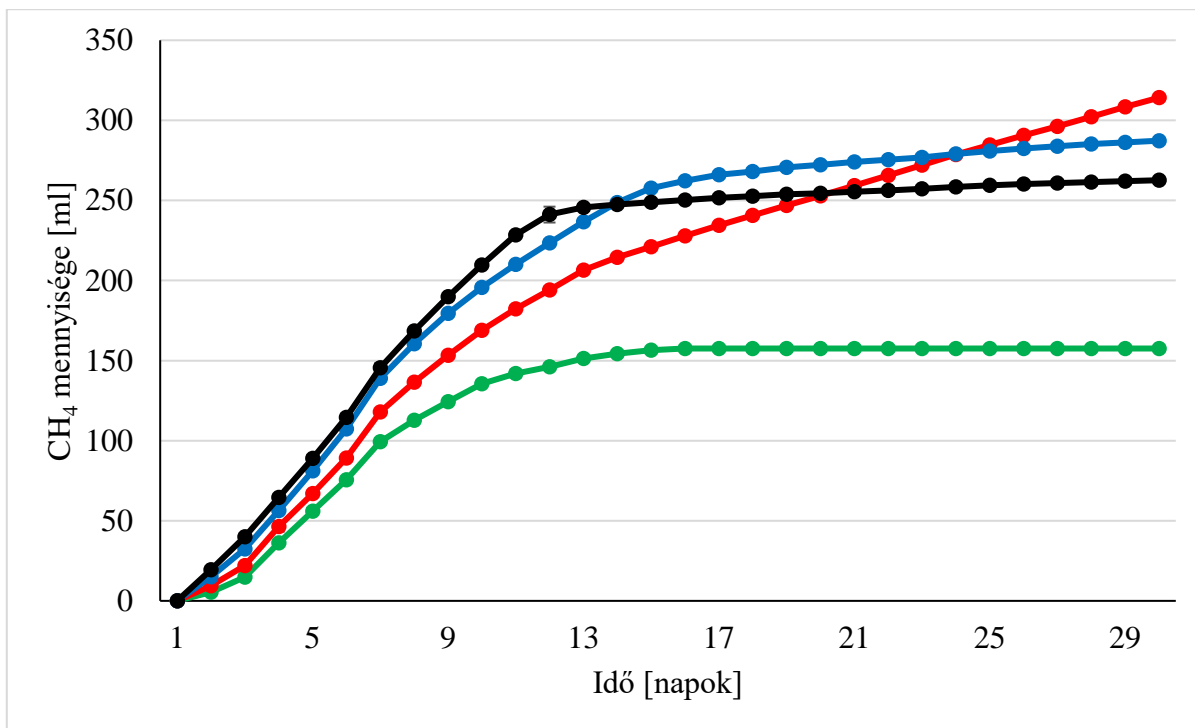
Méréseim során a fermentációs maradék mikrobaközösségének anyagcseréjét vizsgáltam, hogy alkalmas-e napi rendszerességgű, szakaszos H₂ betáplálás hatására a CH₄ képzésre, és ha igen, akkor milyen terheléssel és meddig alkalmas „PtBioCH₄” folyamat katalízisére. Működő mezofil ipari biogázerőmű fermentációs maradékát használtam reakcióközegként és szakaszos fermentációt alkalmaztam. A szerves szubsztrátot (α -cellulóz) a fermentáció kezdetén, egyszeri alkalommal vittem be a rendszerbe, azonban a H₂-t napi rendszerességgel, szakaszos betáplálással juttattam a reaktorok légterébe (3. táblázat). Ennek oka, hogy korábbi kísérleti eredmények alapján megállapítottam, hogy a légtérbe bejuttatott H₂ 24 óra elteltével teljesen hasznosult. A különböző mennyiségű H₂ adagolását követően, gázkromatográffal ellenőrizve megfigyeltem, hogy a H₂ bejuttatására alkalmazott nem nyomásálló műanyag fecskendő használata miatt a bemérni kívánt H₂, és a valójában bejuttatott H₂ mennyisége ki nem számítható, szisztematikus hiba következtében jelentős mértékben eltért. Ezért a reakció edényekben levő tényleges H₂ koncentrációt gázkromatográffal határoztam meg (4. táblázat).

Reaktor típus	Naponta bevitt (elméleti) H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [%]
Kontroll	0	0.0	0.0
"A"	20	21,4 ± 0,61	17.8
"B"	40	37,75 ± 1,7	31.46
"C"	60	48,94 ± 3,8	41.62

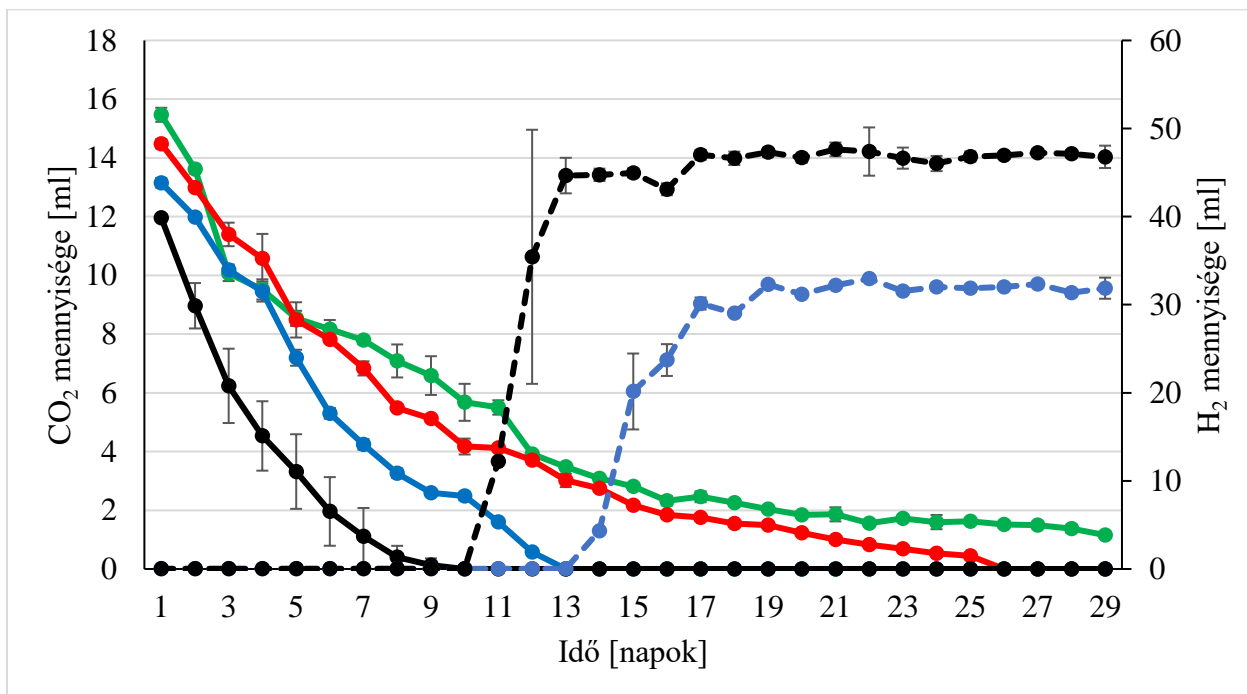
4. táblázat: A fermentorok légterébe naponta adagolt H₂ mennyisége.

A fermentáció kezdetén a CH₄ hozam jelentős része a kísérlet elején egyszer adagolt szerves szubsztrát α -cellulóz lebontásából keletkezett illékony szerves savak hasznosulása révén szabadult fel. Ennek tudható be mind a 4 fermentáció esetében megfigyelhető intenzív kezdeti CH₄ termelés (14. ábra). A könnyen lebontható és felhasználható szubsztrát által biztosított szerves savakat az acetotróf metanogén mikrobák hasították és CH₄-t állítottak elő. Az acetotróf útvonal mellett megfigyelhető a H₂ adagolás pozitív hatása a CH₄ hozamra, mind a keletkezett CO₂ mennyiségére az egyes reaktorokban (15. ábra). A fermentáció ezen szakaszában hidrogenotróf metanogén törzsek anyagcsere-folyamataik révén a rendelkezésre álló teljes H₂

mennyiségét felhasználták és CO₂ redukciójára fordították 24 óra alatt, ezzel csökkentve a reaktorok légterének CO₂ tartalmát, növelve a CH₄ mennyiségét. A mikrobák CH₄ termelő aktivitása a 7. napig növekedett, ezután a könnyen hasznosítható szerves szubsztrát mennyisége folyamatosan csökkent, ami miatt az acetotróf metanogének ecetsav, valamint a hidrogenotróf metanogének CO₂ utánpótlása csökkent. A CO₂ fogyasztásának sebességét a naponta felhasznált H₂ mennyisége szabályozta. A nagyobb mennyiségű H₂ bejuttatása (B, C fermentorok), nagyobb kezdeti napi CH₄ hozamot biztosított, felgyorsította a CO₂ felhasználását, aminek kedvezőtlen hatásai már a 11. napot követően észrevehetőek voltak a legmagasabb H₂ ellátással működő fermentorokban („C”). A CO₂ utánpótlás hiányában a hidrogenotróf metanogén mikrobák szénforrása eltűnt a fermentációs közegből, emiatt a CH₄ termelés meredek hanyatlásnak indult. Szénforrás hiányában mikrobák számára rendelkezésre álló H₂ nem volt továbbá felhasználható és a reaktorok légterében maradt vissza még 24 órát követően is (15. ábra). Ugyanez a folyamat volt megfigyelhető 4 nappal később a második legnagyobb napi H₂ bevittelal működő reaktorokban („B”). Azonban a legalacsonyabb H₂ mennyiséggel ellátott reaktorokban („A”) a CH₄ termelés és H₂ felhasználás a fermentáció végezetéig kitartott és a hidrogenotróf metanogén mikrobák stabil CH₄ termelést biztosítottak a rendszernek. Ezekben a fermentorokban megfigyelt CO₂ mennyiség alapján viszont feltételezhetően közel járt a CH₄ termelésének leállításához a rendszer a 29. napon, hiszen a 26. napot követően nem tudtam CO₂-t visszamérni a fermentorok légteréből (15. ábra).

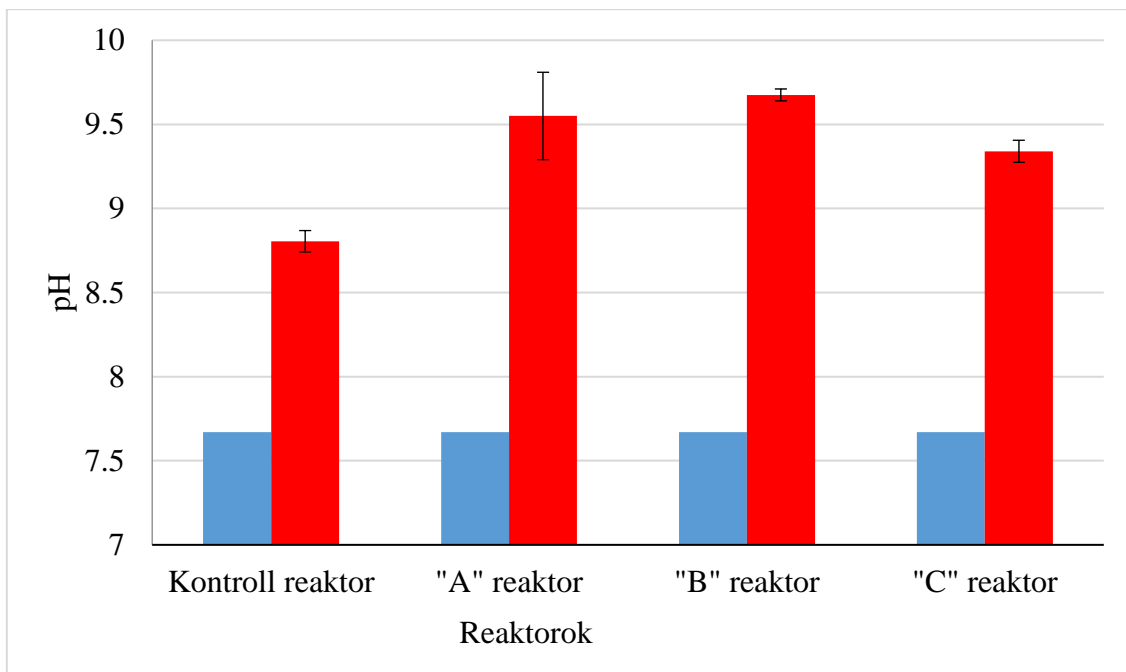


14. ábra: A mezofil biogáztermelő közösség kumulatív metántermelése (zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ napi bevétel).



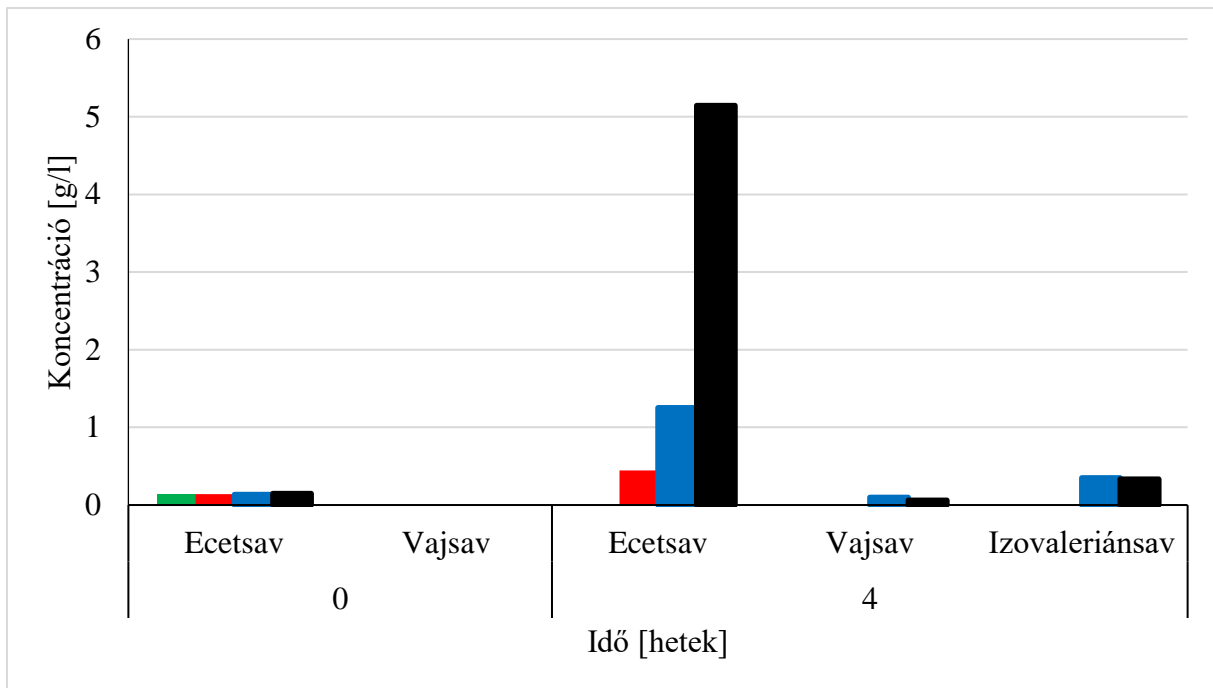
15. ábra: A fermentorok légtérének CO₂ tartalma zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ napi bevétel) és a visszamaradt H₂ mennyisége (kék szaggatott (B): 40 ml, fekete szaggatott (C): 60 ml H₂ napi bevétel).

A fermentációs közeg illékony szervessav-tartalmát és pH-ját vizsgálva újabb megfigyeléseket tettem a kevert mikrobaközösség működésével kapcsolatban, különböző mennyiségű H_2 jelenlétében. A pH változása a fermentáció ideje alatt, szorosan összefügg a szervesanyag-tartalom csökkenésével, valamint a hidrogenotróf metanogének anyagcsere-folyamataival. A szerves szubsztrát lebomlása során illékony szerves savak keletkeznek (acidogenezis), amelyek a pH-t savas irányba tolják el. Jelen kísérletem során az acetotróf metanogének a fermentáció elején gyorsan és hatékonyan hasznosították a keletkező szerves savakat, amit a megnövekedett CH_4 termelés bizonyít (14. ábra). A szerves savak képzése és hasítása során felszabaduló CO_2 egy része távozik a légtérbe, míg szintén jelentős hányada oldottan karbonátok/bikarbonátok formájában a reakció közegben marad. Ezek a karbonátok/bikarbonátok fontos szerepet töltenek be a pH szabályozásában, hiszen savas pH-t biztosítanak. A hidrogenotróf metanogenezis végbemeneteléhez elengedhetetlen a mikrobák számára a szénforrás, amit ez a csoport a CO_2 -ból, annak is az oldott formájából biztosít. A CH_4 termelődés, H_2 felhasználás, illetve a légtér folyamatosan csökkenő CO_2 tartalma bizonyítja az aktív hidrogenotróf útvonalat, amit, a pH nagymértékű emelkedése is alátámaszt. A fermentáció végére mind a 3 fermentáció esetén jelentősen megemelkedett a pH, 9 feletti értéket tapasztaltam a napi H_2 betáplálás eredményeként (16. ábra). A pH a H_2 felhasználás mértékével arányosan lúgosította a fermentációs közeget. Érdekes azonban megfigyelni, hogy nem a „C”-reaktor típusban, amely a legmagasabb H_2 koncentráció mellett működött, tapasztalható a leglúgosabb pH, hanem a két kisebb napi H_2 mennyiséget kapó reaktorban, aminek okára a szervessav-összetétel meghatározása során derült fény.



16. ábra: A fermentorok pH-jának változása a fermentáció végeztével (piros) a kiindulási (kék) ponthoz mérten.

A fermentáció végeztével megvizsgáltam a változásokat a szervessav összetétel tekintetében és azt tapasztaltam, hogy a napi beadagolt H_2 mennyiségének növekedésével a szerves savak koncentrációja is emelkedett (17. ábra). Ennek oka, hogy a H_2 magas parciális nyomása a reaktorok légterében gátolhatja a savképző és az acetotróf útvonalakat is. Ahogy az a gázösszetétel-elemzéseknél kiderült, a „C” fermentorokban állt le leghamarabb a metántermelés, aminek oka a hidrogenotróf metanogének számára szükséges szénforrás a CO_2 kimerülése. Azonban megfigyelhető, hogy 5 g/l feletti koncentrációban található ecetsav a fermentációs folyadékban, ami könnyen hozzáférhető szubsztrát lehetett volna az acetotróf metanogének számára. Az ecetsav mellett hosszabb szénláncú szerves savak (pl.: vajsav, izovalerián sav) is mérhetőek voltak a reaktorokban, ami arra enged következtetni, hogy a nagy mennyiségben bevitt H_2 gátolta az acetotróf mikrobák anyagcseréjét, így a szerves szubsztrátból keletkezett szerves savak nem voltak képesek hasznosulni. A szerves savak felhalmozódása vezethető vissza arra a tényre, hogy a legmagasabb pH-t mégsem azokban a reaktorokban (16. ábra) mértem, amelyek a legnagyobb dózisu H_2 -nel voltak ellátva. Az acidogén és acetotróf útvonalak gátlása miatt felhalmozódott szerves savak kis mértékében kompenzálták a karbonátok/bikarbonátok kimerülése által kiváltott pH emelkedést.



17. ábra: A fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav-összetétel tekintetében **zöld:** kontroll, **piros (A):** 20 ml, **kék (B):** 40 ml, **fekete (C):** 60 ml H₂ napi bevétel).

A kísérlet folyamán bebizonyosodott, hogy szakaszosan táplált rendszerben alacsony mennyiségű exogén H₂ adagolás a leggazdaságosabb, hiszen mind az összes megtermelt CH₄ mennyisége (314,25 ml), mind az általam bejuttatott H₂-ből keletkezett CH₄ mennyisége (156,56 ml) meghaladja az „A”-reaktorok esetében a másik 2 teljesítményét (11. táblázat, függelék). Sajnos az is megfigyelhető, hogy a szervesanyag és az annak lebontása során felszabaduló CO₂ hiányában 2 héten túl az exogén H₂-t nem voltak képesek hasznosítani a hidrogenotróf metanogén mikrobák, azokban a reaktorokban, amelyek megemelt H₂ mennyiséget kaptak naponta („B”-, „C”-reaktor) és így a bejuttatott H₂ veszendőbe ment. Abban az esetben, ha csak a felhasznált H₂ és az abból megtermelt CH₄ mennyiségét veszem számításba, akkor is a hidrogenotróf metanogén mikrobák H₂ átalakítási hatékonysága a legkisebb H₂ adagolással („A”-reaktor) működő fermentorokban volt a leghatékonyabb (97,41%).

A mezofil fermentációs maradék külső forrásból bevitt H₂ segítségével biogáz minőségjavításra alkalmas. Működése nagyban függ a bevitt H₂ mennyiségétől. Hosszabb távon csak alacsony H₂ parciális nyomáson voltak a mikroba közösség tagjai megfelelően működőképeseek. Mérték növelhetősége és ipari rendszerben való gazdaságos és megfelelő kapacitású megvalósítása kérdéses.

5.1.2 Termofil rendszer

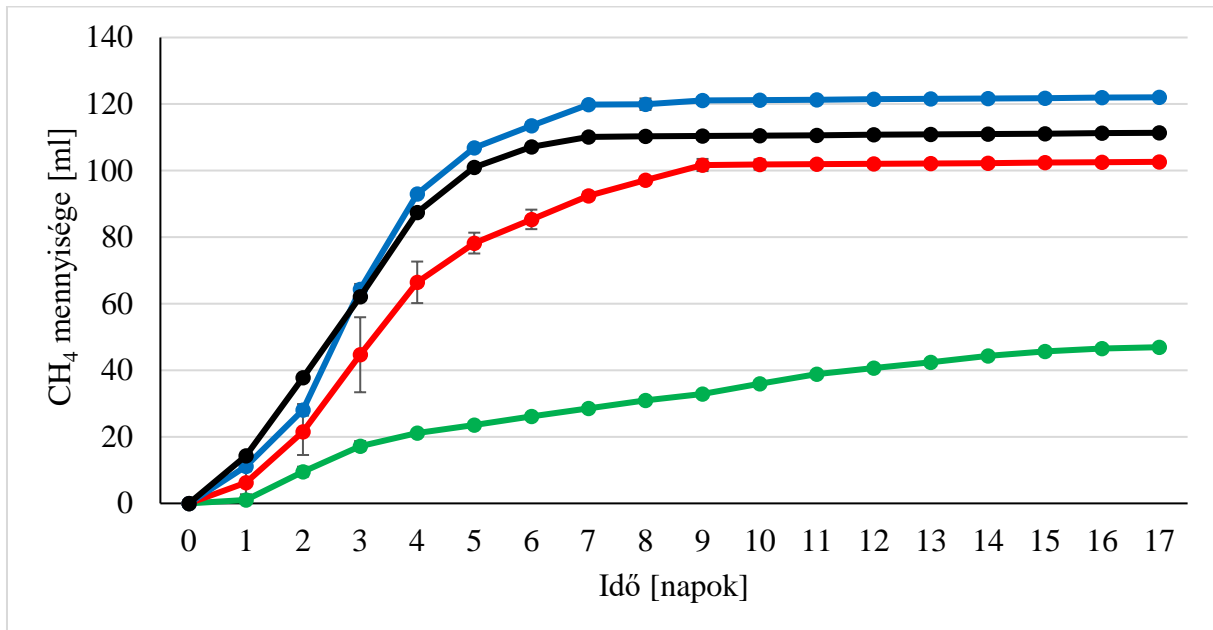
A mezofil iszap által biztosított eredmények és az irodalom alapján bizonyossá vált, hogy a fermentációs maradék mikrobaközössége, ha biztosítjuk számára a megfelelő környezeti paramétereket, akkor alkalmas a külső forrásból bejuttatott H₂ segítségével a keletkező biogáz összetételén javítani. Ezért elengedhetetlennek találtam, hogy azonos elven, azonos kísérleti beállításokkal (3. táblázat, 5. táblázat), egy működő termofil biogáz erőmű fermentációs maradékát is teszteljem reakcióközegként.

Reaktor típus	Naponta bevitt (elméleti) H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [%]
Kontroll	0	0	0
"A"	20	23,82 ± 0,52	19.85
"B"	40	40,83 ± 2,40	34.03
"C"	60	54,71 ± 1,07	45.59

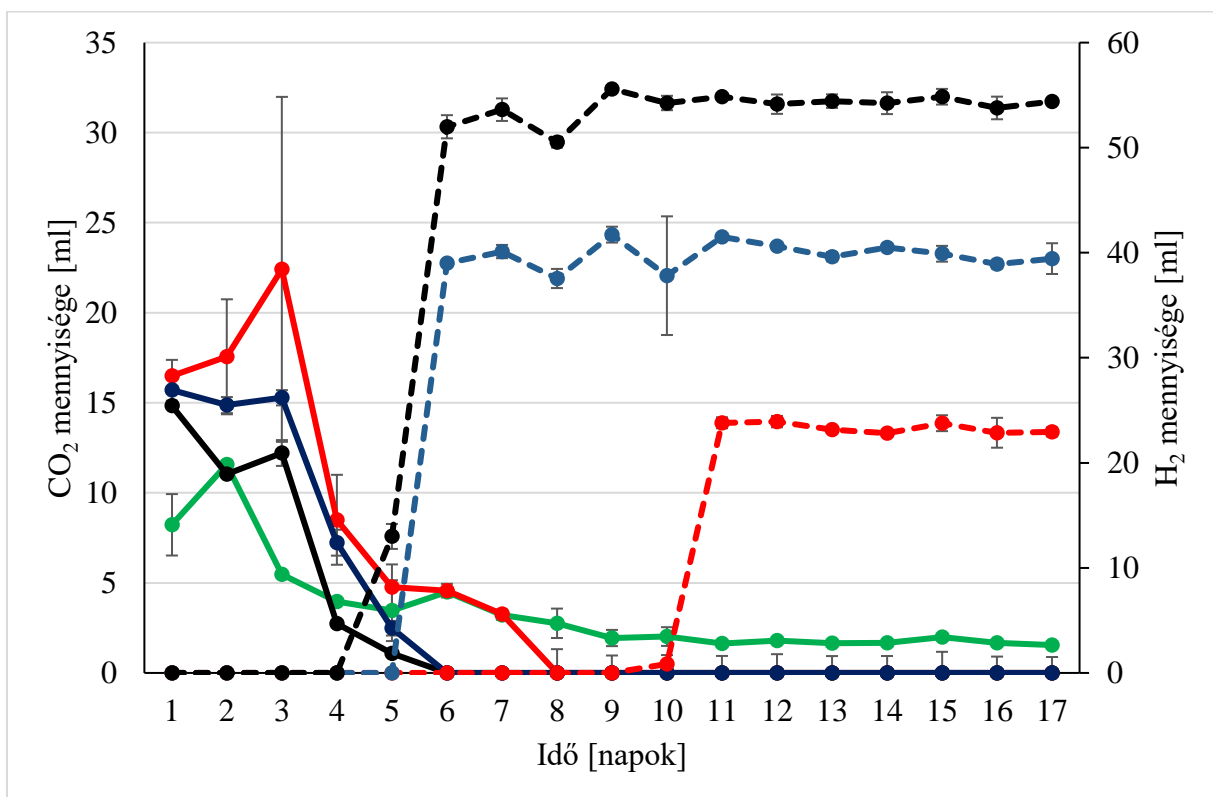
5. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H₂ mennyisége.

A fermentáció kezdete hasonló dinamikát mutatott, mint a mezofil kísérlet esetében, 1-2 napos adaptációt követően a mikrobák a könnyen hasznosítható α -cellulózból és a hozzáadott H₂-ből nagy mennyiségű CH₄-t fermentáltak (18. ábra). Irodalmi adatok támasztják alá, hogy termofil hőmérsékleten a mikrobiális enzimatikus folyamatok gyorsabban zajlanak le. Ezen kísérlet esetében is ez figyelhető meg, hiszen itt a CH₄ termelésben bekövetkezett hanyatlás már a 3-4. napot követően észlelhető a két nagyobb H₂ dózissal táplált reaktor („B”, „C”) esetében. Ezzel párhuzamosan a hozzáadott H₂ felhasználásának hatékonysága is csökken, aminek kiváltó oka nem feltétlenül az oldott CO₂ hiánya, hiszen visszamérhető CO₂ található volt minden reaktorban az 5. napot követően is. Mennyiségének csökkenése, köszönhetően a hidrogenotróf anyagcsereének folyamatosan nyomon követhető volt (19. ábra). Feltételezésem szerint a CH₄ termelés korai lecsökkenése és a H₂ hasznosulás rossz hatékonysága a mikrobakonzorcium nem megfelelő adaptációjára vezethető vissza a légtér magas H₂ nyomására, hiszen az alacsonyabb H₂ betáplálással működő reaktorban („A”) ezek a gátló folyamatok jóval később jelentek meg. A 10. napot követően itt is leállt a mikrobák CH₄ termelése, ami viszont egyértelműen a CO₂ hiányára vezethető vissza, hiszen a 8. napot követően nem mértem vissza CO₂-ot az „A”-típusú fermentorok légteréből. Ezt követően a

mikrobák aktivitásának helyreállítására a fermentációs körülmények megváltoztatása nélkül nem volt lehetőség.

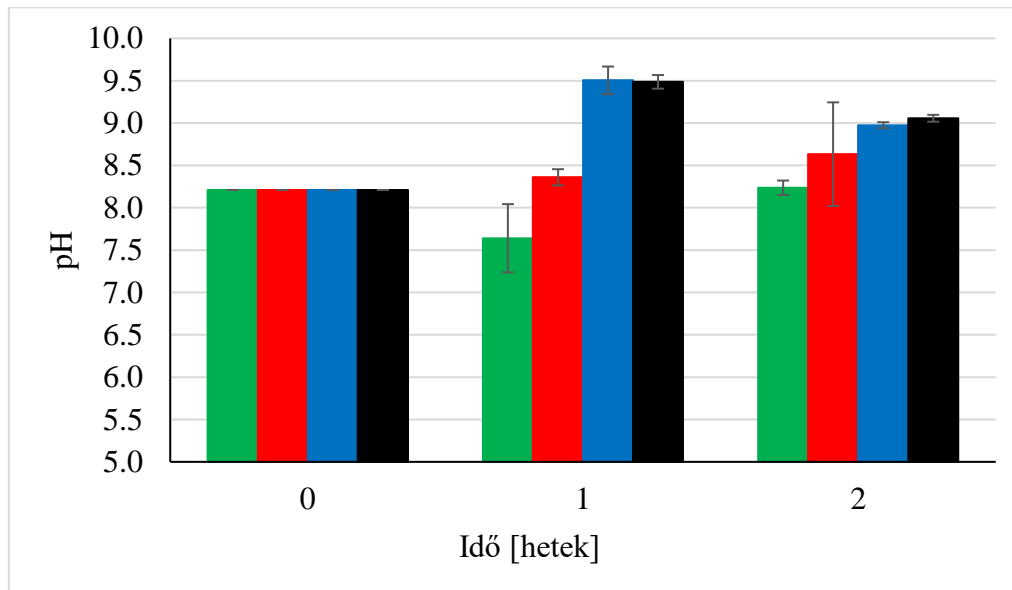


18. ábra: A termofil biogáztermelő közösség kumulatív metántermelése (zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ napi bevétel).



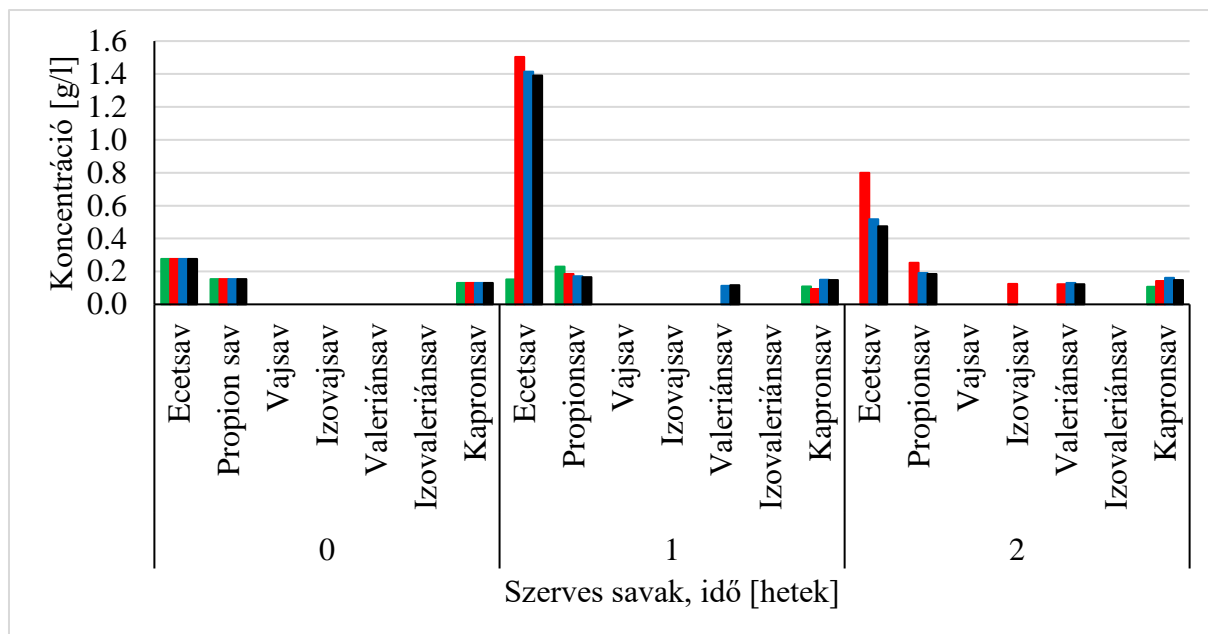
19. ábra: A fermentorok légtérének CO₂ tartalma zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ napi bevétel) és a visszamaradt H₂ mennyisége (piros szaggatott (A): 20 ml, kék szaggatott (B): 40 ml, fekete szaggatott (C): 60 ml H₂ napi bevétel).

A fermentáció ideje alatt végbement pH változások követik a fermentorok légtérének CO₂ koncentráció változását (19. ábra, 20. ábra). A 7. napot követően a magas H₂ ellátással működő „B”-, „C”- fermentorok CO₂ tartalma teljesen kimerült, ami a fermentációs folyadék lúgosodásához vezetett, míg az „A”- reaktorban a CO₂ kontroll alatt tartotta a pH-t és a kiindulási értékhez képest jelentős eltérést nem eredményezett. A 2. hetet követően ezeknek a reaktoroknak az oldott CO₂ tartalékait is hasznosították a hidrogenotróf metanogének, így a lúgosodás itt is megindult és 8,5 fölé emelkedett.



20. ábra: A fermentorok pH-jának változása (zöld: kontroll, piros: 20 ml, kék: 40 ml, fekete: 60 ml H₂ napi bevétel)

A szervessav-összetétel az első hét után 1 g/l feletti ecetsav-koncentrációt mutat minden reaktorban, ami a szerves szubsztrát degradációs termékeként van jelen (21. ábra). Mennyisége elmarad a mezofil reaktorokban mért értéktől, aminek oka a gyorsabb szubsztrátmobilizálás volt termofil körülmények között. A gázösszetétel analízis során egyértelműen látszik (18. ábra), hogy az acetotróf útvonalak aktivitásának csúcsa a 3-4. napra volt tehető, onnantól mind a CH₄ termelés, mind a H₂ felhasználás hatékonysága csökkent. A 2. héten visszamért 0,5 g/l körüli ecetsav koncentráció valószínűleg az acetotróf metanogenezis gátlásának köszönhetően maradt vissza a reakcióközegben, hiszen acidogenezis folyamatai ekkor már szubsztrát hiányában gátoltak voltak.



21. ábra: A fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervessav-összetétel tekintetében (zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ napi bevétel).

A mezofil körülményekhez képest a termofil iszap rosszabbul teljesített fed-batch körülmények között. A termofil mikrobaközösség nem volt képes adaptálódni a nagy mennyiségű H₂ jelenlétéhez és hamar gátlást eredményezett és sem az acetotróf metanogének aktivitása nem volt megfelelő, sem a hidrogenotróf metanogéneké a „C”- reaktorokban. De az alacsonyabb H₂ parciális nyomáson működő („A”, „B”) batch reaktorok aktivitása is elmarad a mezofil kísérlet eredményeitől. A termofil körülmények között gyorsabban végbemenő anyagcsere folyamatok ebben az esetben nem kedveztek a mikrobák számára, hiszen az adaptáció nem valósult meg a magas H₂ koncentrációhoz, ami gátló folyamatok sorát indította be és gyors leálláshoz vezetett. A hidrogenotróf törzsek H₂ átalakítási hatékonysága is nagy mennyiségű H₂ jelenlétében („B”, „C”-reaktorok) elmaradt (63,18%, 38,38%) a mezofil értékektől (12. táblázat, függelék). Az alacsony napi H₂ dózissal ellátott „A”-fermentorokban ez az érték meghaladta az elméleti maximumot, amire a magyarázat a mikrobakonzorcium által előállított endogén H₂ forrás lehetett a kontroll reaktorokkal szemben, aminek mennyisége nem beleszámítható az exogén mennyiségébe, viszont plusz H₂ forrást biztosít a hidrogenotróf metanogenezishez és CH₄ többletet eredményezhet.

Összességében elmondható, hogy az in-situ biogáz minőségjavítás termofil fermentációs maradék segítségével fed-batch körülmények között számos nehézséggel jár, köszönhetően a mezofil közösséghez képest jelentősen gyorsabb anyagcsere folyamatoknak. Megfelelő

adaptációs lépéseket követően működőképes lehet a rendszer, de a befektetések kifizetődése nem valószínű.

5.2 Rendszeres szervesanyag-utánpótlás hatása a PtBioCH₄ rendszerre

5.2.1 Mezofil rendszer

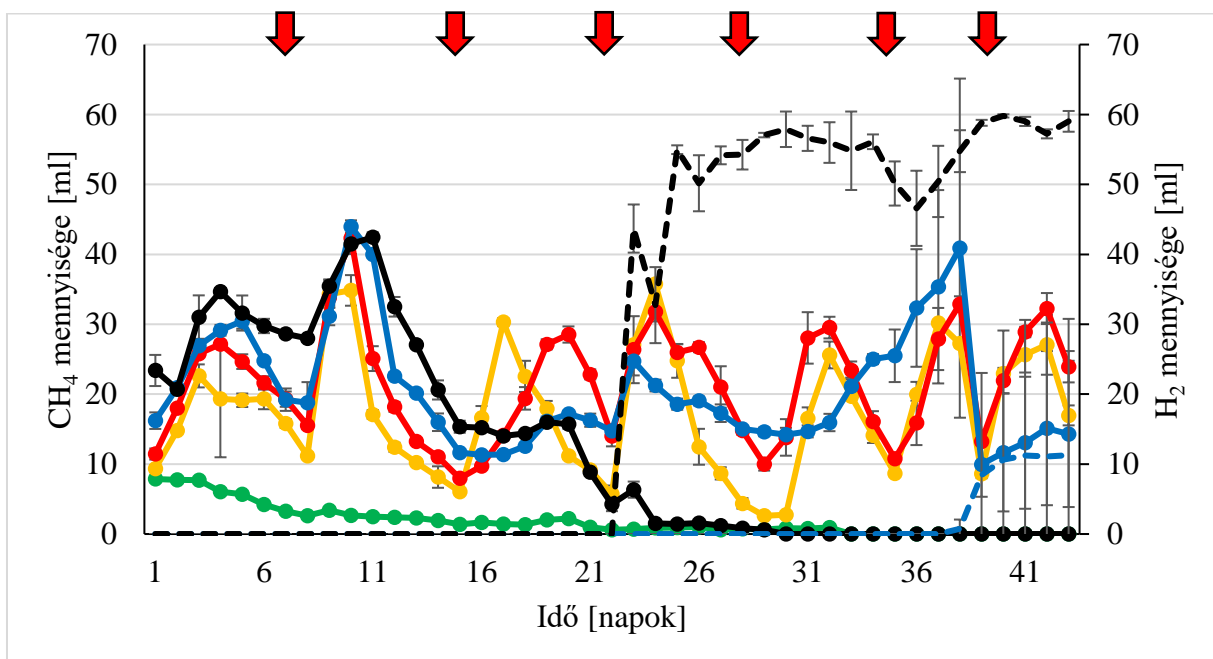
Korábbi eredmények alapján bebizonyosodott, hogy az egyik legfontosabb korlátja a fermentációs maradék hasznosításának biogáz összetételének javítására a korlátozott szervesanyag-utánpótlás hiánya okozta CO₂ kimerülés. A hidrogenotróf metanogenezis során felhasznált CO₂ a reakcióközeg oldott karbonát/bikarbonát egyensúlyát borította fel, aminek többek között az iszap pH-ja látta kárát. CO₂ a szerves szubsztrát degradációja során felszabaduló monomerekből, oligomerekből képzett szerves savak, illetve az acetotróf metanogenezis során szabadul fel. A szerves szubsztrát utánpótlás biztosítása fed-batch kísérleti elrendezésben, megoldást nyújthat a lúgosodás és a CO₂ forrás kimerülésére. Először mezofil körülmények között vizsgáltam a korábbi kísérleti beállításoknak megfelelően a H₂ mikrobiológiai hatásait szakaszos szervesanyag-utánpótlás mellett (3. táblázat, függelék, 6. táblázat).

Reaktor típus	Naponta bevitt H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [%]	Hetente bevitt szubsztrát mennyisége [g]
Kontroll	0	0.00	0.00	0.0
"A"	0	0.00	0.00	0.3
"B"	20	19,61 ± 0,51	16.34	0.3
"C"	40	39,08 ± 1,35	32.57	0.3
"D"	60	58,30 ± 2,30	48.58	0.3

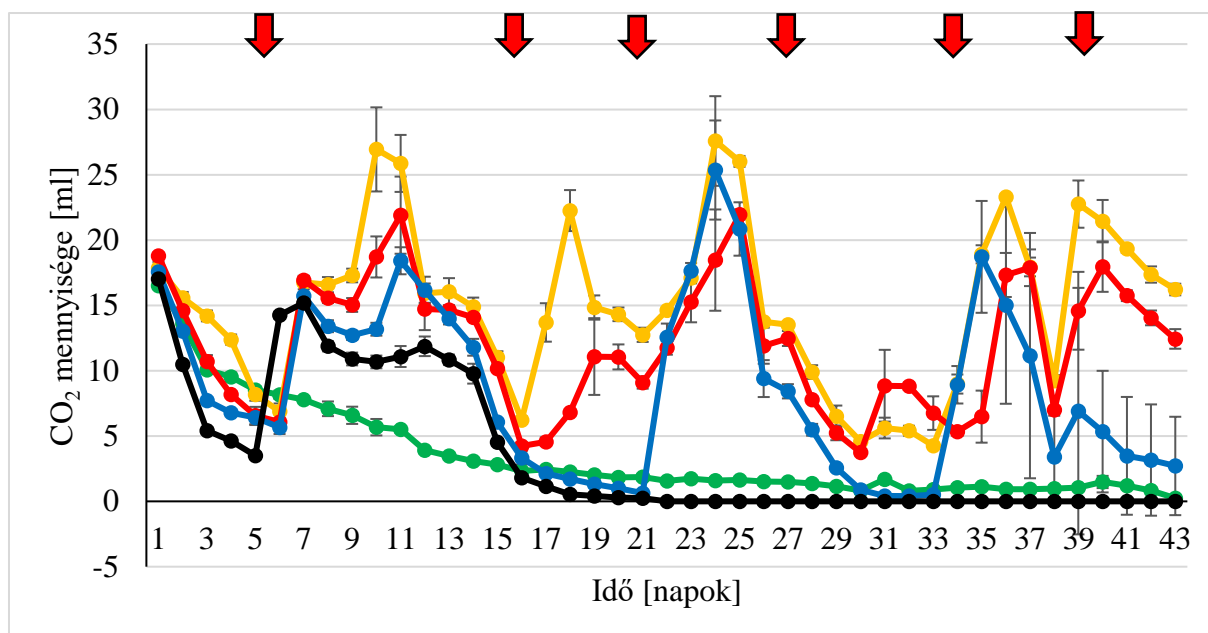
6. táblázat: A fermentorok légtérébe naponta beadagolt H₂ mennyisége és a szubsztrát bevitel mennyisége

A CH₄ termelése hasonló dinamikát mutat, mint a korábbi mezofil kísérlet esetében, ami a szubsztrátbevitel ciklusaival ismétlődött (22. ábra). Az α-cellulóz bevitelét követően a hidrolizáló mikroorganizmusok aktivitása kezd emelkedni, majd 2-3 napot követően válnak az acetotróf metanogének számára az illékony szerves savak legnagyobb mennyiségben

elérhetővé, ekkor tapasztaltam a kiemelkedő CH₄ termelést. A hidrogenotróf metanogének mindhárom reaktorban, amelyekbe exogén H₂-t juttattam be, hatékonyan és maradéktalanul hasznosították. A CH₄ termelések közti különbségeket a hidrogenotrófok számára hozzáférhető H₂ mennyisége szabályozta. A 20. napig hatékony CH₄ termelés volt megfigyelhető minden reaktorban, köszönhetően a szakaszosan utánpótlott szerves szubsztrát lebontása során felszabaduló CO₂-nak (23. ábra). A 20. napot követően azonban, mind a két legnagyobb napi H₂ mennyiséget kapó („C”, „D”) fermentorok CH₄ termelése lecsökkent és a „D”-reaktorok H₂ felhasználása is hanyatlásnak indult. Ez a folyamat a fermentációs körülményekbe való beleavatkozás nélkül visszafordíthatatlanná vált, és a CH₄ termelés és H₂ felhasználás végleges leállításához vezetett. Habár azoknak a reaktoroknak az aktivitása, amelyekbe 40 ml H₂-t adagoltam („C”) látszólag helyreállt később a CH₄ termelése, azonban a 38. napot követően drasztikus romlás következett be és a H₂ felhasználása is hanyatlásnak indult. Ez a fermentáció leállításához vezetett, amit a folyamatosan csökkenő CO₂ tartalom is bizonyít, és utánpótlása nem következett többé be. A gázösszetétel alapján itt is azok a reaktorok voltak képesek hosszú távon megbízhatóan működni, amelyekben a H₂ parciális nyomása alacsony szintet ért csak el („B”).



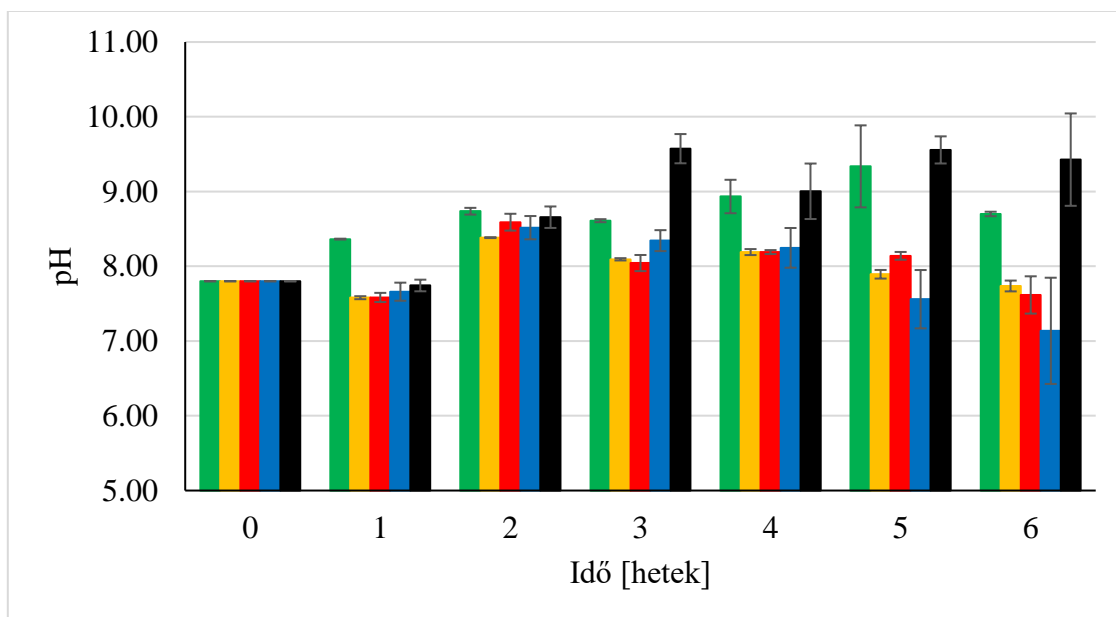
22. ábra: A mezofil biogáztermelő közösség napi metántermelése (zöld: kontroll, sárga (A): kontroll + szubsztrát, piros (B): 20 ml+ szubsztrát, kék (C): 40 ml+ szubsztrát, fekete (D): 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát) és a visszamaradt H₂ mennyisége (kék szaggatott (C): 40 ml + szubsztrát, fekete szaggatott (D): 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát). A piros nyilak az α -cellulóz bevétel időpontjait jelzik.



23. ábra: A fermentorok légterének CO₂ tartalma (zöld: kontroll, sárga (A): kontroll + szubsztrát, piros (B): 20 ml+ szubsztrát, kék (C): 40 ml+ szubsztrát, fekete (D): 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát). A piros nyilak az α -cellulóz bevétel időpontjait jelzik.

A pH nyomon követése alapján megfigyelhető, hogy kezdetben minden reaktorban lúgosodás történik (24. ábra), aminek magyarázata, hogy a keletkező szerves savakat az acetotróf mikroorganizmusok gátlás nélkül hasznosították, így az nem befolyásolta a fermentációs folyadék pH-ját (46. ábra, függelék), szemben a H₂-nel, ami köszönhetően a hidrogenotróf metanogének aktivitásának nagy mértékben kimeríti az oldott karbonátokat/bikarbonátokat. A 3. hetet követően minden reaktor pH-ja süllyedni kezdett, ezzel párhuzamosan az illékony zsírsavak koncentrációja emelkedett. A 3. héten a két legmagasabb ecetsav koncentrációt azokból a fermentorokból tudtam visszamérni, amelyek légterébe a legnagyobb mennyiségű napi H₂-t juttattam be. Azonban az a tény, hogy már a 3. héten és azt követő időszakban is az alacsonyabb ecetsav koncentrációt az alacsonyabb H₂ parciális nyomással rendelkező reaktorokból („C”) mértem vissza, arra enged következtetni, hogy a magas H₂ koncentráció nem csak az acetotróf metanogének aktivitását gátolta, amit a CH₄ termelés leállása (22. ábra) is bizonyít, hanem az acetogén baktériumok anyagcsere folyamatai is lelassultak, leálltak, hiszen nem történt szervessav-képzés, annak ellenére, hogy a szükséges szubsztrát jelen volt. Ezért fordulhatott elő, hogy a „D”-fermentorok ecetsav koncentrációja jelentősen nem emelkedett és még a metanogenezist nem gátló 2 g/l körüli koncentrációtartományban maradt. A napi 40 ml H₂ adagolásával működtetett „C”-fermentorokban a 4. hetet követően pH csökkenés volt megfigyelhető, amelynek háttérében, az

acetotróf metanogén mikrobák lassuló anyagcseréje áll. A szervessav analízis alá is támasztja ezt, hiszen folyamatosan növekvő koncentrációban van az ecetsav jelen, ami a nem megfelelő szervessav hasítását támasztja alá. Azonban az ecetsav mellett hosszabb szénláncsal rendelkező szerves savak (pl. propionsav) koncentrációjának emelkedése az acidogenezis megfelelő működésére utal. A legalacsonyabb H_2 napi bevétel mellett működő reaktorok („B”) pH-ja állandó, 8 körüli értéket adott a fermentáció teljes hossza alatt, ami Bassani és munkatársai által bemutatott pH (7,78-8,17)-as értékkel egyezik [85]. A szerves savak jelenlétének hiánya, a gázösszetétel elemzés eredmények (22. ábra) és az állandó teljes H_2 felhasználás a konzorcium megfelelő működésére enged következtetni.



24. ábra: A fermentorok pH-jának változása (zöld: kontroll, sárga (A): kontroll + szubsztrát, piros (B): 20 ml+ szubsztrát, kék (C): 40 ml+ szubsztrát, fekete (D): 60 ml H_2 napi bevétel + szubsztrát).

A fermentációs maradék felhasználása H_2 segítségével a biogáz CO_2 tartalmának és ezzel, a gázösszetételének javítására fed-batch alapú szervesanyag-utánpótlásával egy kedvezőbb eljárás a batch típusú rendszernél. Szakaszos szervesanyag rátáplálásának köszönhetően hosszabb ideig képes a fermentációs elegy oldott CO_2 tartalmának fenntartására, amivel biztosítva van a hidrogenotróf metanogének számára a szükséges szénforrás. A rendszeres szervesanyag-utánpótlás egy másik problémát eredményezett magas H_2 parciális nyomás jelenlétében, ugyanis hosszabb távon gátolta a mikrobák acidogén és acetotróf anyagcsere útvonalait, ezzel szervessav felhalmozódást, pH csökkenést és a fermentáció leállítását eredményezte. Ezek az eredmények hasonlóak Bassani és munkatársainak eredményéhez [85], amelyek szerint a H_2 csak alacsony dózisban ($192 \text{ ml l}^{-1} \text{ nap}^{-1}$) adagolható rendszeres szerves

szubsztrát bevitel mellett. Bassani és mts eredményei azonban jelentősen alacsonyabbak az általam alkalmazott és működőképes „B” reaktorok ($19,61 \text{ ml nap}^{-1} = 490,25 \text{ ml l}^{-1} \text{ nap}^{-1}$) értékétől. A bejuttatott H_2 átalakítási hatékonysága (83,56%) is esetünkben magasabb, mint az általuk alkalmazott CSTR rendszerben (71%), azonban a légtér átlagos CH_4 tartalma (88,9%) jelentősen magasabb volt az általam elért értéknél (67,60%) [85].

Összességében a szakaszos szervesanyag-utánpótlása javította a biológiai úton történő biogáz összetétel javítást, azonban a magas H_2 koncentráció gátlást eredményezett, ami ipari megvalósítás esetén továbbra sem a leggazdaságosabb megoldás. Ezen felül a szakaszos szerves szubsztrát betáplálása jelentős mennyiségű CO_2 felszabadulását eredményezte, amely a hidrogenotróf metanogének CO_2 felhasználását meghaladta. A fermentáció során keletkező végtermék bioCH_4 formájában (95-98% CH_4 tartalom) a gázrendszerbe vezethető, amelyre a rendszer sajnos nem alkalmas. Rendszeres, mégis nehezen nyomon követhető mennyiségű CO_2 kerül a reaktorok légtérébe, aminek teljes mértékű hasznosítása folyamatos monitorozást, és rendkívül precíz finomhangolást követelne a gázrendszerbe vezethető minőség elérése érdekében.

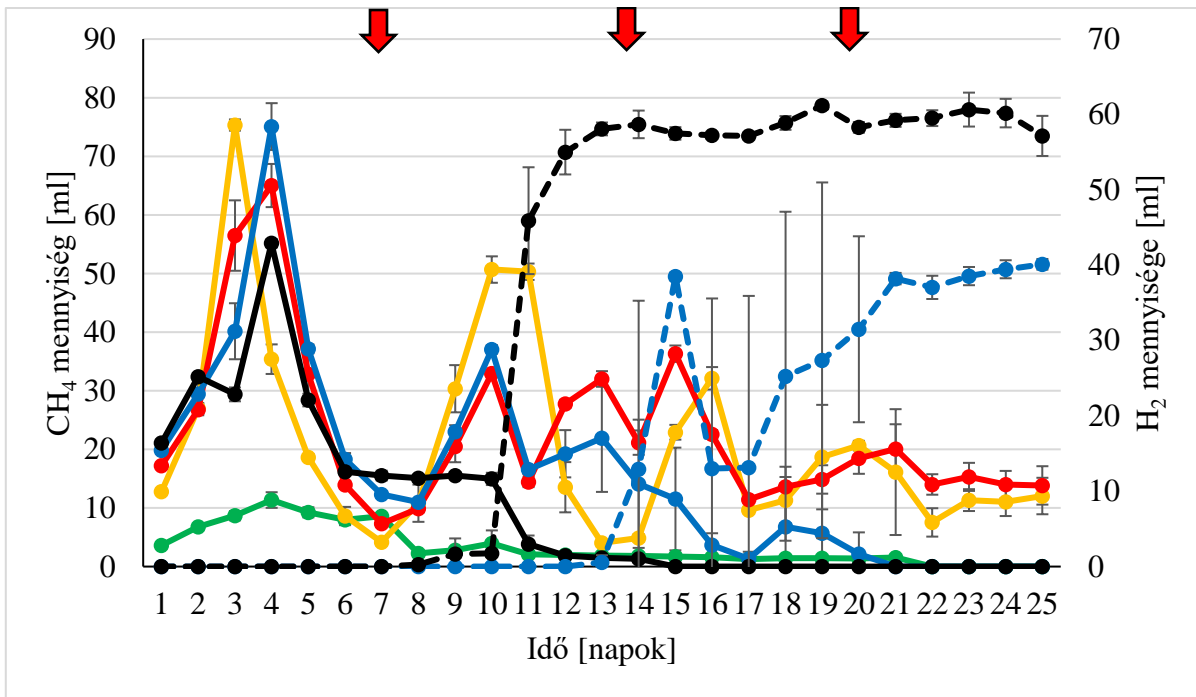
5.2.2 Termofil rendszer

A korábbi termofil mérés során megfigyelhető volt, hogy termofil hőmérsékleten termofil mikrobakonzorcium alkalmazásával a szerves szubsztrát mobilizálása és hasznosítása sokkal gyorsabban ment végbe, mint mezofil körülmények között, valamint a magas H_2 parciális nyomás által kiváltott gátló folyamatok is sokkal hamarabb érvényesültek. A szerves szubsztrát szakaszos betáplálásának hatását vizsgáltam termofil körülmények között a korábban alkalmazott fermentációs körülmények között (3. táblázat, függelék, 7. táblázat).

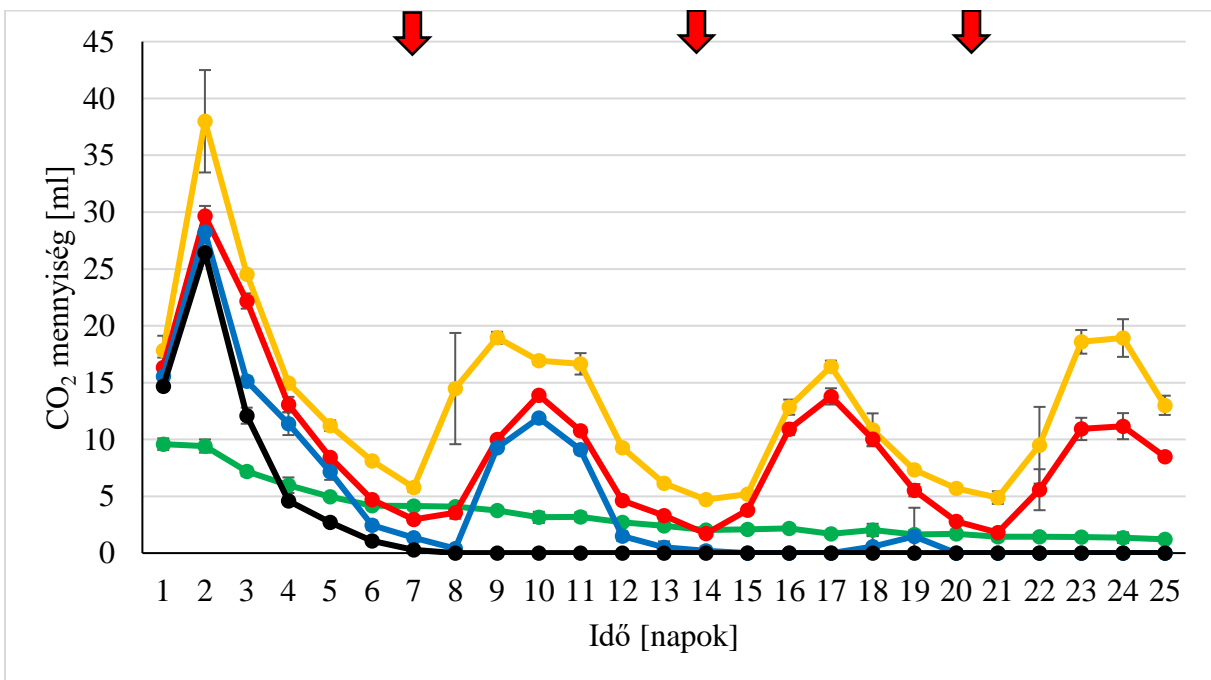
Reaktor típus	Naponta bevitt H_2 mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H_2 mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H_2 mennyisége [%]	Hetente bevitt szubsztrát mennyisége [g]
Kontroll	0	0.00	0.00	0.0
"A"	0	0.00	0.00	0.3
"B"	20	$21,31 \pm 0,35$	17.76	0.3
"C"	40	$40,37 \pm 0,28$	33.64	0.3
"D"	60	$59,27 \pm 1,06$	49.39	0.3

7. táblázat: A fermentorok légtérébe naponta beadagolt H_2 mennyisége és a szubsztrát bevitel mennyisége.

A fermentáció első hetében rövid adaptációs idő után a szerves szubsztrát hasznosítása és főként az acetotróf metanogenezisnek köszönhetően hatékony CH_4 termelést tapasztaltam (25. ábra). A beadagolt H_2 mennyiségéből keletkező CH_4 mennyisége nem volt arányos a bevitt H_2 mennyiségével és a legnagyobb H_2 napi mennyiséget kapó reaktor („D”) CH_4 termelése elmarad a másik két H_2 -nel ellátott reaktortól. A „B” és a „C” reaktor közötti CH_4 termelésbeli különbség a hidrogenotróf aktivitásnak köszönhetően megfigyelhető, habár arányai nem vezethetők vissza a sztöchiometrikus elméleti maximumra. A „D” reaktor alulteljesítése és a „C” reaktor alig eltérő CH_4 termelése az acetotróf metanogenezis gátlására utalnak, amelyet a CO_2 felszabadulásának hiánya is alátámaszt (26. ábra). Az 1. hetet követően a „D” fermentorok CH_4 termelése nem állt helyre, sőt a 9. napot követően a H_2 felhasználása is hanyatlani kezdett, amit a 12. napon teljes leállás követett mind H_2 hasznosítás, mind CH_4 termelés tekintetében. A kisebb dózisu H_2 mennyiséget kapó reaktorok CH_4 termelésének hatékonysága is lecsökkent, annak ellenére, hogy a szerves szubsztrát a mikrobák rendelkezésére állt, és a 12. napot követően ez a hanyatlási folyamat felgyorsult, melynek indikátorai, a visszamaradó H_2 mennyiségének növekedése a reaktorok légterében, valamint a CO_2 felszabadulás hiánya. A legkisebb H_2 koncentráció mellett üzemelő reaktorok („B”) CH_4 termelése stabil volt hosszabb távon is, habár a hozzáadott H_2 által biztosított CH_4 többlet alig volt megfigyelhető, hiszen CH_4 termelése a H_2 -t nem kapó „A”-típusú reaktorokéval párhuzamosan fut. A naponta termelt CO_2 mennyiségében a különbség megfigyelhető volt, ami az aktív hidrogenotróf anyagcserét bizonyítja.

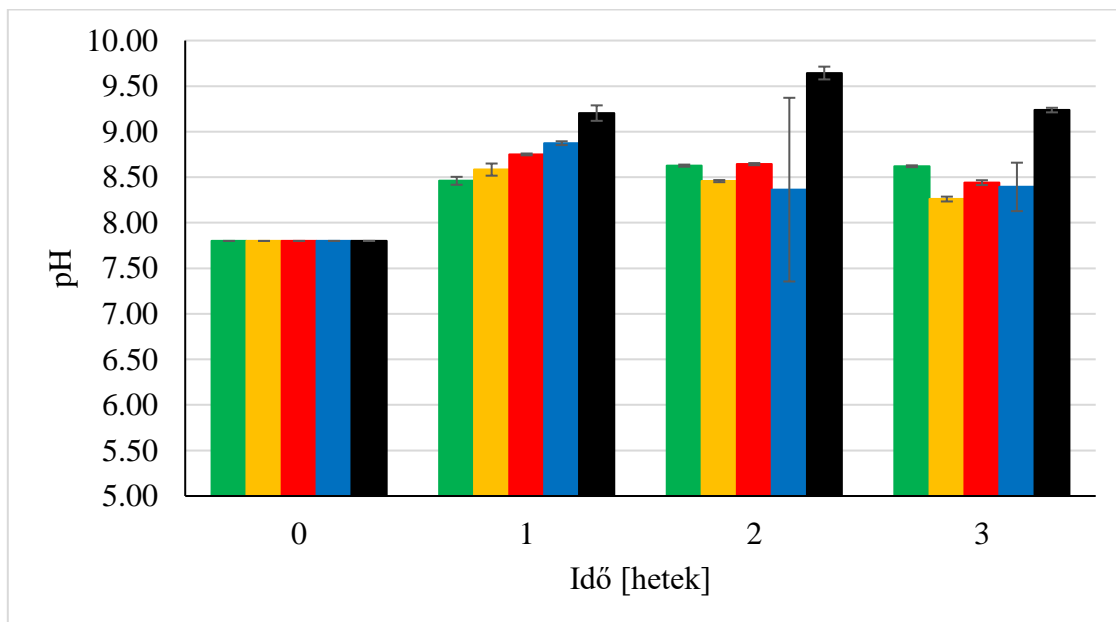


25. ábra: A termofil biogáztermelő közösség napi metántermelése (zöld: kontroll, sárga (A): kontroll + szubsztrát, piros (B): 20 ml+ szubsztrát, kék (C): 40 ml+ szubsztrát, fekete (D): 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát) és a visszamaradt H₂ mennyisége (kék szaggatott (C): 40 ml + szubsztrát, fekete szaggatott (D): 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát). A piros nyilak az α-cellulóz bevétel időpontjait jelzik.

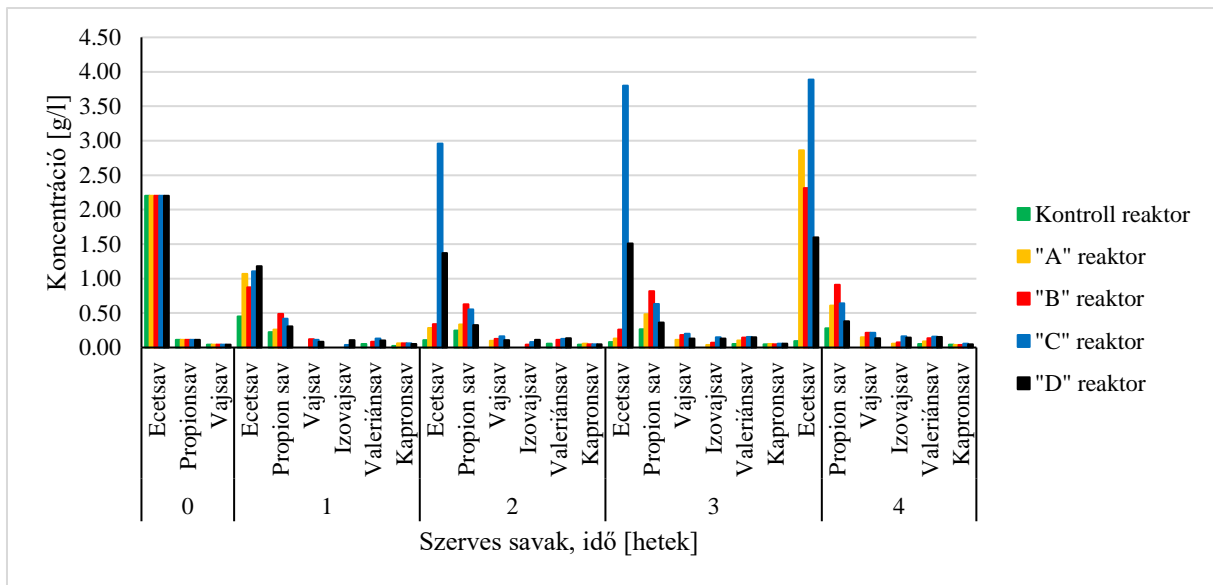


26. ábra: A fermentorok légtérének CO₂ tartalma (zöld: kontroll, sárga: kontroll + szubsztrát, piros: 20 ml+ szubsztrát, kék: 40 ml+ szubsztrát, fekete: 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát). A piros nyilak az α-cellulóz bevétel időpontjait jelzik.

A pH változását a hozzáadott H₂ és a hidrogenotróf metanogenezis aktivitása befolyásolta. Az első hetet követően lúgosodás volt megfigyelhető a fermentorokban, ami a felhasznált H₂ mennyiségének arányait követi (27. ábra). Az első héten a felhalmozódott szerves savak koncentrációja alacsony volt, így ez nem befolyásolta a pH-t (28. ábra). Azonban érdekes megfigyelni, hogy a „D” fermentorok, ahol az acetotróf metanogenezis már az 1. héten gátolt volt szintén alacsony szervessav mennyiséget mutattak. Ez feltételezi, hogy a gátlás nem csak az acetotróf metanogéneket érintette, hanem a szervessav képző baktériumokat is. A második hetet követően a „C” reaktorokban következett be jelentős változás, ahol jelentősebb pH csökkenés volt megfigyelhető, amit az acetotróf metanogenezis gátlása eredményezett, ugyanis ecetsav felhalmozódás figyelhető meg a reakcióelegyben. Az ecetsav mennyiségének további növekedése a fermentáció végéig az acetogén útvonalak életképességét bizonyították viszont az acetotróf metanogenezis teljes leállítását indikálta, amit korábban már a gázösszetétel analízis felfedezett (25. ábra). A többi reaktorban jelentős változások a pH-ban nem történtek, az irodalmi adatok által reprezentált tartományban (7,0-8,6) [85,86,193] található pH 8,5 körül állandósult, illetve a szerves savak koncentrációja is az optimális tartományon belül voltak, ami a fermentáció megfelelő működésére utalt.



27. ábra: A fermentorok pH-jának változása (**zöld:** kontroll, **sárga:** kontroll + szubsztrát, **piros:** 20 ml+ szubsztrát, **kék:** 40 ml+ szubsztrát, **fekete:** 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát).



28. ábra: A fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szerves sav-összetétel tekintetében (zöld: kontroll, sárga: kontroll + szubsztrát, piros: 20 ml+ szubsztrát, kék: 40 ml+ szubsztrát, fekete: 60 ml H₂ napi bevétel + szubsztrát).

Sajnálatos módon, ahogy a mezofil kísérlet esetében, termofil esetben is a magas H₂ parciális nyomás a konzorcium fontos részét képező acetotróf és acidogén mikrobák anyagcseréjét gátolta. A batch termofil rendszerhez képest a szakaszos szervesanyag-utánpótlás némileg elnyújtja a mikrobák anyagcseréjének lassulását, leállítását, azonban megakadályozni ezt nem tudta. A szervesanyag-utánpótlással az alacsony koncentrációban bejuttatott H₂ („B” reaktor) képes növelni a mikrobák CH₄ termelő aktivitását és csökkenteni a légtér CO₂ tartalmát. Ez a napi bevitt H₂ térfogat (532 mL L⁻¹ d⁻¹) korábban számos más kísérlet során alkalmazott optimális mennyiség volt, ami jól bemutatja a szerves szubsztrát utánpótlással is ellátott „PowertBioCH₄” alapú rendszerek toleranciatartományát. Mulat és társai U-¹³C jelölt és jelöletlen kukorica szubsztrát degradációját végezte H₂ jelenlétében (507 mL L⁻¹ d⁻¹) fed batch reaktorokban [193], míg két CSTR reaktorral végzett mérés esetében hasonló terhelés (510 és 550 mL L⁻¹ d⁻¹) volt hatékony, biogáz összetételének javítására alkalmas [85,86]. Annak ellenére, hogy a mikrobák anyagcseréje stabil maradt az alacsony H₂ parciális nyomás mellett, sajnos a hidrogenotróf metanogének CH₄-ná való átalakításának hatékonysága (39,63%) elmarad a mezofil konzorciumban mérttől és az irodalmi adatoktól is. Ezen adatok alapján in-situ biogáz összetétel javítása termofil körülmények között szakaszos szervesanyag-utánpótlással nem ajánlható.

5.3 Exogén H₂ és CO₂ hatása a PtBioCH₄ rendszerre

Ahogy a korábbi mérési eredményeimből kiderült, az exogén H₂ felhasználásának a keletkező biogáz összetételének javítására az egyik sarokpontja a CO₂ mennyiségének kimerülése és az ezzel összefüggő lúgosodás. Céлом az volt, hogy egy olyan rendszert hozzak létre, amely hosszútávon képes nagy mennyiségű H₂ felhasználásával a CO₂ redukciójára, ezzel bioCH₄ tisztaságú gázelegyet előállítani. A szakaszos szerves szubsztrát biztosította a CO₂ utánpótlást a hidrogenotróf metanogenezishez, de a H₂ magas parciális nyomása az acetotróf és acetotróf útvonalak leállítását eredményezte, így nagy mennyiségű H₂ hasznosítására nem alkalmas. Alternatív megoldásként jött szóba a CO₂ bevitele exogén forrásból, attól a fermentációs ponttól kezdve, hogy a fermentációs maradék szervesanyag-tartalmából felszabaduló CO₂ utánpótlása megszűnt. Ezzel a lépéssel biztosítom a hidrogenotróf metanogenezishez szükséges szénforrást és elejét veszem a savképző baktériumok anyagcsereje révén keletkező és az acetotróf metanogének anyagcserejének gátlása miatt a szerves savak felhalmozódásának.

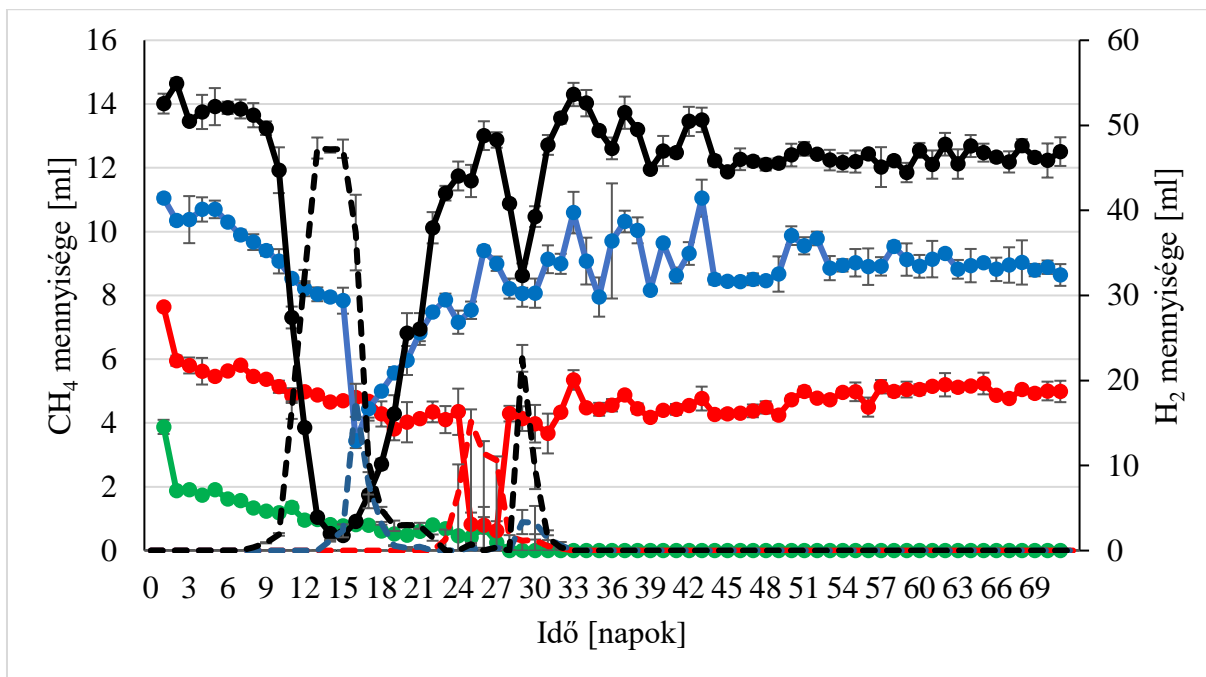
5.3.1 Mezofil rendszer

A korábban alkalmazott fed-batch napi H₂ beviteli rendszert alkalmaztam a fermentáció teljes ideje alatt (3. táblázat, 8. táblázat), szervesanyag-bevitel nélkül. Attól a ponttól kezdve, hogy a hidrogenotróf metanogenezis hanyatlásnak indul, exogén CO₂ bevitelével próbáltam meg a mikrobák H₂ hasznosítását és ezzel a CH₄ termelését helyreállítani. A CO₂ bevitele napi rendszerességgel történt a H₂-nel párhuzamosan, mennyiségét a hidrogenotróf mikrobák anyagcserejéhez igazítottam, úgy, hogy a keletkező gázelegy lehető legkisebb koncentrációban tartalmazzon a CH₄ mellett egyéb gázokat.

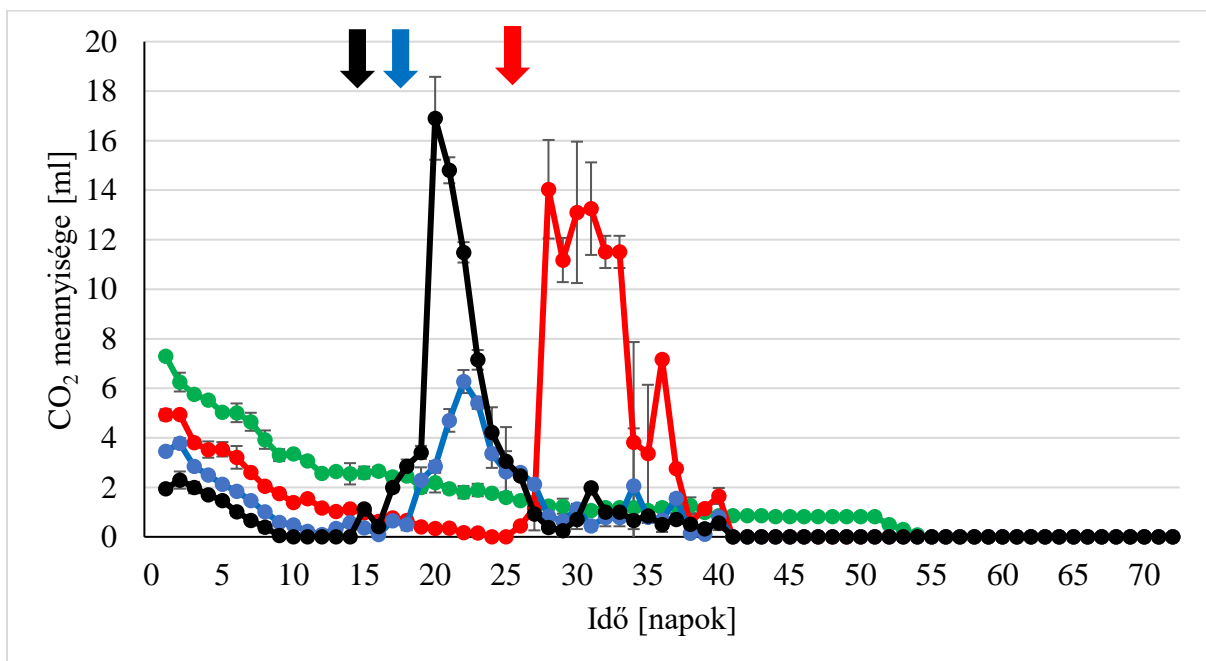
Reaktor típus	Naponta bevitt (elméleti) H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [ml] ^a	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [%] ^a	Naponta bevitt (visszamért) CO ₂ mennyisége [ml] ^b	Naponta bevitt (visszamért) CO ₂ mennyisége [%] ^b
Kontroll	0	0.00	0.00	0.00	0.00
"A"	20	17,42 ± 0,45	14.52	5,88 ± 5,81	4.90
"B"	40	33,96 ± 1,41	28.30	8,88 ± 6,13	7.40
"C"	60	51,23 ± 1,55	42.69	13,19 ± 6,15	10.99

8. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H₂ mennyisége (^anapi bevitel, ^ba CH₄ termelés leállítását követően adagolva).

A fermentáció első szakaszában a mikrobák anyagcseréje az 5.1.1-es fejezetben leírt batch kísérlet működésével megegyezett. A fermentorok mikroba közössége hatékonyan hasznosította a fermentációs maradék mobilizálható szervesanyag tartalmát és a rendelkezésre álló H_2 -t is maradéktalanul alakították a hidrogenotróf törzsek CH_4 -ná (29. ábra). A legnagyobb H_2 mennyiséget kapó reaktorok („C”) gátlása a 9., a közepes mennyiséggel működtetett fermentoroké („B”) 15., míg a legkisebb H_2 mennyiséget kapó reaktorok („A”) mikrobáinak 24. napot követően következett be és állt le a CH_4 termelése. A metanogenezis és a H_2 felhasználás leállításának észlelését követően exogén CO_2 adagolásával próbáltam a hidrogenotróf metanogének aktivitását helyreállítani (30. ábra). A CO_2 adagolás kezdetét követő első néhány napban a napi H_2 mennyiségéhez viszonyítva a hidrogenotróf metanogenezis sztöchiometrikus egyenleténél nagyobb CO_2 mennyiséget vittem be, amivel céloim a fermentáció közeg felborult karbonát/bikarbonát háztartásának helyreállítása volt. A fermentorok mikrobái pozitívan fogadták a változatlan mennyiségű napi H_2 mellett az exogén CO_2 bevitelét, aminek hatására a CH_4 termelése és a H_2 felhasználása is helyreállt. Ezt követően a napi CO_2 bevitelét lassan csökkenteni kezdtem, hogy megszabaduljak a légtérben visszamaradó CO_2 -tól és tiszta bio CH_4 -t kapjak fermentációs termékként. A napi CO_2 bevitel mennyiségének optimalizálása az először gátolt „C” és a „B” reaktor esetében a 28. napot követően, míg az „A” reaktorokban a 39. napon történt meg. Ezt követően a hidrogenotróf metanogének a rendelkezésükre álló H_2 -t és CO_2 -ot 100%-os hatékonysággal hasznosították és tiszta CH_4 -et állítottak elő belőle.

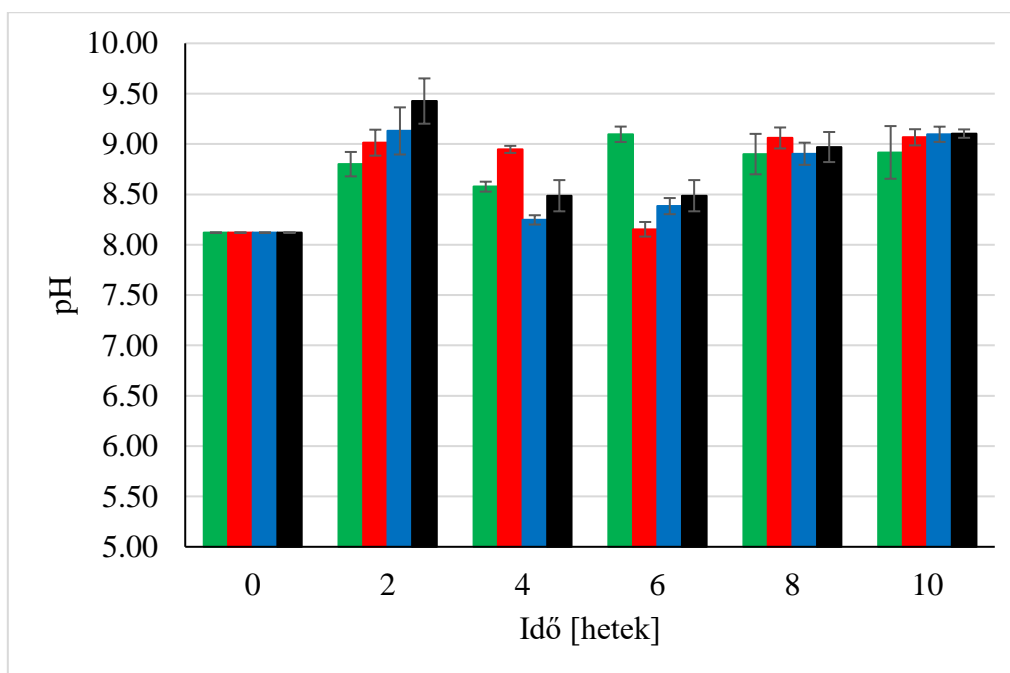


29. ábra: A mezofil biogáztermelő közösség napi metántermelése (zöld: kontroll, piros: 20 ml, kék: 40 ml, fekete: 60 ml H₂ napi bevétel) és a visszamaradt H₂ mennyisége (kék szaggatott: 40 ml, fekete szaggatott: 60 ml H₂ napi bevétel).



30. ábra: A fermentorok légtérének CO₂ tartalma (zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ napi bevétel), a CO₂ adagolás kezdetét jelző pontok az egyes fermentációk esetében (piros nyíl (A): 20 ml, kék nyíl (B): 40 ml, fekete nyíl (C): 60 ml H₂ napi bevétel).

A kezdeti pH változását a szervesanyag-utánpótlás hiánya miatt a hidrogenotróf metanogenezis által kiváltott lúgosodás vezérli. A 2. héten megfigyelhető, hogy a H₂ adagolás által okozott pH emelkedés mértéke megfelel, az egyes reaktorok légterébe bevitt H₂ mennyiségének (31. ábra). A 2-4. hét között a két legmagasabb H₂ bevittel működtetett fermentor („B”, „C”) légterébe már a CO₂ bevitel is történt, aminek kezdeti nagy mennyiségének köszönhetően jelentős pH csökkenés volt megfigyelhető a korábbi mérési ponthoz képest. A 4. hetet követően már az „A” reaktor légterébe is elkezdtem adagolni a CO₂-ot, így itt is megfigyelhető lett a pH csökkenése a 6. hétre. Ezt követően optimalizáltam a CO₂ bevitelét, úgy, hogy 24 órát követően ne lehessen visszamaradó CO₂-t detektálni, a hidrogenotróf mikrobák felhasználják a bevitt mennyiséget maradéktalanul. A kevesebb CO₂ bevitel csak a hidrogenotróf törzsek napi anyagcseréjéhez szükséges szénforrás fedezésére volt elegendő, a fermentációs maradék pH-jának jelentős befolyásolására nem, így újbóli emelkedés volt megfigyelhető a 8. hétre, ami a fermentáció végezetéig nem változott és a hidrogenotróf metanogén mikrobák számára még megfelelő ~pH 9,1-en állandósult, ami a szerves szubsztrát utánpótlás hiánya miatt az irodalmi értékeknél magasabb (pH 7,5-8,17) [85,145,194].



31. ábra: A fermentorok pH-jának változása (zöld: kontroll, piros: 20 ml, kék: 40 ml, fekete: 60 ml H₂ napi bevitel).

A szervessav-összetétel szerint mind az acetotróf metanogenezis mind az acetogenezis a 4. hétig aktív maradt, amit a jelentősen nem változó 0,5-0,8 g/l-es ecetsav szint bizonyít (47. ábra, függelék). A hosszú szénláncú szerves savak mennyiségének növekedése sem jellemző. A 6.

hetet követően az ecetsav koncentrációja mind a három H₂-nel táplált reaktorban emelkedni kezdett, ami az acetotróf metanogenezis gátlásának jele. A reaktorokban megfigyelhető ecetsav koncentrációja összhangban van a bejuttatott H₂ és ezzel összekapcsolt gátlás mértékével. A legmagasabb ecetsav-koncentráció a legnagyobb H₂ adagolású reaktorokban volt megfigyelhető, ahogy a H₂ mennyisége csökken, úgy az ecetsav koncentrációja is. A fermentáció ezt a tendenciát követi a fermentáció végéig. Jelentős szervessav koncentráció emelkedés és gátló mennyiségű szervessav felhalmozódás a továbbiakban nem volt megfigyelhető.

A fermentációs maradék mikroba közösségének H₂ felhasználási és CH₄ termelési hanyatlása az exogén forrásból bevitt CO₂ segítségével visszafordítható folyamat. A CO₂ bevitele nem csak a hidrogenotróf metanogének számára biztosítja a szükséges szénforrást, de oldott formában, karbonátok, bikarbonátok savas kémhatása által kompenzálja a lúgosító folyamatokat és a mikrobák számára fenntartja a megfelelő pH tartományt. Mezofil körülmények között a H₂/CO₂ napi bevitelének összehangolásával egy olyan rendszert biztosít számunkra a fermentációs maradék mikroba közössége, amellyel közel 100%-os tisztaságú bioCH₄ állítható elő. A bejuttatott H₂-t a hidrogenotróf metanogének 90% feletti hatékonysággal alakították CH₄-ná (13. táblázat, függelék). A kísérlet bizonyította, hogy ezzel a rendszerrel hosszútávon, 70 napon túl is működő fermentációs közösség hozható létre szerves szubsztrát bevitele nélkül. Mezofil CSTR reaktorok segítségével Kim és munkatársai 92%-os [195] Wang és munkatársai 90-99%-os [194], Bassani és munkatársai 88,9%-os [85] CH₄ tartalmat értek el. Fixed-bed reaktorok segítségével ~90% CH₄ tartalmat és retenciós időtől függően akár 100%-os H₂ átalakítási hatékonyságot értek el Lee és munkatársai [196], míg trickle-bed reaktorok segítségével 96% alatti hatékonyság volt elérhető [145]. Egyszerű és a bemutatottnaknál sokkal olcsóbb rendszerünk a legújabb technológiákkal összehasonlítva is versenyképes lehet a bioCH₄ képzésre mezofil fermentációs maradék mikrobáinak segítségével.

Összességében ipari körülmények között is alkalmazható eljárás lehet, hiszen a biogáz tisztítása során keletkező magas CO₂ tartalmú gázelegyet használva, további CH₄ termelés elérhető úgy, hogy az üvegházhatású, káros CO₂-ot használunk szénforrásként.

5.3.2 Termofil rendszer

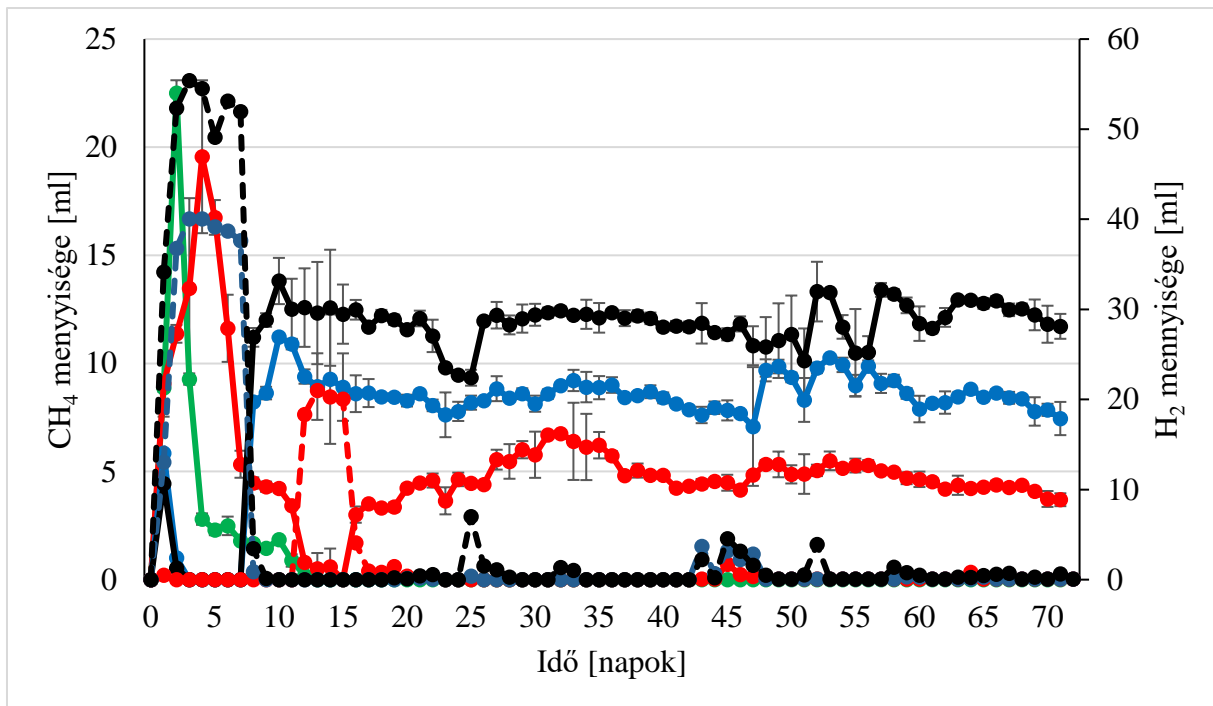
Az 5.3.1-es fejezetben bebizonyosodott, hogy CO₂ adagolás segítségével a H₂ adagolás, és a szerves szubsztrát bevitel által kiváltott negatív körülmények elkerülhetőek és a jó

hatékonyságú, nagyon magas CH₄ tisztaságú gázelegy átalakítására alkalmas a mezofil fermentáció maradék mikrobaközössége. Ebből kiindulva fontos volt megvizsgálnom, hogy termofil körülmények között, gyorsabb mikrobiális anyagcsere-folyamatokkal javítani lehet-e a PtBioCH₄ rendszer hatékonyságán, vagy a gyorsabb enzimaktivitás nehezebben kezelhetővé teszi a rendszert (3. táblázat, 9. táblázat)

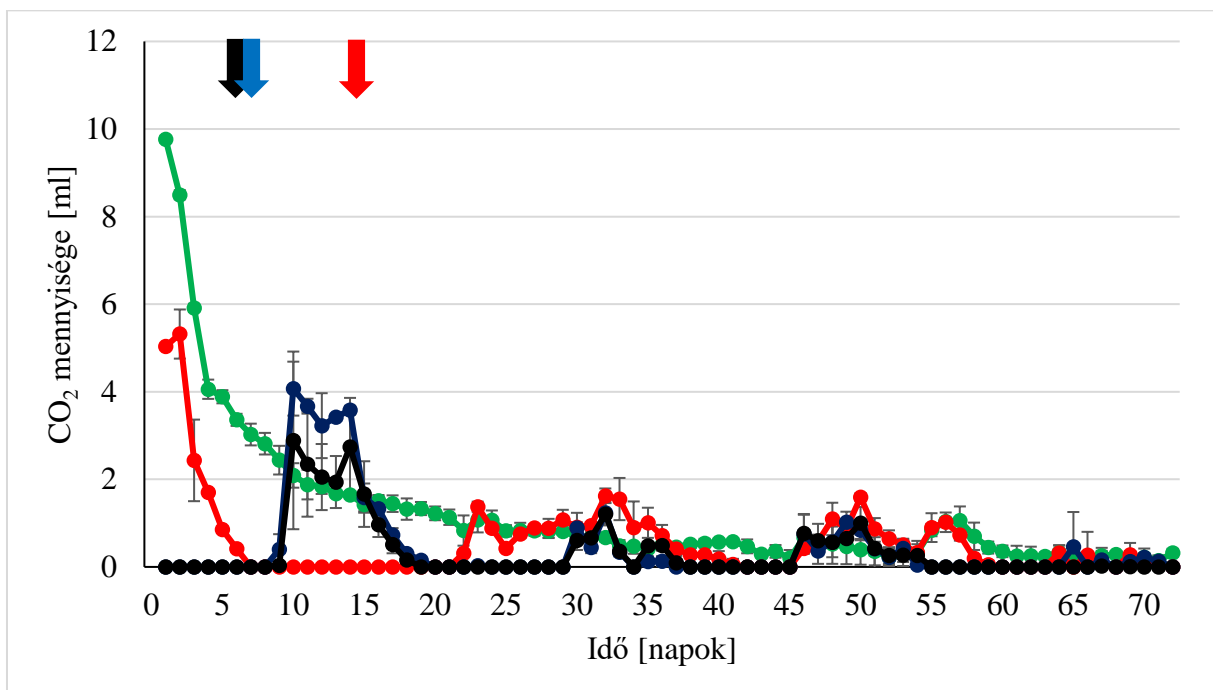
Reaktor típus	Naponta bevitt (elméleti) H ₂ mennyisége [ml]	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [ml] ^a	Naponta bevitt (visszamért) H ₂ mennyisége [%] ^a	Naponta bevitt (visszamért) CO ₂ mennyisége [ml] ^b	Naponta bevitt (visszamért) CO ₂ mennyisége [%] ^b
Kontroll	0	0.00	0.00	0.00	0.00
"A"	20	21,61 ± 2,87	14.52	3,73 ± 0,77	4.90
"B"	40	37,82 ± 2,05	28.30	6,55 ± 1,24	7.40
"C"	60	52,24 ± 1,82	42.69	9,85 ± 1,87	10.99

9. táblázat: A fermentorok légterébe naponta beadagolt H₂ mennyisége (^anapi bevétel, ^ba CH₄ termelés leállását követően adagolva).

Rögtön a fermentáció elején megfigyelhetővé vált, hogy szerves szubsztrát bevétel nélkül a mikroba közösség nagy sebességgel felhasználta a rendelkezésre álló CO₂ mennyiséget, ami intenzív H₂ bevétel mellett („B”, „C” fermentáció) rögtön a CH₄ termelés leállását eredményezte (32. ábra, 33. ábra). Ennek következtében már az első hetet követően el kellett kezdenem a napi CO₂ bevittet is, aminek kezdeti nagy mennyiségű bevittelével a H₂ felhasználás és a CH₄ termelése is az elvárt szintre emelkedett. A fermentációs folyadék oldott karbonát/bikarbonát szintjének helyreállítását követően a CO₂ bevittet a „B” és „C” fermentorokba a sztöchiometrikus mértékhez csökkentettem a H₂ bevittnek megfelelően. Azonban az első hetet követően a CO₂ mennyiségének rohamos fogyása a legkisebb H₂ bevittel működtetett reaktorokban („A”) figyelmeztető jele volt a metanogenezis leállítására. A 7. napot követően nem volt visszamérhető CO₂ a reaktorok légterébe, aminek oldott tartalékai a 10. napig voltak elegendőek, majd a hidrogenotróf metanogenezis leállt. A CO₂ adagolás megkezdése ezekben a fermentorokban is hamar helyreállította a mikrobák CH₄ termelését és a H₂ felhasználását. Innentől mindhárom fermentáció esetében hatékony és folyamatos CH₄ termelés volt megfigyelhető, habár a termofil mikrobák nagyobb érzékenysége és a gyorsabb anyagcsere folyamatok miatt a rendszer stabil működésének fenntartása sokkal nagyobb odafigyelést és rendszeres közbeavatkozást igényelt.

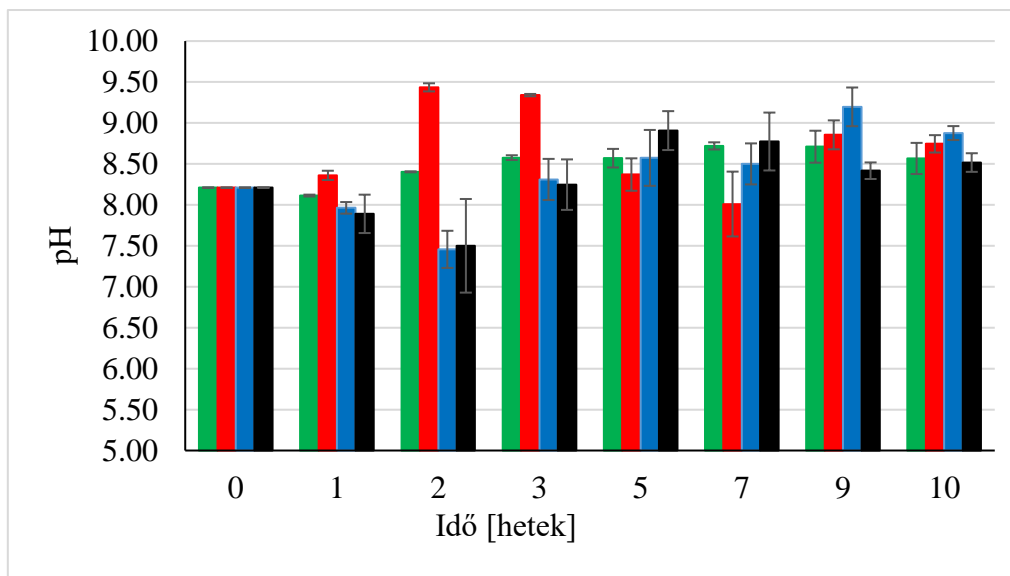


32. ábra: A termofil biogáztermelő közösség napi metántermelése (zöld: kontroll, piros: 20 ml, kék: 40 ml, fekete: 60 ml H₂ napi bevétel) és a visszamaradt H₂ mennyisége (piros szaggatott: 20 ml, kék szaggatott: 40 ml, fekete szaggatott: 60 ml H₂ napi bevétel).



33. ábra: A fermentorok légtérének CO₂ tartalma (zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ napi bevétel), a CO₂ bevétel kezdetét jelző pontok az egyes fermentációk esetében (piros nyíl (A): 20 ml, kék nyíl (B): 40 ml, fekete nyíl (C): 60 ml H₂ napi bevétel).

A fermentáció során végbement változások a pH-ban és a szerves sav-összetételben szorosan összefonódtak. Az első hetet követően megfigyelhető volt, hogy a leggyorsabban gátolt két reaktorban („B”, „C”) csökkent a pH a kiindulási ponthoz képest, míg a legalacsonyabb H₂ bevétel mellett funkcionáló közösségben („A” reaktor) a pH emelkedett (34. ábra). Ennek magyarázata, hogy az „A” reaktorban a hidrogenotróf metanogenezis az első hetet követően is működött, azonban a légtér CO₂ koncentrációjának csökkenése utalt a fermentációs elegy karbonát/bikarbonát szintjének csökkenésére, ami ellensúlyozta a hidrogenotróf anyagcsere által kiváltott lúgosodást (34. ábra). A „B” és „C” fermentorokban pH csökkenést figyeltem meg, amire magyarázatot a szerves sav-összetételben találtam meg, hiszen a magas H₂ parciális nyomás kezdettől fogva gátolta az acetogén és acetotróf mikrobákat. A kontrol és az „A” reaktorral szemben, ahol gyakorlatilag szerves sav felhalmozódás nem volt megfigyelhető, ezekben a fermentorokban 0,5 g/l felett ecetsav koncentrációt mértem, ami az acetogenezis megfelelő működésére utal (48. ábra, függelék). Az emelkedett ecetsav koncentráció és a hidrogenotróf metanogenezis gátlása lúgosodást eredményezett, emiatt mértem alacsonyabb pH-t a „B” és „C”-típusú reaktorokban. A második hétre a nagy mennyiségű hozzáadott CO₂ hatására további csökkenés volt megfigyelhető ezekben a mikrobaközösségekben (pH 7,46, pH 7,5) (34. ábra). Eközben a CH₄ termelés leállása és a légtér CO₂ tartalmának kimerülése, valamint a szerves savak nagyon alacsony koncentrációja az „A” fermentáció erős lúgosodását eredményezte (pH 9,44) (32. ábra, 33. ábra, 34. ábra). A 2. hetet követően már mind a 3 fermentorban a napi bevitt CO₂ mennyiségét az alapján szabályoztam, hogy a lehető legtisztább CH₄ tartalmú gázelegyet kapjam, így a fermentáció hátralevő részében jelentős változások a pH-ban, valamint szerves sav-összetételben sem voltak megfigyelhetők. A rendszer az irodalmi adatoktól (pH ~8-8,5) [85,86,108] némileg magasabb pH 8,5-9 közötti értékeken stabilizálódott, a szerves savak koncentrációja 0,1 g/l alatt maradt.



34. ábra: A fermentorok pH-jának változása (zöld: kontroll, piros: 20 ml, kék: 40 ml, fekete: 60 ml H₂ napi bevétel)

Mezofil körülmények között már bizonyítottam, hogy H₂ és CO₂ bevétel segítségével hosszútávon hatékony CH₄ termelés érhető el a biogáz reaktor fermentációs maradékából származó kevert mikroba közösséggel. Termofil körülmények között, ugyanez szintén megvalósítható, habár a bevitt H₂ átalakítási hatékonysága kezdetben elmaradt a kimagasló 90% feletti mezofil körülmények között mért értékektől (13. táblázat, 14. táblázat, függelék). A fermentáció teljes idejét figyelembe véve, a termelt bioCH₄ CH₄ tartalma 64,97-73,43% között ingadozott az instabil működési szakaszban a nagymennyiségű fel nem használt H₂ mennyisége miatt (18,14-32,97%). A stabilizációt követően a fermentáció steady-state szakaszában a légtér összetételének már a 87,48-95,48%-át tette ki a CH₄. Szintén fed-batch alapú H₂-nel táplált reaktorokkal Mulat és társai [193] 89,4%-os tisztaságú bioCH₄-t értek el. A H₂ folyadékfázisba oldódásának elősegítése érdekében alkalmazott CSTR reaktorokban 85,1-86,4% CH₄ tartalom volt elérhető [85,86]. A CH₄ koncentrációja UASB és trickle bed reaktorok segítségével tovább növelhető, hiszen ebben az esetben a gázelegy recirkulálásával lehetőség nyílik a H₂ beoldódásának fokozására. Corbellini és társai CSTR reaktorban egy UASB reaktoron érte el a 91%-os CH₄ tartalmat [86]. Bassani és társai diszperziós kerámia szivacsok segítségével „porlasztva” injektálták a H₂-t az UASB reaktorokba és 94-96%-os CH₄ tartalom volt a legmagasabb mért érték [138]. Még az UASB reaktoroknál is magasabb H₂ átalakítási hatékonyságot értek el a trickle-bed, fixed bed reaktorokban (98-98,24%) [145,197], a megnövelt immobilizált érintkezési felület segítségével. Megjegyzendő, hogy a fenti reaktor

típusok bekerülési és üzemeltetési költségei a meglehetősen összetett reaktor konfiguráció miatt jelentősen meghaladják az általam alkalmazott, egyszerű reaktorok költségeit.

A mikrobák gyorsabb anyagcserefolyamatai, illetve a H₂ rosszabb oldékonysága magasabb hőmérsékleti tartományban megnehezítik a folyamat finom beállítását. Hatékonyság és kezelhetőség szempontjából a mezofil hőmérséklet tartományú és mikroba összetételű fermentációs maradék bizonyult kedvezőbbnek és minthogy az iparban is a mezofil biogáz erőművek elterjedése a gyakoribb, ezért kivitelezés és üzembiztonság szempontjából is a mezofil rendszereket tartanám kedvezőbbnek.

5.4 A hidrogén adagolásának hatása a fermentációs maradék mikroba konzorciumára

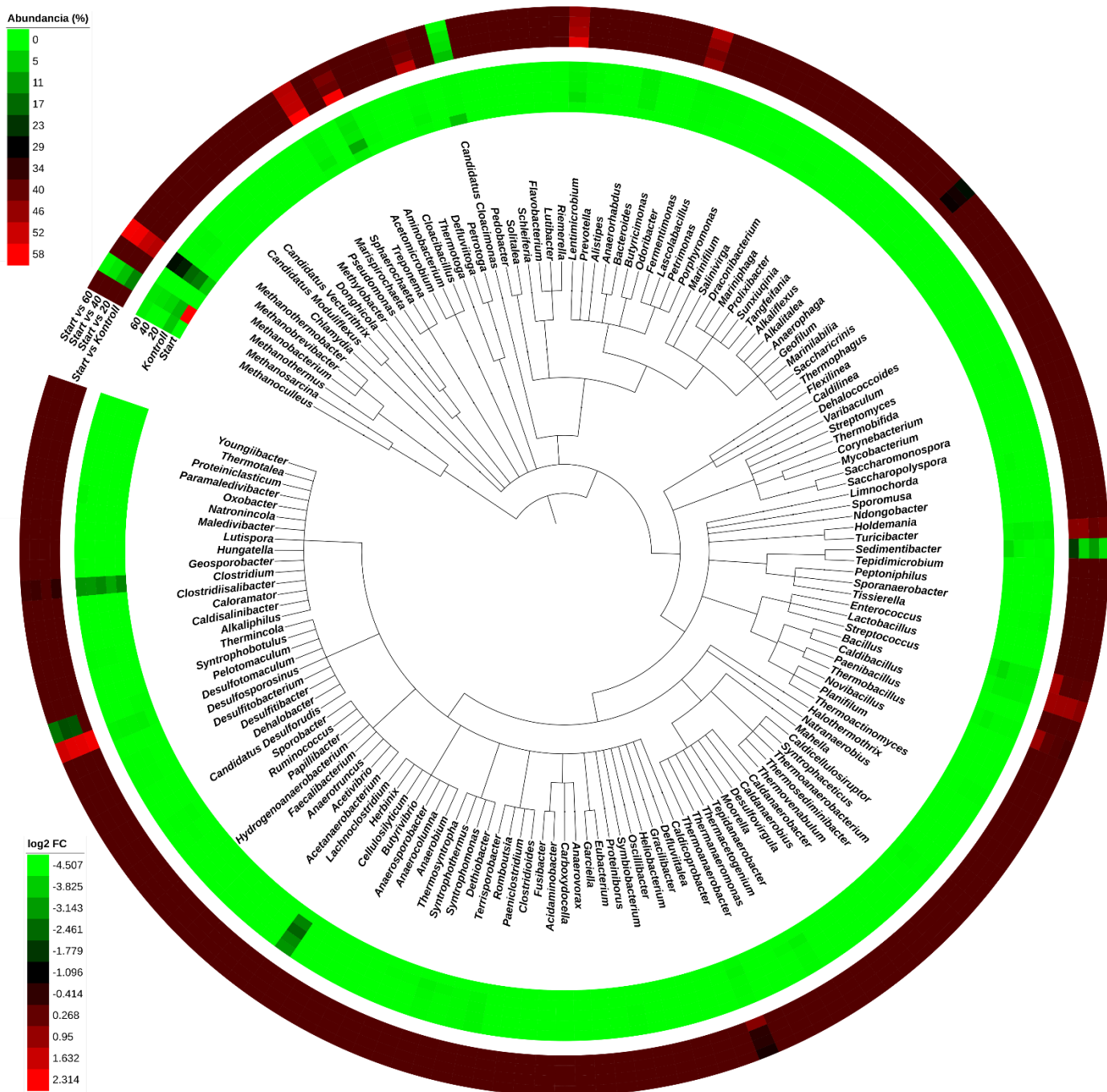
5.4.1 Mezofil rendszer

Az 5.3.1-es fejezetben végzett kísérletek mikrobiális változásait követtem nyomon, amely során a fermentációs maradékban végbemenő változásokat vizsgáltam a mikroba-összetétel nyomon követésével. A mezofil fermentációs maradék összetétele, a forrásként használt mezofil ipari biogáz erőmű által működtetett reaktor mikrobaközösségét reprezentálja. A fermentációs folyadékban a *Bacteria* és az *Archaea* domén legjelentősebb nemzetségeit vizsgáltam. A kezdeti mikrobaközösség legdominánsabb nemzetsége a *Methanosarcina* volt (58,2%) (35. ábra). A *Methanosarcina* nemzetségbe tartozó fajok jellemzően a leggyakoribb mezofil metanogén csoportja a biogáz reaktoroknak, mivel a metanogenezis mindhárom anyagcsere útvonalának megvalósítására képesek. Habár hidrogenotróf és metilotróf metanogén törzsek is előfordulnak biogáz termelő közösségekben a *Methanosarcina*-k leggyakrabban mégis acetotróf anyagcserét folytatnak. A binelés eredményeként azonosított *Methanosarcina* fajok (*M. barkeri*, *M. acetivorans*, *M. horonobensis*, *M. mazei*, *M. siciliae*) fajok mindegyike acetotróf útvonalat részesíti előnyben energianyerő folyamataikhoz (36. ábra)[73,198]. A friss fermentációs maradék optimális szervesanyag tartalommal biztosította a savképző baktériumok számára (pl. *Clostridium*, *Sedimentibacter*) a szükséges szubsztrátot, így az acetogenezis által előállított szerves savak tápanyagforrással látják el az acetotróf metanogén mikrobákat (35. ábra). A *Methanosarcina*-kat gyakoriságban a *Clostridium* nemzetség követte, amelyek 13,9%-os relatív gyakorisággal voltak jelen a fermentációs maradékban. A *Clostridium* nemzetség képviselői a zsírsavak, aminosavak, szénhidrát monomerek, -

oligomerek degradációjával állítanak elő illékony szerves savakat, ezzel a biogáz termelő közösségben tápanyagot szolgáltatnak az acetotróf metanogének számára [58,73,199]. Szintén a szerves savak képzésében vesznek részt a *Sedimentibacter* képviselői (3,9%), amelyek aminosavak (pl.: valin, leucin, triptofán, lizin, arginin, stb.), piruvát és melezitóz átalakításával állítanak elő indol vegyületeket, szulfidot valamint szerves savakat (pl. ecetsav, propionsav, vajsav) [200]. A fermentációs maradék elsődleges lebontásáért a hidrolizáló mikrobaközösségek felelősek, amelyek leggyakoribb képviselői a *Herbinix* (12,4%) és az *Acetomicrobium* (2%) nemzetség voltak. A *Herbinix* nemzetség baktériumai poliszacharidok (cellulóz), oligo-, és monoszacharidok fermentációját végzik, termékként etanolt, ecetsavat, vajsavat és kis mennyiségben propionsavat képeznek H₂ felszabadulás mellett [201,202]. A binelés eredménye alapján az általam alkalmazott fermentációs maradékban *Herbinix luporum* fordult elő, amely elsődleges szubsztrátként a könnyebben degradálható glükózt, arabinózt, mannózt és oldott keményítőt fermentál etanollá, ecetsavvá és vajsavvá (36. ábra)[202]. Az *Acetomicrobium* nemzetség fajai főleg termofil körülmények között fordulnak elő és szénhidrátok (arabinóz, xilóz, ribóz) fermentációja során képeznek etanolt és ecetsavat [203]. Jelentősebb mennyiségben fordulnak elő a fermentációs folyadékban a *Candidatus Cloacimonas* képviselői (6,8%), amelyek szintrófikus anyagcseréjük révén H₂ és CO₂ előállításánál képesek propionsav hasítására [204,205]. 5,9%-os relatív gyakorisággal volt jelen a metanogén *Methanobacterium* nemzetség a közösségben, amely mikrobái a hidrogenotróf útvonalat használják energianyerő folyamatként, CO₂-ot redukálják H₂ segítségével CH₄-ná. Habár a legtöbb mikroba ebben a nemzetségben valóban az autotróf útvonalat képviseli, előfordulnak közöttük propionsav-hasznosító fajok is [136,206,207].

A fermentáció során a fermentációs paraméterek jelentősen különböztek a hagyományos, biogáz erőműben alkalmazott körülményektől, ezért a mikrobaközösség is jelentős változásokon ment keresztül. Legfontosabb eltéréseket a szerves szubsztrát bevitelének teljes hiánya, valamint a napi rendszerességgel bejuttatott változatos mennyiségű H₂ és CO₂ jelentette. A legjelentősebb változások a *Bacteroides* (log₂FC: 7,4) és a *Romboutsia* (log₂FC:7) nemzetségekben mentek végbe (35. ábra). Mindkét nemzetség fajai elsődlegesen a polimer bontásáért felelősek. A *Bacteroides*-ek anyagcseréje igen változatos elsősorban tejsavat, cellulózt, keményítőt hasítanak és szénhidrát monomereket, szerves savakat állítanak elő, míg a *Romboutsia* képviselői glükózt, maltózt, fruktózt, trehalózt és szorbitolt hasznosítanak és etanolt valamint illékony szerves savakat (ecetsav, izo-vajsav, izo-valeriánsav) állítanak elő [73,208]. Mindkét nemzetség esetében azonban óvatosan kell kezelni a nagymértékű relatív gyakoriság növekedést, hiszen relatív gyakoriságuk átlagos értéke a H₂-nel táplált reaktorokban

1,7% (*Bacteroides*), 1,3% (*Romboutsia*). Ezért relatív gyakoriságuknak változását a nagyon alacsony kezdeti mennyiségük eredményezte. Hasonlóan alacsony kiindulási gyakoriság miatt történt jelentősebb növekedés a *Desulfotomaculum* (log₂FC:1,9), *Sphaerochaeta* (log₂FC:1,4) és a *Lentimicrobium* (log₂FC:1) nemzetségeiben, hiszen relatív gyakoriságuk 1,7% alatt található a reaktorokban. *Sphaerochaeta*, *Lentimicrobium* képviselői szintén poliszacharidok degradációja által jutnak energiához és termékként illékony szerves savak keletkeznek [209–211]. *Desulfotomaculum*-ok szerves savakat (pl.: hangyasav, propionsav, piruvát, malát, szukcinát), szerves oldószereket (pl.: metanol, etanol, butanol, oktanol), valamint H₂-t és CO₂-ot használnak szubsztrátként. A szerves komponensek degradációja során végtermékként legtöbb esetben CO₂ keletkezik, de rövidebb szénláncú szerves savak is előfordulnak a termékek között. *Desulfotomaculum* nemzetség fajainak jellemző tulajdonsága a szulfát, szulfid és tioszulfidok alkalmazása elektron akceptoroként anyagcsere folyamataik során [212,213]. A legfontosabb relatív gyakoriság növekedésen a hidrogenotróf metanogén *Methanobacterium* nemzetség mikrobái mentek keresztül. Nemcsak a változás mértéke figyelemre méltó (log₂FC: 1,9), hanem mindez számottevő kiindulási gyakoriságból (5,9%) indult ki és a fermentáció végére a H₂-nel táplált reaktorokban átlagosan 23,6%-ra emelkedett. Sőt, az is megfigyelhető, hogy a H₂ bevitel mennyiségének növekedésével a *Methanobacterium*-ok relatív gyakorisága is emelkedett, így a 60 ml H₂-nel táplált reaktorban 27,7%-ot ért el gyakoriságuk. Azonban a H₂ nem csak pozitív irányú változásokat indukált a mikrobaközösség összetételében, hiszen számos törzs anyagcsere folyamatait gátolja a magas H₂ parciális nyomás, illetve a fermentáció végére a szerves szubsztrát mennyisége is minimálisra csökkent. A legjelentősebb relatív gyakoriság csökkenésen a *Candidatus Cloacimonas* (log₂FC: -4,3), a *Methanosarcina* (log₂FC: -4,1), a *Sedimentobacter* (log₂FC: -3,7) és a *Clostridium* (log₂FC: -2,3) nemzetség mikrobái mentek keresztül. A felsorolt nemzetségek fajai anyagcseréjük révén vagy az acetogének vagy az acetotrófok közé sorolhatók, amelyek korábbi eredmények alapján is érzékenyek a H₂ jelenlétére, így relatív gyakoriságuknak visszaszorulása a „PtBioCH₄” alapvető működésének következménye, a fentmaradó konzorcium életképességére nem volt hatással [13,164].

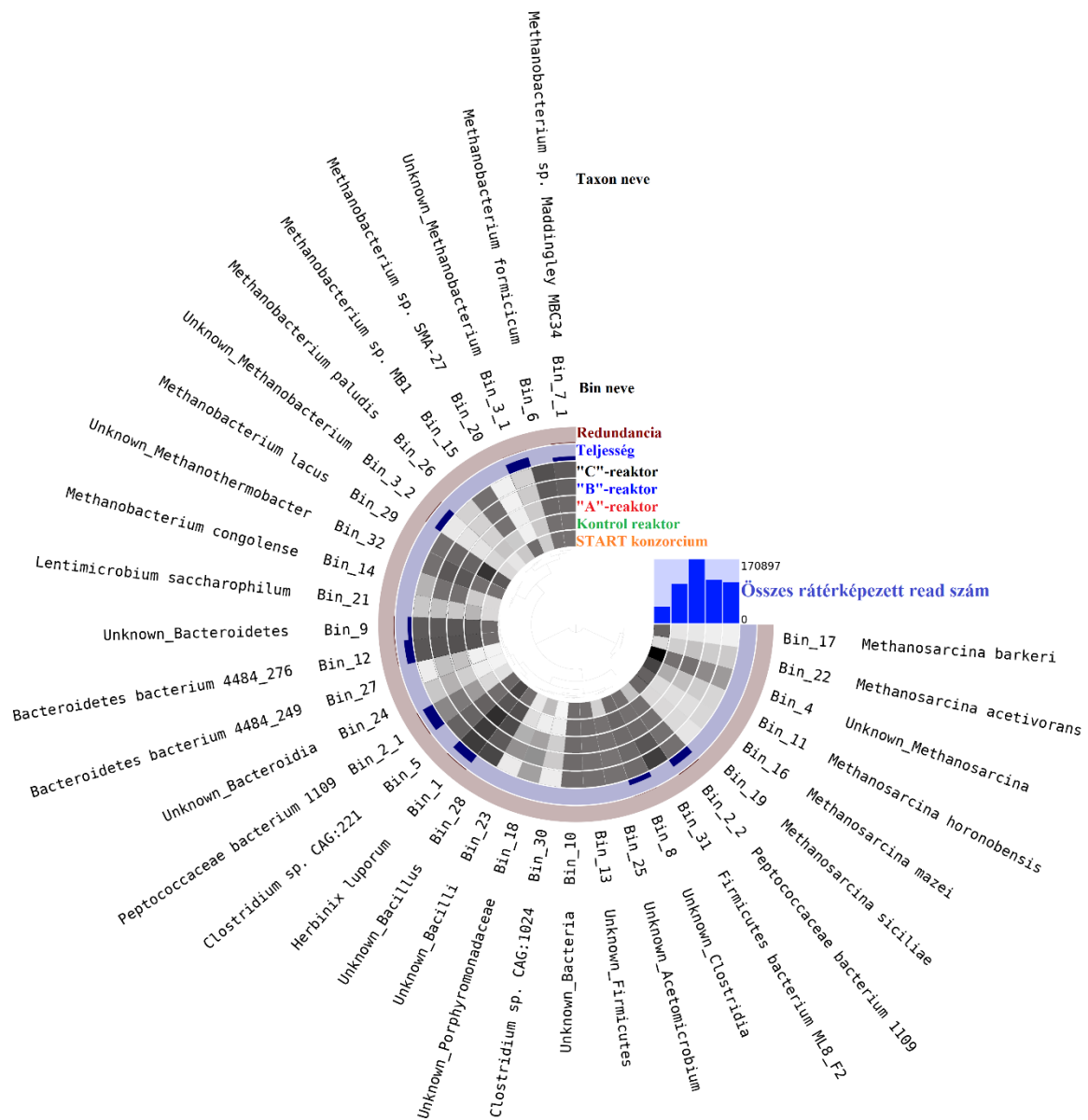


35. ábra: A fermentációs maradék mikrobaösszetételének változása a fermentáció során mezofil körülmények között. Az ábra legbelső részében a mikrobák taxonómiai fája található, melynek végén az előforduló nemzetségek nevei olvashatók. Az ezt követő íven a különböző nemzetségek reprezentáltsága figyelhető meg a fermentáció egyes mintáiban. A legkülső íven a különböző nemzetségek változásának iránya és mennyisége van ábrázolva a fermentáció kezdeti mikrobaösszetételéhez viszonyítva (\log_2FC).

A genomcentrikus elemzések eredményei nagy hasonlóságot mutattak a leolvasás alapú eredményekkel. A fermentációs maradék kiindulási mikrobaösszetételéből összeszerelt binék között a *Methanosarcina* és *Herbinix* nemzetségek fajai voltak nagy mennyiségben

megtalálhatók (36. ábra). *Methanosarcina horonobensis* (6%), *M. mazei* (2,6%), *M. barkeri* (2,4%), *M. siciliae* (2,1 %) és egy azonosítatlan *Methanosarcina* faj (13,4%) voltak a leggyakoribb metanogén *Archaea* képviselők. A mezofil fermentációs maradék fajgazdagságát jól jellemzi, hogy az említett *Methanosarcina* nemzetség képviselőin kívül a *Herbinix luporum* (5,8%) és *Peptococcaceae bacterium 1109* (3,6%) genomként azonosított bin relatív gyakorisága haladta meg a 2%-ot.

A H₂ adagolásának hatására a *Methanosarcina*-k száma csökkent a legjelentősebben (log₂FC: -3,9). A *Methanosarcina* nemzetség gyakoriságának visszaszorulásának oka a szerves szubsztrát utánpótlásának hiánya, aminek hatására a *Methanosarcina*-k tápanyag forrásául szolgáló szerves savak utánpótlása elapadt, valamint a magas H₂ parciális nyomás gátolja az acetotróf anyagcsere-útvonalat. A legjelentősebb növekedés a *Methanobacterium* (log₂FC: 1,4) és a *Lentimicrobium* (log₂FC: 1,5) nemzetségek átlagos relatív gyakoriságának növekedésébe figyelhető meg. Az iparban alkalmazott biogáz fermentációs körülményektől jelentősen eltérő körülményeket teremttem a H₂ és CO₂ bevitelével, mint kizárólagosan utánpótlott szubsztrát forrás. A legnagyobb mennyiségben bejuttatott H₂ a *Methanobacterium formicicum* (relatív gyakoriság: 4,5%) és egy azonosítatlan *Methanobacterium* faj (6,7%) számára kedvezett leginkább, amelyek hidrogenotróf energianyerő folyamataik révén a folyamatosan rendelkezésre álló szénforrást, a CO₂-ot H₂ segítségével CH₄-ná redukálják [104]. A *Lentimicrobium saccharophilum* egy szénhidrát bontó mikroba, amelynek relatív gyakoriságának növekedése a mikrobák H₂ toleranciájából adódik [211]. A H₂, mint szelekciós paraméter volt jelen a közösségben, így a polimer degradáló mikrobák közül *Lentimicrobium saccharophilum* volt képes felszaporodni a rövid ideig elérhető szerves szubsztráton, habár alacsony gyakorisága (0,9%) a fermentáció végén jelzi a szerves szubsztrát utánpótlásának hiányát.



36. ábra: A mezofil fermentációs maradék genomcentrikus mikroba összetételének változása fermentáció ideje alatt. Az ábra belsejében egy dendrogramm látható, mely az egyes binek egymáshoz való hasonlóságát tükrözi tetranukleotid szekvenciájuk alapján. A következő gyűrűkön az egyes binek lefedettsége látható az adott mintában (a sötétedés mértéke a lefedettség mértékével arányos). Efölött található az egyes binek minőségi értékei (teljesség, redundancia), majd a binek neve és taxonómiai besorolásuk látható.

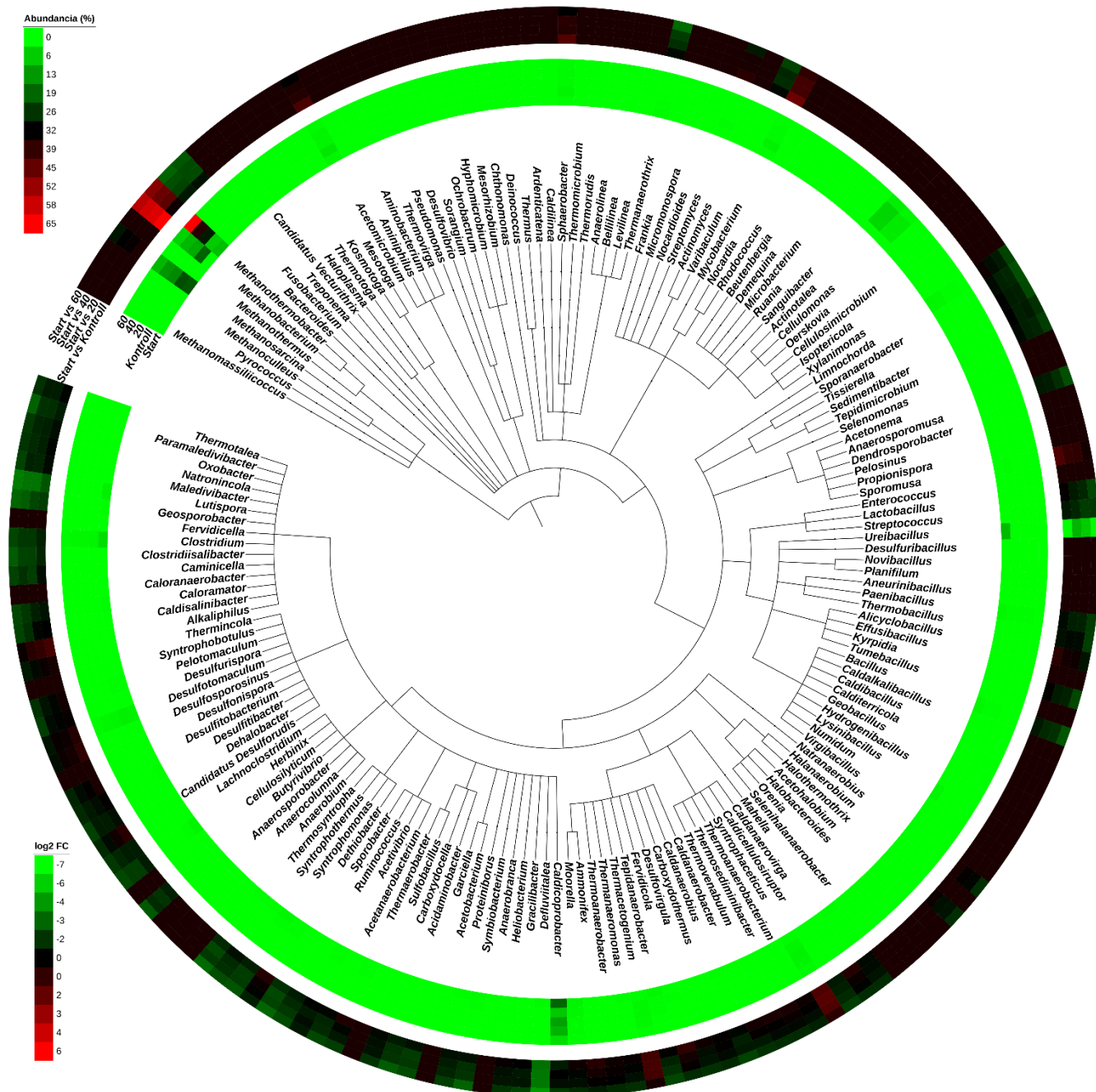
5.4.2 Termofil rendszer

Az 5.3.1 és az 5.3.2 fejezet eredményei alapján jelentős különbségek figyelhetők meg a két különböző eredetű fermentációs maradék mikrobáinak anyagcsere-folyamatai között és a két

különböző hőmérséklet-tartományban végzett fermentáció eltérő kezelést igényel. Ezek alapján a PtBioCH₄ reakció katalizátoraként alkalmazott fermentációs maradék kezdeti és fermentáció végi mikrobaösszetétele is nagyban eltér egymástól. A termofil reakcióközeg leggyakoribb mikroba nemzetsége is a *Methanosarcina* volt (21,7%) (37. ábra). *Methanosarcina*-k ecetsav hasítása során nyernek energiát, amelynek melléktermékeként acetotróf útvonalon CH₄ keletkezik. A *Cladicoprobacter* nemzetség 19,9%-os relatív gyakorisággal volt jelen a fermentációs folyadékban. A *Cladicoprobacter*-ek hidrolizáló baktériumok, amelyek a szénhidrát (pl.: arabinóz, xilóz, ribóz, fruktóz) lebontásban vesznek részt, amelynek eredményeként biomasszát és ecetsavat, tejsavat, CO₂-ot és H₂-t állítanak elő [214]. 9,1%-os relatív gyakoriságot képviselnek az *Ureibacillus*-ok, amik összetett polimerek mellett ureát, eszkulint használnak fel energianyerő folyamataik során [215,216]. A főként hidrogenotróf metanogén útvonalat hasznosító *Methanothermobacter* nemzetség mikrobái 8,4%-ot képviseltek a mikroba közösségből. A *Methanothermobacter*-ek CO₂ redukciója által állítanak elő CH₄-t, H₂-t használva elektron donorként [206]. Két nemzetség, a *Clostridium* (4,52%) és a *Lutispora* (2,3%) a szerves savak képzésében játszanak fontos szerepet. A *Lutispora* nemzetség baktériumai főként fehérje (pl. tripton, pepton, kazein hidrolizátum) és aminosav (metionin, treonin, triptofán, cisztein, lizin, szerin) tartalmú szerves szubsztrát bontását végzik és állítanak elő belőle energiát, ecetsavat, izo-valsavat, propionsavat és izo-valeriánsavat [217]. Kis számban, de jelen vannak a *Desulfotomaculum* és a *Moorella* nemzetség baktériumai is, amelyek CO vagy CO₂ felhasználásával redukzív útvonalon is képesek a szerves savak előállítására. Emellett kemoorganotróf útvonalon is képesek szerves savak (propionsav, ecetsav) előállítására [212,218].

A rendszeres H₂ és CO₂ adagolás hatására, illetve a szerves szubsztrát bevitelének hiánya miatt a mikroba közösség jelentős változásokon ment keresztül. A H₂-ben és CO₂-ban gazdag légtér leginkább az *Actinotalea* (log₂FC: 5,3), a *Methanobacterium* (log₂FC: 4,9), *Cellulomonas* (log₂FC: 4,1) és a *Methanothermobacter* (log₂FC: 2,3) nemzetség képviselőinek kedvezett (37. ábra). A főként hidrogenotróf útvonalon energiát nyerő *Methanothermobacter*-ek voltak a közösség legdominánsabb mikrobái, átlagos relatív gyakoriságuk 44,1% volt. Azonban a naponta bevitt H₂ és CO₂ mennyisége befolyásolta a növekedésüket, így azokban a fermentorokban, amelyek légtérébe a legnagyobb mennyiségben adagoltam a H₂-t és a CO₂-t („C”), relatív gyakoriságuk a 65,3%-ot is elérte. A szintén hidrogenotróf *Methanobacterium*-ok relatív gyakorisága 8,7% volt. Az *Actinotalea*-k (4,3%) fakultatív anaerob baktériumok, amelyek széles választékban képesek a szerves szubsztrátot (pl. cellulóz, cellobióz, glükóz, raffinóz, ecetsav) hasznosítani, fermentációs terméként ecetsavat, hangyasavat, etanolt,

borostyánkősavat és CO₂-t állítanak elő [219,220]. *Cellulomonas* nemzetség (2,1%) baktériumai cellulolitikus aktivitásuknak köszönhetően cellulóz bontásra képesek, hasítás eredményeként keletkező glükóz molekulákat hasznosítják és szerves savakat képeznek belőle [221]. A szerves szubsztrát fogyása tápanyag hiányhoz vezet és a magas H₂ parciális nyomás gátló folyamatokat vált ki bizonyos mikrobák anyagcsere folyamataiban, szaporodásukban, így ezek relatív gyakorisága a fermentáció végére nagyban csökkent. Legnagyobb mértékű csökkenést az *Ureibacillus* nemzetség baktériumainak számában figyelhetünk meg (log₂FC: -6,5), amelyek számára nem maradt hasznosítható szubsztrát, így nem voltak képesek fennmaradni a közösségben [215,216]. Jelentős csökkenés figyelhető meg a szerves szubsztrátot hasznosító mikrobák mennyiségében, aminek az oka, fermentációs maradék szervesanyag tartalmának csökkenése és kimerülése, ilyenek a *Lutispora* (log₂FC: -3,9), *Herbinix* (log₂FC: -2,4), *Clostridium* (log₂FC: -2,3), *Bacillus* (log₂FC: -2,3) és a *Tepidanaerobacter* (log₂FC: -2) nemzetség baktériumai. Ezek a baktériumok a szénhidrát lebontási útvonal fontos részei, anyagcseréjük eredményeként biomasszát, ecetsavat, CO₂-ot és H₂-t állítanak elő [73,201,202,222]. A *Syntrophomonas* nemzetség baktériumait is gátolta a fermentáció során jelen levő magas H₂ parciális nyomás, amelynek köszönhetően számuk csökkent (log₂FC: -2,5). Ezek a baktériumok szintén a szervessav képzésben vesznek részt, azonban az energianyereséget a hosszú szénláncú szerves savak (pl.: vajsav, valeriánsav, kapronsav) kötéseinek bontásából nyerik. Anyagcseréjük révén propionsavat, ecetsavat, izo-valeriánsavat és H₂-t állítanak elő [223].



37. ábra: A fermentációs maradék mikroba összetételének változása a fermentáció során mezofil körülmények között. Az ábra legbelső részében a mikrobák taxonómiai fája található, melynek végén az előforduló nemzetségek nevei olvashatók. Az ezt követő íven a különböző nemzetségek reprezentáltsága figyelhető meg a fermentáció egyes mintáiban. A legkülső íven a különböző nemzetségek változásának iránya és mennyisége van ábrázolva a fermentáció kezdeti mikrobaösszetételéhez viszonyítva ($\log_2 FC$).

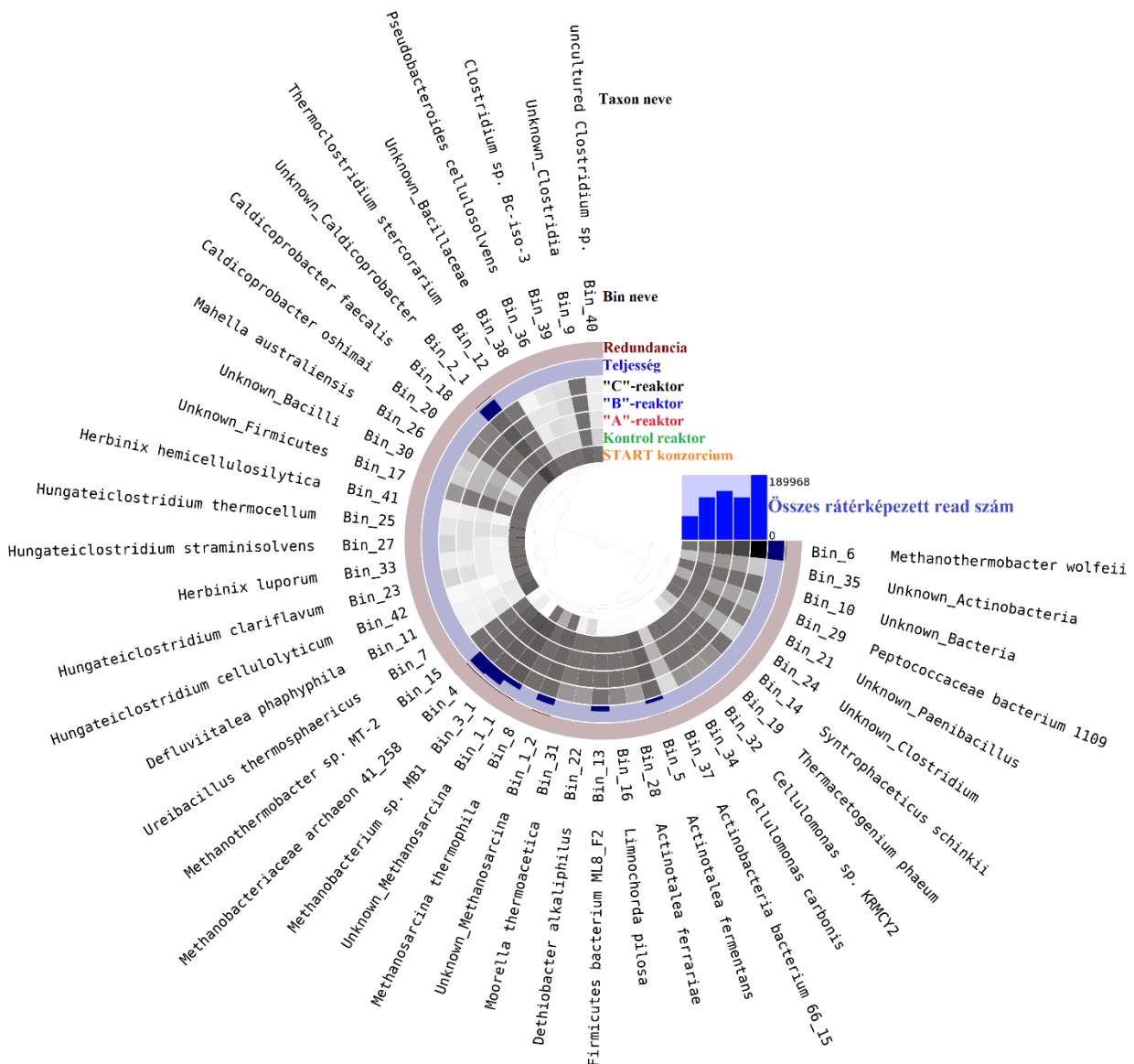
Hasonlóan a mezofil kísérlethez, a termofil esetében is nagy a hasonlóság a genomcentrikus és a leolvasás alapú eredmények között. A kiindulási fermentációs folyadék mikrobaközösségét a baktériumokból összeszerelt binek uralják (38. ábra). A legnagyobb mennyiségben egy

ismeretlen *Caldicoprobacter* (relatív abundancia: 15%), az *Ureibacillus thermosphaericus* (7,1%), a *Thermoclostridium stercorarium* (5%), egy ismeretlen *Clostridium* (4,2%) és a *Defluviitalea phaphyphila* (4,1%) volt. Ezek a mikrobák a szerves komponensek bontásáért, szerves savak képzéséért felelősek [215,224–226]. Érdekesség, hogy a CH₄ termelésben résztvevő leggyakoribb metanogén bin a *Methanosarcina* nemzetség egy ismeretlen tagja volt, amely mindösszesen 0,9%-os relatív gyakorisággal volt jelen a kiindulási mikrobaközösségben.

A H₂ és CO₂ adagolás és a szerves szubsztrát bevitelével jelentősen változott a fermentációs maradék mikrobiális összetétele. A H₂ magas koncentrációja a reaktorok légterében szelektív nyomást gyakorolt a közösségre, amelyhez bizonyos mikrobák nem voltak képesek alkalmazkodni, míg mások adaptálódtak, nagy mennyiségben felszaporodtak. A légtér magas H₂ parciális nyomásának és a szerves szubsztrát hiányának köszönhetően a fermentációs folyadék kezdeti domináns baktériumainak száma nagyban lecsökkent. A legjelentősebb változások a *Thermoclostridium stercorarium* (log₂FC: -3,7), egy ismeretlen *Clostridium* (log₂FC: -2,8), a *Caldicoprobacter oshimai* (log₂FC: -2,1), *Caldicoprobacter faecalis* (log₂FC: -2,1) és egy ismeretlen *Caldicoprobacter* (log₂FC: -1,9) esetében következett be a legnagyobb H₂ mennyiséggel táplált reaktorokban.

Ezzel szemben a metanogén mikrobáknak kedveztek az általam létrehozott H₂-ben és CO₂-ban gazdag környezet. Az összeszerelt metanogén binék közül 6 gyakorisága emelkedett jelentős mértékben. A legjelentősebb növekedést a *Methanobacterium sp. MBI* (log₂FC: 8,9), *Methanobacteriaceae archaeon 41_258* (log₂FC: 6,1) és a *Methanothermobacter wolfeii* (log₂FC: 5,9) esetében figyeltem meg, de *Methanosarcina thermophila* (log₂FC: 3) és két ismeretlen *Methanosarcina* (log₂FC: 2,9, log₂FC: 2,7) növekedése is jelentős volt. Az összeszerelt genomok relatív gyakoriságának növekedése alapján, illetve az irodalmi adatok alapján ezek a mikrobák a hidrogenotróf anyagcserének köszönhetően szaporodhattak fel [227,228]. Nem csak metanogén mikrobák számára kedveztek ezek a fermentációs körülmények, az *Actinotalea fermentans*-ként azonosított bin relatív gyakorisága is jelentősen változott (log₂FC: 8,3). Ennek jelentősége, hogy az *Actinotalea fermentans* egy cellulolitikus aktivitással rendelkező baktérium, amely szénhidrátok hasznosításával (pl. arabinóz, cellulóz, fruktóz, galaktóz, glükóz) állít elő szerves savakat (ecetsav, hangyasav, tejsavat, borostyánkősavat) és etanolt, azonban semmilyen irodalmi adat nem bizonyítja, hogy CO₂ és H₂-ben gazdag légtér is kedvezne a növekedésének, anyagcsere folyamatainak [229,230]. A genomcentrikus elemzés alapján is a fermentációt követően a mikrobaközösség összetételét a hidrogenotróf anyagcserét végző *Methanobacterium* nemzetség uralta. A legnagyobb H₂ mennyiséggel ellátott reaktorokban a *Methanothermobacter wolfeii* (35,1%), a két ismeretlen

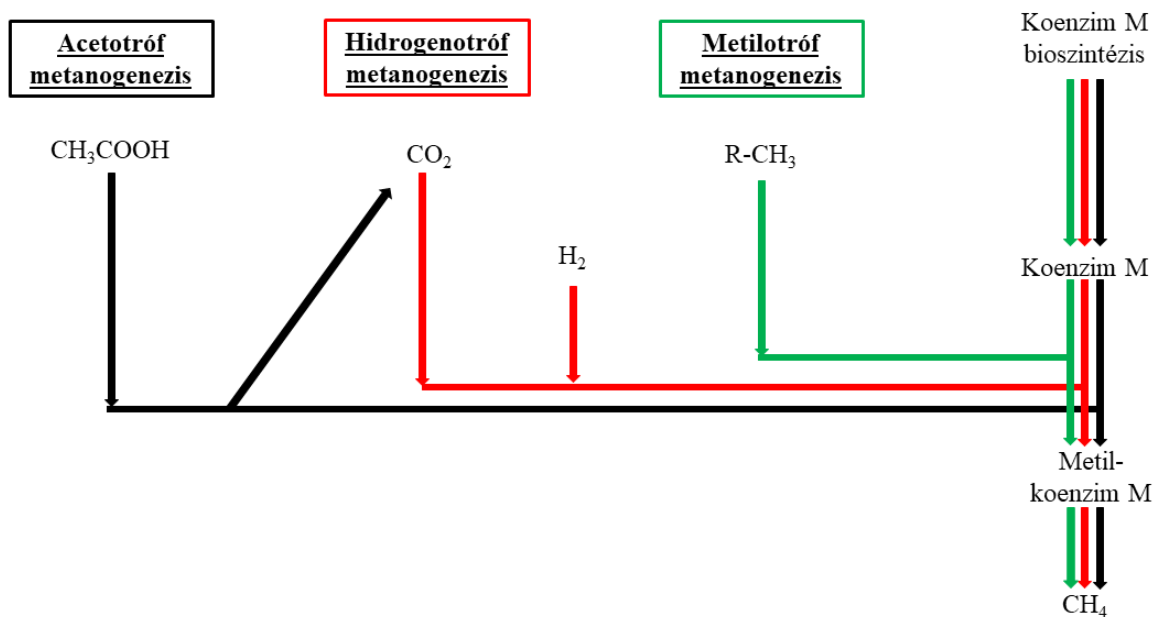
Methanosarcina nemzetség (7,5%, 2,5%), a *Methanobacterium sp. MBI* (4,8%), az ismeretlen *Caldicoprobacter* (4%), a *Methanobacteriaceae archaeon 41_258* (3,5%) és a *Actinotalea fermentans* (3,2%) mikrobákként azonosított binek voltak a legnagyobb relatív gyakorisággal jelen.



38. ábra: A termofil fermentációs maradék genomcentrikus mikroba összetételének változása fermentáció ideje alatt. Az ábra belsejében egy dendrogramm látható, mely az egyes binek egymáshoz való hasonlóságát tükrözi tetranukleotid szekvenciájuk alapján. A következő gyűrűkön az egyes binek lefedettsége látható az adott mintában (a sötétedés mértéke a lefedettség mértékével arányos). Efölött található az egyes binek minőségi értékei (teljesség, redundancia), majd a binek neve és taxonómiai besorolásuk látható.

5.4.3 H₂ hasznosító anyagcsere útvonalak keresése

A genom centrikus elemzés során az összeszerelt binék teljessége alapján átfogó képet kaphatunk a mikrobák anyagcsere folyamatairól, az azonosított gének, enzimek aktivitása által. Célom volt, hogy a három fontos H₂ hasznosító anyagcsere útvonal (hidrogenotróf metanogenezis, reduktív acidogenezis, szulfát redukció) enzimeinek aktivitását nyomon követve azonosítsam a közösségben jelen levő potenciális H₂ felhasználó mikrobákat a binékben azonosított enzimek alapján. Emellett a CH₄ képzésben résztvevő mikrobákat anyagcseréjük alapján csoportosítani kívántam, mivel számos esetben megfigyelhető, hogy a metanogén mikrobák nem csak egy anyagcsere útvonal katalízisére alkalmasak, hanem akár 2 vagy akár mind a 3 útvonal aktív lehet. Fontos tényező a vizsgálat során, hogy a 3 metanogén anyagcsere útvonal, bár a felhasznált szubsztrát összetétele alapján jelentősen eltér, mégis a koenzim M szintézise és CH₄ képzés utolsó lépéseiben találkoznak (39. ábra). Az összeszerelt genomok enzimatikus folyamatai alapján kíséreltem meg a metanogén mikrobák anyagcseréjének változatosságának bemutatását.



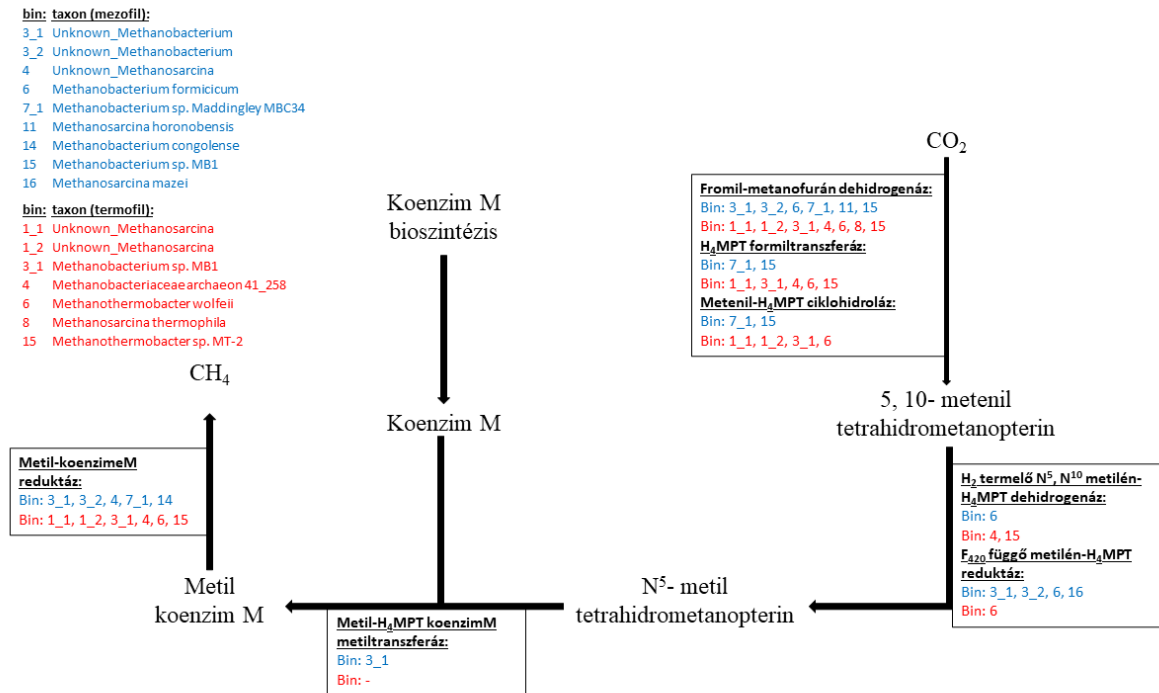
39. ábra: A metanogenezis 3 fő anyagcsere folyamatának sematikus ábrája.

A metanogén mikrobák igen változatos anyagcserét képesek alkalmazni a változó környezeti hatásokra válaszolva. Ezért taxonómiai elemzés mellett a genomcentrikus szekvenálás eredményei alapján összeszerelt genomokban azonosított enzimek alapján igyekeztem anyagcsere útvonalat hozzárendelni az egyes binékhez. 13 db mezofil és 7 db termofil

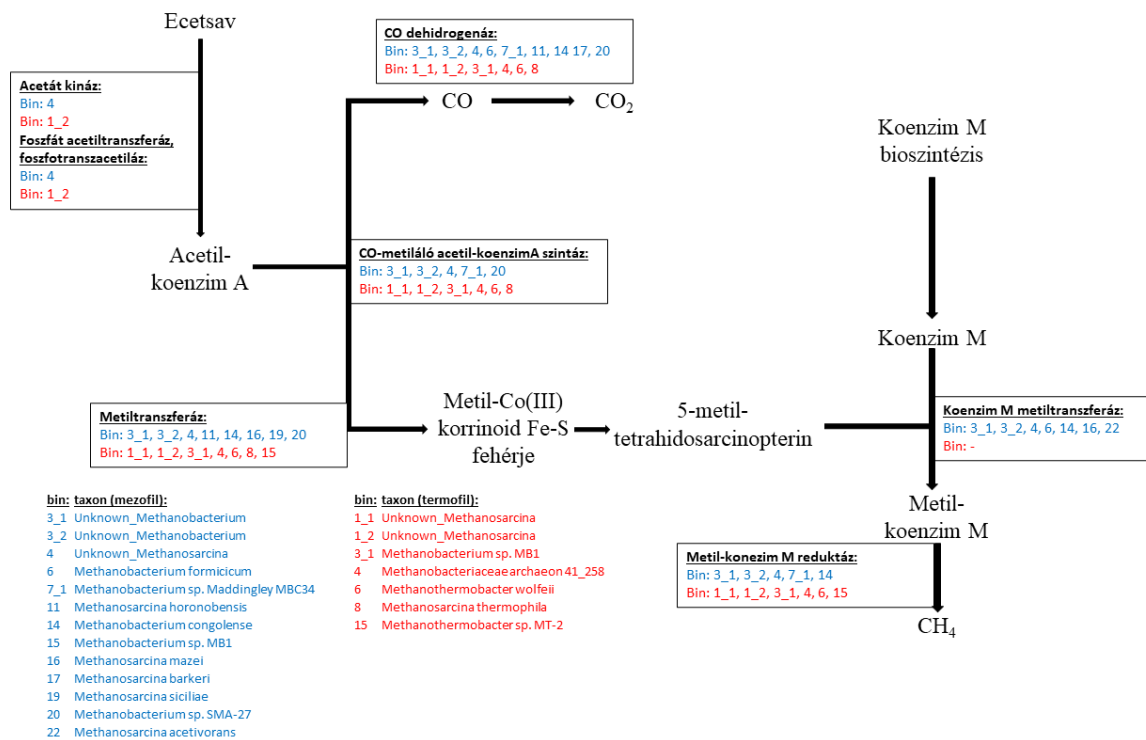
metanogén genomot tudtam azonosítani a mérés során. Az összeszerelt genomokban található enzimeket az egyes metanogén anyagcsere útvonalakra térképeztem (40. ábra-42. ábra), ami alapján anyagcsere folyamatot is hozzá tudtam rendelni az egyes binekhez. Az összes azonosított binben megtalálhatók az acetotróf metanogenezis útvonalára jellemző enzimek (41. ábra). A binek az acetotróf metanogenezisre egyedileg jellemző útvonalon találhatóak meg, így joggal feltételezhető, hogy ezek a mikrobák valóban képesek az acetotróf metanogenezis által energiát nyerni. A hidrogenotróf metanogenezis enzimeit a következő mezofil: ismeretlen *Methanobacterium* (3_1-es bin), ismeretlen *Methanobacterium* (3_2-es bin), ismeretlen *Methanosarcina* (4-es bin), *Methanobacterium formicicum* (6-os bin), *Methanobacterium sp. Maddingley MBC34* (7_1-es bin), *Methanosarcina horonobensis* (11-es bin), *Methanobacterium congolense* (14-es bin), *Methanobacterium sp. MBI* (15-ös bin), *Methanosarcina mazei* (16-os bin) és termofil: ismeretlen *Methanosarcina* (1_1-es bin), ismeretlen *Methanosarcina* (1_2-es bin), *Methanobacterium sp. MBI* (3_1-es bin), *Methanobacteriaceae archaeon 41_258* (4-es bin), *Methanothermobacter wolfeii* (6-os bin), *Methanosarcina thermophila* (8-as bin), *Methanothermobacter sp. MT-2* (15-ös bin) binekben voltak megtalálhatóak (40. ábra). Joggal feltételezhető, hogy ezek az Archaeák mind alkalmasak a hidrogenotróf anyagcserére. Azonban két mezofil binben, a 4-es ismeretlen *Methanosarcina*, valamint a 14-es *Methanobacterium congolense* genomban csupán a metil-koenzimM redukáz enzimét tudtam azonosítani, ami mind a három metanogén anyagcsere útvonal jellemző enzime. Megfigyelhető, hogy több, az acetotróf útvonalra jellemző enzim (acetát kináz, CO dehidrogenáz, metiltranszferáz) volt azonosítható ebben a két binben, így minden valószínűség szerint ezek csak acetotróf metanogenezisre képes mikrobák (41. ábra). A metilotróf metanogenezisre jellemző enzimek közül csupán a 3 metanogén útvonalra közösen jellemző enzimeket (koenzimM metiltranszferáz, metil-koenzimM redukáz) tudtam azonosítani, az útvonalra egyedi jellemző enzimek közül egyet sem (42. ábra).

Az összeszerelt genomok teljessége függvényében elmondható, hogy a fermentáció során megfigyelhető metanogén mikrobák többsége az acetotróf és a hidrogenotróf anyagcserére egyaránt jellemző enzimekkel rendelkeztek. Ahogy korábban bemutattam a H₂ és CO₂ adagolás hatására és a szerves szubsztrát hiánya miatt a fermentációs maradék mikroba összetétele nagyban változott. A legnagyobb H₂ mennyiséggel táplált reaktorok legnagyobb relatív gyakoriságú (1%<) mezofil metanogén binjei a *Methanobacterium formicicum* (6-os bin, 4,5%), a *Methanobacterium sp. Maddingley MBC34* (7_1-es bin, 3,3%) és a *Methanobacterium sp. MBI* (15-ös bin, 1%), amelyek mindegyikében megtaláltam a hidrogenotróf és az acetotróf metanogenezis útvonalainak jellemző enzimeit egyaránt (38. ábra, 40. ábra, 41. ábra). A

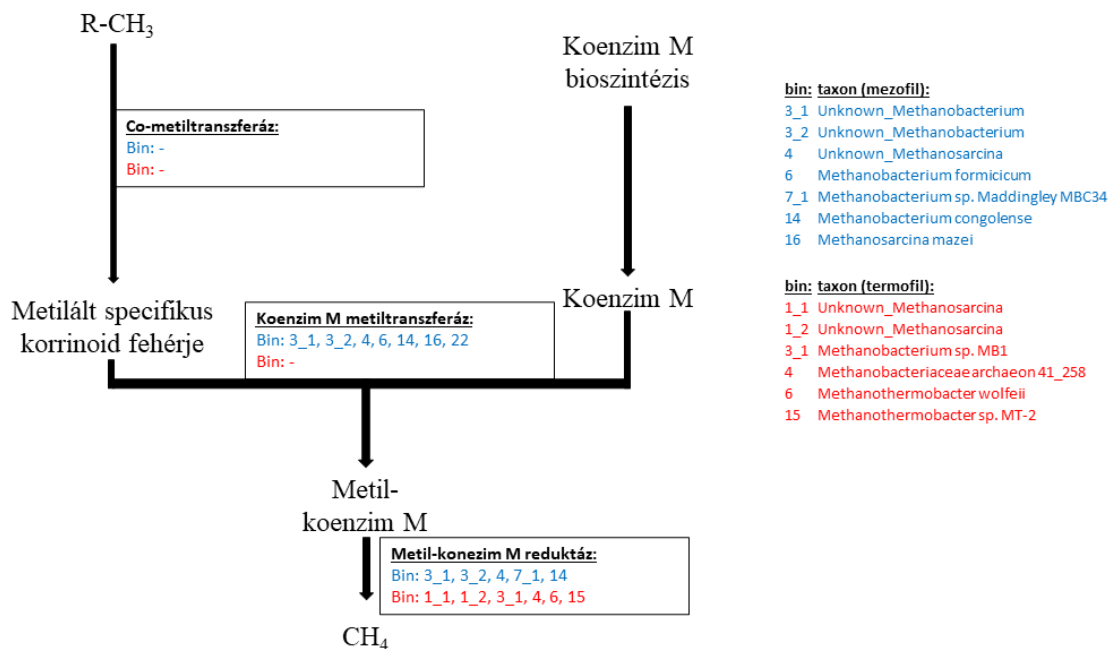
termofil körülmények között inkubált közösség legnagyobb relatív gyakoriságú (1%<) binjei egy ismeretlen *Methanosarcina* (1_1-es bin, 7,5%), ismeretlen *Methanosarcina* (1_2 -es bin, 2,8%), *Methanobacterium sp. MBI* (3_1-es bin, 4,8%), *Methanobacteriaceae archaeon 41_258* (4 -es bin, 3,5%), *Methanothermobacter wolfeii* (6-os bin, 35,1%) és a *Methanosarcina thermophila* (8-es bin, 1,9%) voltak (38. ábra). A mezofil eredményekhez hasonlóan ezekben a genomokban is mind a hidrogenotróf, mind az acetotróf útvonalra jellemző enzimek megtalálhatók voltak (40. ábra, 41. ábra).



40. ábra: A genomokban fellelhető hidrogenotróf metanogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.



41. ábra: A genomokban fellelhető acetotróf metanogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.

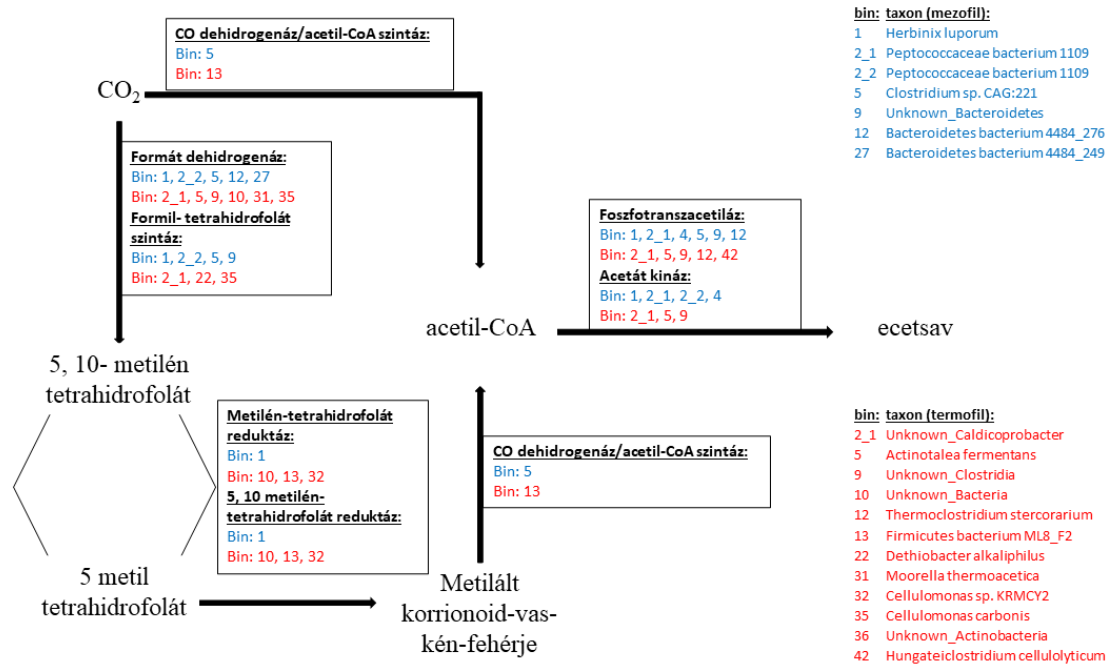


42. ábra: A genomokban fellelhető metilotróf metanogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.

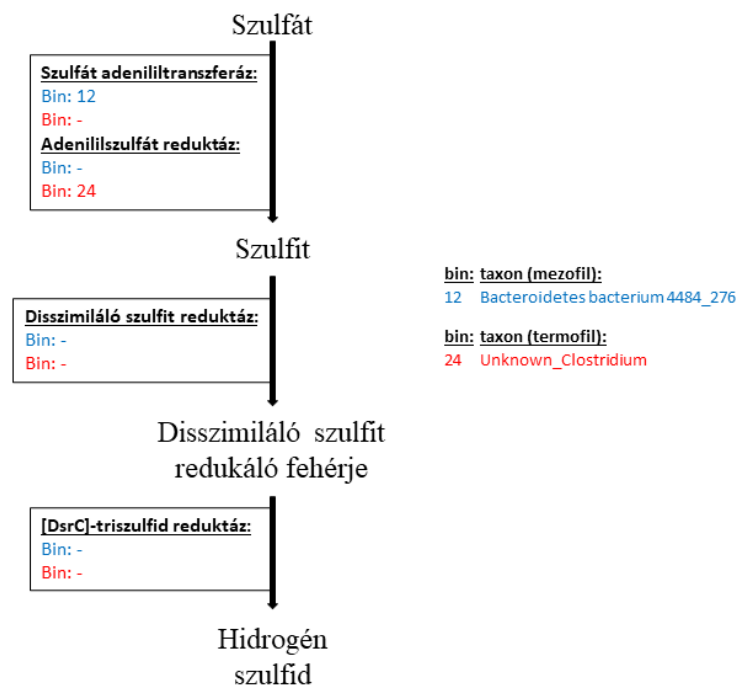
A hidrogenotróf metanogenezis mellett a biogáz fermentáló mikroba közösségek fontos H_2 hasznosító mikrobái a homoacetogén baktériumok. H_2 és CO_2 szolgál szubsztrátként ezeknek a baktériumoknak és redukzív útvonalon állítanak elő szerves savakat anyagcseréjük révén. Annak ellenére, hogy az irodalmi adatok alapján nem képesek felvenni a versenyt mezofil és annál magasabb hőmérsékleten a hidrogenotróf metanogének energianyereségével, nem zárható ki a jelenlétük, aktivitásuk [19–21]. Mind a 2 fermentáció esetében találtam a bakteriális genomokban olyan enzimeket, amelyek alapján a mikrobák képesek lehetnek a redukzív acidogenezisre (43. ábra). A 2 kísérletsorozat során 7 mezofil és 12 termofil baktérium genomjában találtam meg a redukzív acidogenezis enzimeit. Ezek közül 3 esetében csak a foszfo-transzacetiláz és az acetát kináz volt azonosítható, amelyek a heterotróf útvonalon történő ecetsav képzésben is részt vesznek. Ezek alapján mezofil mérés során a 2_1-es *Peptococcaceae bacterium 1109*, termofil esetben a 12-es *Thermoclostridium stercorarium* és a 42-es *Hungateiclostridium cellulolyticum* esetében nem bizonyítható a redukzív szervessav képző aktivitás.

A fermentáció végén jelentős számban már csak azok a baktériumok voltak képesek fennmaradni, amelyek jól tolerálják a H_2 magas parciális nyomását a légtérben, valamint autotróf anyagcsere révén tovább képesek szaporodni. Mezofil kísérletsorozat során jelentősebb relatív gyakorisággal (1%<) csak a *Herbinix luporum* (1-es bin, 6,9%), *Clostridium sp. CAG:221* (5-ös bin, 2,6%), egy ismeretlen *Bacteroidetes* (9-es bin, 3,4%) és a *Bacteroidetes bacterium 4484_276* (12-es bin, 3,9%) volt jelen. Termofil körülmények között egy ismeretlen *Caldicoprobacter* (2_1-es bin, 4%) és az *Actinotalea fermentans* (5-ös bin, 3,2%) képviselt jelentősebb relatív gyakoriságot.

A szulfátredukáló útvonal 2 enzimét találtam meg a termofil és mezofil genomokban (44. ábra). Mezofil esetben a szulfát adenililtranszferázt azonosítottam a 12-es binnel jelölt *Bacteroidetes bacterium 4484_276*-ban, míg termofil genomok között az adenililszulfát reduktazt egy ismeretlen *Clostridiumban* (24-es bin). Ezek alapján jelentős szulfát redukció a fermentáció során nem ment végbe.



43. ábra: A genomokban fellelhető redukív acetogenezis útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.



44. ábra: A genomokban fellelhető szulfát redukció útvonalhoz kapcsolható azonosított enzimek.

5.5 Következtetések, javaslatok

Az eredményeim bizonyítják, hogy a fermentációs maradék mikrobaközössége jelentős potenciállal rendelkezik a H₂ hatékony átalakítására CH₄-ná a következő megkötésekkel:

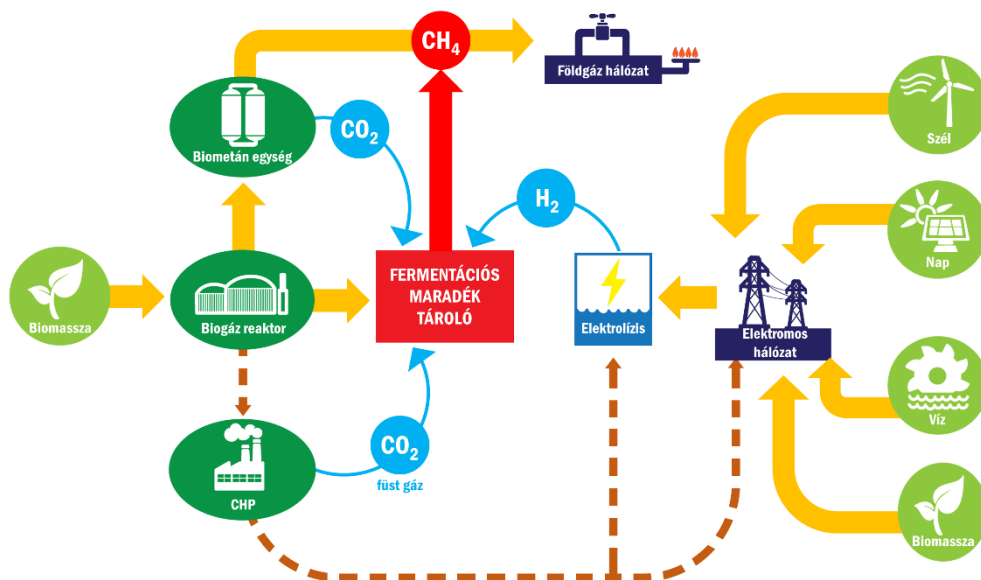
- Az aktív hidrogenotróf metanogenezis folyamatosan felhasználja a fermentációs közeg CO₂ tartalmát, emiatt a keletkező gázelegy energiatartalma növekszik, ellenben hosszútávon, illetve nagy mennyiségű H₂ bevitele esetén a CO₂ utánpótlását meg kell oldani. Ezért a PtBioCH₄ batch rendszerek hosszú időn keresztül nem fenntarthatók legalább sztöchiometrikus mennyiségű CO₂ adagolás nélkül.
- A CO₂ utánpótlásának lehetőségeként a szerves szubsztrát rendszeres bevitele kevert mikroba közösségek esetében lehetséges, de precíz monitorozást igényel, hiszen az in-situ rendszerekhez hasonlóan a H₂ magas parciális nyomása a szerves savak felhalmozódásához és a reakcióközeg elsavasodásához vezethet.
- Megfelelő időben és mennyiségben adagolt CO₂ bevitelével azonban rendszer alakítható ki mind mezofil, mind termofil fermentációs maradékon alapuló mikroba közösséggel, amely akár a földgáz tisztaságával megegyező bioCH₄ előállítására alkalmas.
- A mezofil mikrobaközösségek a változatosabb mikroba-összetétel miatt stabilabb PtBioCH₄ működést biztosítanak. Termofil közösség alkalmazása az alacsonyabb mikrobadiverzitás és a gyorsabb enzimatikus folyamatok miatt rendszeresebb monitorozást igényel a stabil, nagy tisztaságú bioCH₄ termelés elérése érdekében.

A bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy a fermentációs maradék kiválóan alkalmas a „Power-to-Gas” rendszerbe való implementálásra. Az általam javasolt „PtBioCH₄” rendszer eltérése a hagyományos „Power-to-Gas” technológiától (12. ábra), hogy a biogáz összetételének javítása a H₂ bevétel segítségével nem a biogáz reaktorban zajlana, hanem a biogáz erőművek fontos részét képező fermentációs maradék tározóban (45. ábra). Az ex-situ alapú biogáz összetétel javítás segítségével a H₂ magas parciális nyomása nem veszélyeztetné a biogáz reaktor stabilitását és a biogáz tisztítása során eltávolított CO₂ visszairányításával a maradék tárolóba a hidrogenotróf metanogének CO₂ utánpótlása is biztosítva lehet. Összességében elmondható, hogy a fermentációs maradék mikrobaközösségének hasznosítása a „PtBioCH₄” technológiában számos kecsegtető lehetőséget kínál:

- A fermentációs maradék olcsó, rendszeresen keletkezik és változatos mikrobaközössége révén hatékony katalizátora a „PtBioCH₄” folyamatnak.
- A rendszer mikrobaközössége képes rugalmasan reagálni az esetleges H₂/CO₂ szegény időszakokra, majd a betáplálás újratekésítésére, ezzel biztonságot nyújt a

„zöld áram” termelő technológiák fluktuációjából származó ingadozások kiegyensúlyozására.

- Szerves szubsztrát rendszeres bevitelének hiánya mellett is a folyamat jól irányítható és a megfelelő arányú H_2/CO_2 betáplálás esetén végtermékként $bioCH_4$ keletkezik, amelyet ipari hasznosítás előtt már legfeljebb csak a H_2S -től és a vízgőztől kell megtisztítani.
- Az átalakításhoz szükséges szénforrás a CO_2 , amely a fermentációs maradék szerves komponenseiből acetotróf metanogenezis révén szabadul fel, a szerves biomassa anaerob fermentációja során keletkező biogáz fő összetevője, amelyet a CH_4 hasznosítása előtt el kell távolítani. A fizikai-, kémiai tisztítások révén kinyerhető CO_2 a maradék tározókba vezethető és a hidrogenotróf metanogén mikrobák számára szolgálhat szénforrásként a CH_4 termelés során. CO_2 forrásként természetesen ipari gázok, motorok kipufogógáza és a légkörből leválasztható CO_2 is megfelel.
- A rendszer kiépítése és ipari megvalósítása a hasonló PtBioCH₄ berendezésekhez hasonlítva jelentős anyagi befektetéseket nem igényelne, mivel a folyamatnak helyet adó fermentációs maradék tározó a legtöbb működő biogáz erőmű fontos, az üzembiztonság miatt kötelező eleme



45. ábra: Az általam javasolt „PtBioCH₄” alapú rendszer megvalósításának sematikus elrendezése.

6 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Bagi Zoltánnak és Prof. Dr. Kovács L. Kornélnak, akik a biotechnológia iránti lelkesedésemet felkeltették és a tanszékre befogadtak. Szakmai tapasztalatukkal és támogatásukkal, mind a kutatómunkámat, mind a dolgozat elkészülését nagyban segítették.

Köszönöm továbbá az SZTE Biotechnológiai Tanszék vezetőjének, Dr. Rákhely Gábornak, hogy munkámat a tanszéken végezhettem el.

Hálával tartozom a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék Biogáz Csoport tagjainak segítségükért, különös tekintettel Dr. Wirth Rolandnak és Dr. Ács Norbertnek a DNS izolálás és a metagenomikai adatok kiértékelése során nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet nyilvánítani a támogatóknak:

- Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal: FK123899, PD132145
- Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap: 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2020-00117, 2020-3.1.2, EFOP- 3.6.2-16-2017-00010, GINOP- 2.2.1-15-2017-00081, ZFR-KVG-2020-00009
- Magyar Tudományos Akadémia: LP2020-5/2020
- Hungarian Scientific Research Fund: FK 123902

7 Irodalomjegyzék

- [1] T. Bond, M.R. Templeton, History and future of domestic biogas plants in the developing world, *Energy Sustain. Dev.* 15 (2011) 347–354. doi:10.1016/j.esd.2011.09.003.
- [2] P.J. He, Anaerobic digestion: An intriguing long history in China, *Waste Manag.* 30 (2010) 549–550. doi:10.1016/j.wasman.2010.01.002.
- [3] M. Bai, A. , Bagi, Z., Bartha, I., Fenyvesi, L., Hódi, J., Kovács, K., Mátyás, L., Mogyorósi, P., Petis, A biogáz, Száz magyar falu könyvesháza Kht, Budapest, 2007.
- [4] J.Q. Ni, E.J. Nyns, New concept for the evaluation of rural biogas management in developing countries, *Energy Convers. Manag.* 37 (1996) 1525–1534. doi:10.1016/0196-8904(95)00354-1.
- [5] Y. Chen, G. Yang, S. Sweeney, Y. Feng, Household biogas use in rural China: A study of opportunities and constraints, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 545–549. doi:10.1016/j.rser.2009.07.019.
- [6] Cristina Calderón; Martin Colla; Jean-Marc Jossart; Nathalie Hemeleers; Anna Martin; Nino Aveni; Claudio Caferra, *European Bioenergy Outlook 2019 | Biogas*, 2019. www.bioenergyeurope.org.
- [7] N. Scarlet, J.F. Dallemand, F. Fahl, Biogas: Developments and perspectives in Europe, *Renew. Energy.* 129 (2018) 457–472. doi:10.1016/j.renene.2018.03.006.
- [8] I. Angelidaki, L. Treu, P. Tsapekos, G. Luo, S. Campanaro, H. Wenzel, P.G. Kougias, Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 452–466. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.011.
- [9] István Szunyog, Biometán hasznosítás Európában és Magyarországon, *Műszaki Földtudományi Közlemények.* 85 (2015) 181–190. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [10] A. Schunurer, A. Jarvis, *Microbiological Handbook for Biogas Plants*, Waste Manag. (2009) 138.
- [11] M.H. Gerardi, *The microbiology of anaerobic digesters*, Wiley-Interscience, 2003.
- [12] P.G. Kougias, I. Angelidaki, Biogas and its opportunities — A review, *Front. Environ. Sci. Eng.* 12 (2018) 14. doi:10.1007/s11783-018-1037-8.
- [13] D.J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S. V. Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T. Sanders, H. Siegrist, V.A. Vavilin, *The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1)*., *Water Sci. Technol.* 45 (2002) 65–73.
- [14] I. Angelidaki, D. Karakashev, D.J. Batstone, C.M. Plugge, A.J.M. Stams, *Biomethanation and its potential*, 1st ed., Elsevier Inc., 2011. doi:10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0.
- [15] J.N. Meegoda, B. Li, K. Patel, L.B. Wang, A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15 (2018). doi:10.3390/ijerph15102224.
- [16] A.J.M. Stams, C.M. Plugge, Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 568–577. doi:10.1038/nrmicro2166.
- [17] Y.Q. Nie, H. Liu, G.C. Du, J. Chen, Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogenesis process, *Process Biochem.* 42 (2007) 599–605. doi:10.1016/j.procbio.2006.11.007.
- [18] S.W. Ragsdale, E. Pierce, Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO₂ Fixation Stephen, 1784 (2009) 1873–1898. doi:10.1016/j.bbapap.2008.08.012.Acetogenesis.
- [19] V. Siritwongrungsom, R.J. Zeng, I. Angelidaki, Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed

- methanogenesis, *Water Res.* 41 (2007) 4204–4210. doi:10.1016/j.watres.2007.05.037.
- [20] B.K. Ahring, P. Westermann, Thermophilic anaerobic degradation of butyrate by a butyrate-utilizing bacterium in coculture and triculture with methanogenic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 429–433.
- [21] O.R. Kotsyurbenko, M. V. Glagolev, A.N. Nozhevnikova, R. Conrad, Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature, *FEMS Microbiol. Ecol.* 38 (2001) 153–159. doi:10.1016/S0168-6496(01)00179-9.
- [22] A.N. Nozhevnikova, K. Zepp, F. Vazquez, A.J.B. Zehnder, C. Holliger, Evidence for the existence of psychrophilic methanogenic communities in anoxic sediments of deep lakes, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1832–1835. doi:10.1128/AEM.69.3.1832-1835.2003.
- [23] E.A. Ottesen, J.R. Leadbetter, Formyltetrahydrofolate Synthetase Gene Diversity in the Guts of Higher Termites with Different Diets and Lifestyles, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 3461–3467. doi:10.1128/aem.02657-10.
- [24] E.J. Gagen, S.E. Denman, J. Padmanabha, S. Zadbuke, R. Al Jassim, M. Morrison, C.S. McSweeney, Functional gene analysis suggests different acetogen populations in the bovine rumen and tammar wallaby forestomach, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 7785–7795. doi:10.1128/AEM.01679-10.
- [25] C. Yang, L. Mi, X. Hu, J. Liu, J. Wang, Investigation into host selection of the cecal acetogen population in rabbits after weaning, *PLoS One.* 11 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0158768.
- [26] J. Kamke, S. Kittelmann, P. Soni, Y. Li, M. Tavendale, S. Ganesh, P.H. Janssen, W. Shi, J. Froula, E.M. Rubin, G.T. Attwood, Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a *Sharpea*-enriched microbiome characterised by lactic acid formation and utilisation, *Microbiome.* 4 (2016) 1–16. doi:10.1186/s40168-016-0201-2.
- [27] L. Mi, B. Yang, X. Hu, Y. Luo, J. Liu, Z. Yu, J. Wang, Comparative analysis of the microbiota between sheep rumen and rabbit cecum provides new insight into their differential methane production, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–14. doi:10.3389/fmicb.2018.00575.
- [28] S. Godwin, A. Kang, L.-M. Gulino, M. Manefield, M.-L. Gutierrez-Zamora, M. Kienzle, D. Ouwwerkerk, K. Dawson, A. V Klieve, Investigation of the microbial metabolism of carbon dioxide and hydrogen in the kangaroo foregut by stable isotope probing, *ISME J.* 8 (2014) 1855–1865. doi:10.1038/ismej.2014.25.
- [29] M. Akuzawa, T. Hori, S. Haruta, Y. Ueno, M. Ishii, Y. Igarashi, Distinctive Responses of Metabolically Active Microbiota to Acidification in a Thermophilic Anaerobic Digester, *Microb. Ecol.* 61 (2011) 595–605. doi:10.1007/s00248-010-9788-1.
- [30] V. Müller, Energy Conservation in Acetogenic, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 6345–6353. doi:10.1128/AEM.69.11.6345.
- [31] J.H. Jeoung, S. Goetzl, S.E. Hennig, J. Fessler, C. Wörmann, J. Dendra, H. Dobbek, The extended reductive acetyl-CoA pathway:ATPases in metal cluster maturation and reductive activation, *Biol. Chem.* 395 (2014) 545–558. doi:10.1515/hsz-2013-0290.
- [32] S. Sakai, H. Imachi, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada, Y. Kamagata, *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage “Rice Cluster I”, and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 929–936. doi:10.1099/ijs.0.65571-0.
- [33] B. Dridi, M.L. Fardeau, B. Ollivier, D. Raoult, M. Drancourt, *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (2012) 1902–1907. doi:10.1099/ijs.0.033712-0.
- [34] W.J. Jones, J.A. Leigh, F. Mayer, C.R. Woese, R.S. Wolfe, *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent, *Arch. Microbiol.* 136 (1983) 254–261. doi:10.1007/BF00425213.

- [35] S.L. Bräuer, H. Cadillo-Quiroz, R.J. Ward, J.B. Yavitt, S.H. Zinder, *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61 (2011) 45–52. doi:10.1099/ijs.0.021782-0.
- [36] I.M. Mathrani, D.R. Boone, R.A. Mah, G.E. Fox, P.P. Lau, *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an Alkaliphilic, Halophilic, Methylophilic Methanogen, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 (1988) 333–333. doi:10.1099/00207713-38-3-333a.
- [37] T.A. Vishnivetskaya, J. Buongiorno, J. Bird, K. Krivushin, E. V. Spirina, V. Oshurkova, V.A. Shcherbakova, G. Wilson, K.G. Lloyd, E.M. Rivkina, Methanogens in the antarctic dry valley permafrost, *FEMS Microbiol. Ecol.* 94 (2018) 1–14. doi:10.1093/femsec/fiy109.
- [38] J.R. Leadbetter, J.A. Breznak, Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3620–3631.
- [39] F. Enzmann, F. Mayer, M. Rother, D. Holtmann, Methanogens: biochemical background and biotechnological applications, *AMB Express.* 8 (2018) 1–22. doi:10.1186/s13568-017-0531-x.
- [40] O. Kandler, H. Ko, *Entomology 2.1 Exam*, 54 (1998) 305–308. doi:10.1007/s000180050156.
- [41] M.D.E. Rosa, A. Gambacorta, A. Gliozzi, C. Nazionale, D. Ricerche, A. Felice, D. Fisica, U. Genova, *Structure, Biosynthesis_etc_ether_lipid.pdf*, 50 (1986) 70–80.
- [42] H. Penning, R. Conrad, Effect of inhibition of acetoclastic methanogenesis on growth of archaeal populations in an anoxic model environment, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 178–184. doi:10.1128/AEM.72.1.178-184.2006.
- [43] A. Bai, *A biogáz, Száz magyar falu könyvesháza*, 2007.
- [44] J. Vonck, K.Y. Pisa, N. Morgner, B. Brutschy, V. Müller, Three-dimensional structure of A1A0 ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 10110–10119. doi:10.1074/jbc.M808498200.
- [45] T. Wagner, T. Watanabe, S. Shima, Hydrogenotrophic Methanogenesis, *Biog. Hydrocarb.* (2018) 1–29. doi:10.1007/978-3-319-53114-4_3-1.
- [46] G. Gottschalk, R.K. Thauer, The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1505 (2001) 28–36. doi:10.1016/S0005-2728(00)00274-7.
- [47] R.K. Thauer, A.K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel, R. Hedderich, Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 579–591. doi:10.1038/nrmicro1931.
- [48] P.E. Rouviere, R.S. Wolfe, Novel biochemistry of methanogenesis, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 7913–7916.
- [49] L. Bai, T. Fujishiro, G. Huang, J. Koch, A. Takabayashi, M. Yokono, A. Tanaka, T. Xu, X. Hu, U. Ermler, S. Shima, Towards artificial methanogenesis: Biosynthesis of the [Fe]-hydrogenase cofactor and characterization of the semi-synthetic hydrogenase, *Faraday Discuss.* 198 (2017) 37–58. doi:10.1039/c6fd00209a.
- [50] P.H.A. Timmers, C.U. Welte, J.J. Koehorst, C.M. Plugge, M.S.M. Jetten, A.J.M. Stams, Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea, *Archaea.* 2017 (2017). doi:10.1155/2017/1654237.
- [51] A. Schnürer, Å. Jarvis, A. Schn, A. Sciences, A. Schnürer, Å. Jarvis, *Microbiology of the Biogas process*, 2018.
- [52] P. Bai, A., Bagi, Z., Bartha, I., Boruzs, L., Fenyvesi, L., Kovács, K., Mátyás, L., Mogyorósi, A *biogáz előállítás. Jelen és jövő, Szaktudás Kiadó Ház Rt, Budapest*, 2005.
- [53] E. Kovács, R. Wirth, G. Maróti, Z. Bagi, K. Nagy, J. Minárovits, G. Rákhely, K.L. Kovács,

- Augmented biogas production from protein-rich substrates and associated metagenomic changes, *Bioresour. Technol.* 178 (2015) 254–261. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.111.
- [54] A. Demirbas, Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections, (2008). doi:10.1016/j.enconman.2008.02.020.
- [55] B. Pap, Á. Györkei, I.Z. Boboescu, I.K. Nagy, T. Bíró, É. Kondorosi, G. Maróti, Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation, *Bioresour. Technol.* 177 (2015) 375–380. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.021.
- [56] L. Levén, A.R.B. Eriksson, A. Schnürer, Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste, *FEMS Microbiol. Ecol.* 59 (2007) 683–693. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00263.x.
- [57] A. Schnurer, A. Jarvis, *Microbiology of the Biogas process*, 2018.
- [58] M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, eds., *The Prokaryotes*, Springer New York, New York, NY, 2006. doi:10.1007/0-387-30747-8.
- [59] M. Szuhaj, N. Ács, R. Tengölics, A. Bodor, G. Rákhely, K.L. Kovács, Z. Bagi, Conversion of H₂ and CO₂ to CH₄ and acetate in fed-batch biogas reactors by mixed biogas community: A novel route for the power-to-gas concept, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016). doi:10.1186/s13068-016-0515-0.
- [60] C.D. Thakker, D.R. Ranade, An alkalophilic *Methanosarcina* isolated from Lonar crater, *Curr. Sci.* 82 (2002) 455–458.
- [61] Fachverband Biogas, EBA, BiPRO, Digestate and REACH. Position Paper, (2013). http://www.kompost-biogas.info/wp-content/uploads/2016/06/2013_11_28_position_paper_digestate_and_reach_en_final.pdf.
- [62] H. Feng, G.F. Qu, P. Ning, X.F. Xiong, L.J. Jia, Y.K. Shi, J. Zhang, The resource utilization of anaerobic fermentation residue, *Procedia Environ. Sci.* 11 (2011) 1092–1099. doi:10.1016/j.proenv.2011.12.165.
- [63] N. Prays, P. Dominik, A. Sanger, U. Franko, Biogas residue parameterization for soil organic matter modeling, *PLoS One.* 13 (2018) 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0204121.
- [64] K. Möller, T. Müller, Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review, *Eng. Life Sci.* 12 (2012) 242–257. doi:10.1002/elsc.201100085.
- [65] M.N. Khan, M. Mobin, Z.K. Abbas, S.A. Alamri, *Fertilizers and Their Contaminants in Soils, Surface and Groundwater*, Elsevier Inc., 2018. doi:10.1016/b978-0-12-809665-9.09888-8.
- [66] European Union, *The EU Nitrates Directive*, (2018) 1–4.
- [67] S. Banik, R. Nandi, Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom, *Ind. Crops Prod.* 20 (2004) 311–319. doi:10.1016/j.indcrop.2003.11.003.
- [68] T. Liu, L. Sun, Å. Nordberg, A. Schnürer, Substrate-Induced Response in Biogas Process Performance and Microbial Community Relates Back to Inoculum Source, *Microorganisms.* 6 (2018) 80. doi:10.3390/microorganisms6030080.
- [69] T. Al Seadi, C. Lukehurst, T. Al Saedi, C. Lukehurst, T. Al Seadi, C. Lukehurst, Quality management of digestate from biogas plants used as fertiliser, *IEA Bioenergy, Task.* (2012) 40. http://www.iea-biogas.net/files/daten-redaktion/download/publi-task37/digestate_quality_web_new.pdf.
- [70] L. Zhang, K.C. Loh, J.W. Lim, J. Zhang, Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 100 (2019) 110–126. doi:10.1016/j.rser.2018.10.021.

- [71] T. Thomas, J. Gilbert, F. Meyer, *Metagenomics - a guide from sampling to data analysis*, *Microb. Inform. Exp.* 2 (2012) 3. doi:10.1186/2042-5783-2-3.
- [72] J. Handelsman, M.R. Rondon, S.F. Brady, J. Clardy, R.M. Goodman, Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products, *Chem. Biol.* 5 (1998). doi:10.1016/S1074-5521(98)90108-9.
- [73] R. Wirth, E. Kovács, G. Maráti, Z. Bagi, G. Rákhely, K.L. Kovács, Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing, *Biotechnol. Biofuels.* 5 (2012) 1–16. doi:10.1186/1754-6834-5-41.
- [74] S. Campanaro, L. Treu, P.G. Kougias, G. Luo, I. Angelidaki, Metagenomic binning reveals the functional roles of core abundant microorganisms in twelve full-scale biogas plants, *Water Res.* 140 (2018) 123–134. doi:10.1016/j.watres.2018.04.043.
- [75] M.A. Quail, M. Smith, P. Coupland, T.D. Otto, S.R. Harris, T.R. Connor, A. Bertoni, H.P. Swerdlow, Y. Gu, A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers, *BMC Genomics* 2012, 13 (2012) 13. doi:10.1186/1471-2164-13-341.
- [76] B.E. Slatko, A.F. Gardner, F.M. Ausubel, Overview of Next Generation Sequencing technologies (and bioinformatics) in cancer, *Mol. Biol.* 122 (2018) 1–15. doi:10.1002/cpmb.59.Overview.
- [77] J.M. Rothberg, W. Hinz, T.M. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey, J.H. Leamon, K. Johnson, M.J. Milgrew, M. Edwards, J. Hoon, J.F. Simons, D. Marran, J.W. Myers, J.F. Davidson, A. Branting, J.R. Nobile, B.P. Puc, D. Light, T.A. Clark, M. Huber, J.T. Branciforte, I.B. Stoner, S.E. Cawley, M. Lyons, Y. Fu, N. Homer, M. Sedova, X. Miao, B. Reed, J. Sabina, E. Feierstein, M. Schorn, M. Alanjary, E. Dimalanta, D. Dressman, R. Kasinskas, T. Sokolsky, J.A. Fidanza, E. Namsaraev, K.J. McKernan, A. Williams, G.T. Roth, J. Bustillo, An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing, *Nature.* 475 (2011) 348–352. doi:10.1038/nature10242.
- [78] L. Zhang, K.-C. Loh, J.W. Lim, J. Zhang, Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 100 (2019) 110–126. doi:10.1016/j.rser.2018.10.021.
- [79] M. Calusinska, X. Goux, M. Fossépré, E.E.L. Muller, P. Wilmes, P. Delfosse, A year of monitoring 20 mesophilic full-scale bioreactors reveals the existence of stable but different core microbiomes in bio-waste and wastewater anaerobic digestion systems, *Biotechnol. Biofuels.* 11 (2018) 1–19. doi:10.1186/s13068-018-1195-8.
- [80] M. Kröber, T. Bekel, N.N. Diaz, A. Goesmann, S. Jaenicke, L. Krause, D. Miller, K.J. Runte, P. Viehöver, A. Pühler, A. Schlüter, 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 (2009) 38–49. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.010.
- [81] S. Campanaro, L. Treu, L.M. Rodriguez-R, A. Kovalovszki, R.M. Ziels, I. Maus, X. Zhu, P.G. Kougias, A. Basile, G. Luo, A. Schlüter, K.T. Konstantinidis, I. Angelidaki, The anaerobic digestion microbiome: a collection of 1600 metagenome-assembled genomes shows high species diversity related to methane production, *BioRxiv.* (2019) 680553. doi:10.1101/680553.
- [82] A. Hanreich, U. Schimpf, M. Zakrzewski, A. Schlüter, D. Benndorf, R. Heyer, E. Rapp, A. Pühler, U. Reichl, M. Klocke, Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation, *Syst. Appl. Microbiol.* 36 (2013) 330–338. doi:10.1016/j.syapm.2013.03.006.
- [83] L. Krause, N.N. Diaz, R.A. Edwards, K.H. Gartemann, H. Krömeke, H. Neuweger, A. Pühler, K.J. Runte, A. Schlüter, J. Stoye, R. Szczepanowski, A. Tauch, A. Goesmann, *Taxonomic*

- composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor, *J. Biotechnol.* 136 (2008) 91–101. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.06.003.
- [84] N. Ács, M. Szuhaj, R. Wirth, Z. Bagi, G. Maróti, G. Rákhely, K.L. Kovács, Microbial Community Rearrangements in Power-to-Biomethane Reactors Employing Mesophilic Biogas Digestate, *Front. Energy Res.* 7 (2019) 1–15. doi:10.3389/fenrg.2019.00132.
- [85] I. Bassani, P.G. Kougias, L. Treu, I. Angelidaki, Biogas Upgrading via Hydrogenotrophic Methanogenesis in Two-Stage Continuous Stirred Tank Reactors at Mesophilic and Thermophilic Conditions, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 12585–12593. doi:10.1021/acs.est.5b03451.
- [86] V. Corbellini, P.G. Kougias, L. Treu, I. Bassani, F. Malpei, I. Angelidaki, Hybrid biogas upgrading in a two-stage thermophilic reactor, *Energy Convers. Manag.* 168 (2018) 1–10. doi:10.1016/j.enconman.2018.04.074.
- [87] A. Petersson, A. Wellinger, Biogas upgrading technologies – developments and innovations Task 37 -Energy from biogas and landfill gas IeA Bioenergy aims to accelerate the use of environmental sound and cost-competitive Bioenergy on a sustainable basis, and thereby achieve a substant, *IEA Bioenergy.* (2009) 13. http://www.build-a-biogas-plant.com/PDF/IEA_Biogas_technologies.pdf.
- [88] E. Ryckebosch, M. Drouillon, H. Vervaeren, Techniques for transformation of biogas to biomethane, *Biomass and Bioenergy.* 35 (2011) 1633–1645. doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.033.
- [89] R. Muñoz, L. Meier, I. Diaz, D. Jeison, A review on the state-of-the-art of physical/chemical and biological technologies for biogas upgrading, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14 (2015) 727–759. doi:10.1007/s11157-015-9379-1.
- [90] P. Cozma, W. Wukovits, I. Mămăligă, A. Friedl, M. Gavrilescu, Modeling and simulation of high pressure water scrubbing technology applied for biogas upgrading, *Clean Technol. Environ. Policy.* 17 (2014). doi:10.1007/s10098-014-0787-7.
- [91] Q. Sun, H. Li, J. Yan, L. Liu, Z. Yu, X. Yu, Selection of appropriate biogas upgrading technology-a review of biogas cleaning, upgrading and utilisation, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 51 (2015) 521–532. doi:10.1016/j.rser.2015.06.029.
- [92] L. Tock, M. Gassner, F. Maréchal, Thermochemical production of liquid fuels from biomass: Thermo-economic modeling, process design and process integration analysis, *Biomass and Bioenergy.* 34 (2010) 1838–1854. doi:10.1016/j.biombioe.2010.07.018.
- [93] F. Bauer, C. Hulteberg, T. Persson, D. Tamm, Biogas upgrading-Review of commercial technologies (Biogasupppgradering-Granskning av kommersiella tekniker) SGC Rapport, (2013) 270.
- [94] D. Thrän, E. Billig, T. Persson, M. Svensson, J. Daniel-Gromke, J. Ponitka, M. Seiffert, J. Baldwin, L. Kranzl, F. Schipfer, J. Matzenberger, Biomethane Status and Factors Affecting Market Development and Trade, 2014. <http://www.iea-biogas.net/files/daten-redaktion/download/Technical>.
- [95] D. Andriani, A. Wresta, T.D. Atmaja, A. Saepudin, A review on optimization production and upgrading biogas through CO₂ removal using various techniques, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 1909–1928. doi:10.1007/s12010-013-0652-x.
- [96] R. Augelletti, M. Conti, M.C. Annesini, Pressure swing adsorption for biogas upgrading. A new process configuration for the separation of biomethane and carbon dioxide, *J. Clean. Prod.* 140 (2017) 1390–1398. doi:10.1016/j.jclepro.2016.10.013.
- [97] O.W. Awe, Y. Zhao, A. Nzihou, D.P. Minh, N. Lyczko, A Review of Biogas Utilisation, Purification and Upgrading Technologies, *Waste and Biomass Valorization.* 8 (2017) 267–283. doi:10.1007/s12649-016-9826-4.

- [98] S. Basu, A.L. Khan, A. Cano-Odena, C. Liu, I.F.J. Vankelecom, Membrane-based technologies for biogas separations, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 750–768. doi:10.1039/b817050a.
- [99] A.M. Yousef, W.M. El-Maghlany, Y.A. Eldrainy, A. Attia, New approach for biogas purification using cryogenic separation and distillation process for CO₂ capture, *Energy*. 156 (2018) 328–351. doi:10.1016/j.energy.2018.05.106.
- [100] L. Bailón, J. Hinge, Biogas and bio-syngas upgrading, DTI Rep. (2012) 1–97. http://www.teknologisk.dk/_root/media/52679_Report-Biogas and syngas upgrading.pdf.
- [101] N. Johansson, C. Carlsson, Production of liquid biogas, LBG, with cryogenic and conventional upgrading technology -Description of systems and evaluations of energy balances, Master Thesis. (2008).
- [102] H. Window, O. Mountains, *MOL Scientific Magazine* 2008 / 3 1, (2008).
- [103] M. Blaut, Metabolism of methanogens, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66 (1994) 187–208. doi:10.1007/BF00871639.
- [104] N. Aryal, T. Kvist, F. Ammam, D. Pant, L.D.M. Ottosen, An overview of microbial biogas enrichment, *Bioresour. Technol.* 264 (2018) 359–369. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.013.
- [105] P.G. Kougiass, L. Treu, D. Peñailillo, K. Boe, S. Campanaro, I. Angelidaki, Ex-situ biogas upgrading and enhancement in different reactor systems, *Bioresour. Technol.* 225 (2017) 429–437. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.124.
- [106] L.M. Agneessens, L.D.M. Ottosen, N.V. Voigt, J.L. Nielsen, N. de Jonge, C.H. Fischer, M.V.W. Kofoed, In-situ biogas upgrading with pulse H₂ additions: The relevance of methanogen adaption and inorganic carbon level, *Bioresour. Technol.* 233 (2017) 256–263. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.016.
- [107] S. Fukuzaki, N. Nishio, M. Shobayashi, S. Nagai, Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 719–723.
- [108] G. Luo, I. Angelidaki, Integrated biogas upgrading and hydrogen utilization in an anaerobic reactor containing enriched hydrogenotrophic methanogenic culture, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 2729–2736. doi:10.1002/bit.24557.
- [109] L. LG, H. Wood, Synthesis of acetate from CO₂ by heterotrophic bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 23 (1969) 515–538.
- [110] S.W. Ragsdale, E. Pierce, NIH Public Access, *Biochim. Biophys. Acta*. 1784 (2009) 1873–1898. doi:10.1016/j.bbapap.2008.08.012.Acetogenesis.
- [111] G. Luo, S. Johansson, K. Boe, L. Xie, Q. Zhou, I. Angelidaki, Simultaneous hydrogen utilization and in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1088–1094. doi:10.1002/bit.24360.
- [112] J.A. Raven, C.S. Cockell, C.L. De La Rocha, The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363 (2008) 2641–2650. doi:10.1098/rstb.2008.0020.
- [113] J.C. López, G. Quijano, T.S.O. Souza, J.M. Estrada, R. Lebrero, R. Muñoz, Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: State of the art and challenges, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 2277–2303. doi:10.1007/s00253-013-4734-z.
- [114] M. Rivas, D. Jeison, ScienceDirect Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading, 3 (2014) 3–10. doi:10.1016/j.biombioe.2014.10.032.
- [115] A.C. Guedes, H.M. Amaro, F.X. Malcata, Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work, *Biotechnol. Prog.* 27 (2011) 597–613. doi:10.1002/btpr.575.
- [116] J.H. Mussnug, V. Klassen, A. Schlüter, O. Kruse, Microalgae as substrates for fermentative

- biogas production in a combined biorefinery concept, *J. Biotechnol.* 150 (2010) 51–56. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.030.
- [117] R. Wirth, G. Lakatos, G. Maróti, Z. Bagi, J. Minárovics, K. Nagy, É. Kondorosi, G. Rákhely, K.L. Kovács, Exploitation of algal-bacterial associations in a two-stage biohydrogen and biogas generation process Philippe Soucaille, *Biotechnol. Biofuels.* 8 (2015) 1–14. doi:10.1186/s13068-015-0243-x.
- [118] R. Wirth, G. Lakatos, T. Böjti, G. Maróti, Z. Bagi, M. Kis, A. Kovács, N. Ács, G. Rákhely, K.L. Kovács, Metagenome changes in the mesophilic biogas-producing community during fermentation of the green alga *Scenedesmus obliquus*, *J. Biotechnol.* 215 (2015) 52–61. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.396.
- [119] M.T. Agler, B.A. Wrenn, S.H. Zinder, L.T. Angenent, Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 70–78. doi:10.1016/j.tibtech.2010.11.006.
- [120] M. Devarapalli, H.K. Atiyeh, J.R. Phillips, R.S. Lewis, R.L. Huhnke, Ethanol production during semi-continuous syngas fermentation in a trickle bed reactor using *Clostridium ragsdalei*, *Bioresour. Technol.* 209 (2016) 56–65. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.086.
- [121] Y.Q. Nie, H. Liu, G.C. Du, J. Chen, Acetate yield increased by gas circulation and fed-batch fermentation in a novel syntrophic acetogenesis and homoacetogenesis coupling system, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 2989–2995. doi:10.1016/j.biortech.2007.06.018.
- [122] J.G. Zeikus, M.K. Jain, P. Elankovan, Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 545–552. doi:10.1007/s002530051431.
- [123] I.B. Gunnarsson, M. Alvarado-Morales, I. Angelidaki, Utilization of CO₂fixating bacterium *Actinobacillus succinogenes* 130Z for simultaneous biogas upgrading and biosuccinic acid production, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 12464–12468. doi:10.1021/es504000h.
- [124] D. Call, C.S. Butler, D.R. Lovley, How to Sustainably Feed a Microbe : Strategies for Biological Production of Carbon-Based Commodities with Renewable Electricity, 7 (2016) 1–6. doi:10.3389/fmicb.2016.01879.
- [125] M.C.A.A. Van Eerten-Jansen, A.B. Veldhoen, C.M. Plugge, A.J.M. Stams, C.J.N. Buisman, A. Ter Heijne, Microbial community analysis of a methane-producing biocathode in a bioelectrochemical system, *Archaea.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/481784.
- [126] H. Wang, Z.J. Ren, A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1796–1807. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2013.10.001.
- [127] X. Zhu, B.E. Logan, Microbial electrolysis desalination and chemical-production cell for CO₂ sequestration, *Bioresour. Technol.* 159 (2014) 24–29. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.062.
- [128] A. Kokkoli, Y. Zhang, I. Angelidaki, Microbial electrochemical separation of CO₂ for biogas upgrading, *Bioresour. Technol.* 247 (2018) 380–386. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.097.
- [129] Y. Lu, M. Qin, H. Yuan, I.M. Abu-Reesh, Z. He, When bioelectrochemical systems meet forward osmosis: Accomplishing wastewater treatment and reuse through synergy, *Water (Switzerland).* 7 (2015) 38–50. doi:10.3390/w7010038.
- [130] S. Cheng, D. Xing, D.F. Call, B.E. Logan, Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3953–3958. doi:10.1021/es803531g.
- [131] M. Villano, F. Aulenta, C. Ciucci, T. Ferri, A. Giuliano, M. Majone, Bioelectrochemical reduction of CO₂ to CH₄ via direct and indirect extracellular electron transfer by a hydrogenophilic methanogenic culture, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3085–3090. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.077.

- [132] A. Kadier, Y. Simayi, P. Abdeshahian, N.F. Azman, K. Chandrasekhar, M.S. Kalil, A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production, *Alexandria Eng. J.* 55 (2016) 427–443. doi:10.1016/j.aej.2015.10.008.
- [133] M. Götz, J. Lefebvre, F. Mörs, A. McDaniel Koch, F. Graf, S. Bajohr, R. Reimert, T. Kolb, Renewable Power-to-Gas: A technological and economic review, *Renew. Energy.* 85 (2016) 1371–1390. doi:10.1016/j.renene.2015.07.066.
- [134] M. Thema, F. Bauer, M. Sterner, Power-to-Gas: Electrolysis and methanation status review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 112 (2019) 775–787. doi:10.1016/j.rser.2019.06.030.
- [135] L.T. Angenent, M.R. Martin, L. Mets, J.J. Fornero, R. Stark, A Single-Culture Bioprocess of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* to Upgrade Digester Biogas by CO₂-to-CH₄ Conversion with H₂, *Archaea.* 2013 (2013) 1–11. doi:10.1155/2013/157529.
- [136] J.G. Zeikus, R.S. Wolfe, *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile., *J. Bacteriol.* 109 (1972) 707–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4550816> (accessed July 5, 2017).
- [137] Electrochaea GmbH, Munich-based clean-tech startup Electrochaea and Hungarian utility MVM establish power-to-gas joint venture, (2016) 1–2. http://www.electrochaea.com/wp-content/uploads/2016/10/20161024_PI_Electrochaea_MVM_Joint_Venture.pdf.
- [138] I. Bassani, P.G. Kougiyas, L. Treu, H. Porté, S. Campanaro, I. Angelidaki, Optimization of hydrogen dispersion in thermophilic up-flow reactors for ex situ biogas upgrading, *Bioresour. Technol.* 234 (2017) 310–319. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.055.
- [139] L.M. Agneessens, L.D.M. Ottosen, N.V. Voigt, J.L. Nielsen, N. de Jonge, C.H. Fischer, M.V.W. Kofoed, In-situ biogas upgrading with pulse H₂ additions: The relevance of methanogen adaption and inorganic carbon level, *Bioresour. Technol.* 233 (2017) 256–263. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.016.
- [140] D. Strübing, B. Huber, M. Leubhn, J.E. Drewes, High performance biological methanation in thermophilic anaerobic trickle bed reactors, *Bioresour. Technol.* (2017). doi:10.1016/j.biortech.2017.08.088.
- [141] A.J. Guneratnam, E. Ahern, J.A. FitzGerald, S.A. Jackson, A. Xia, A.D.W. Dobson, J.D. Murphy, Study of the performance of a thermophilic biological methanation system, *Bioresour. Technol.* 225 (2017) 308–315. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.066.
- [142] J.P. Peillex, M.L. Fardeau, R. Boussand, J.M. Navarro, J.P. Belaich, Growth of *Methanococcus thermolithotrophicus* in batch and continuous culture on H₂ and CO₂: influence of agitation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 (1988) 560–564. doi:10.1007/BF00260985.
- [143] G. Luo, I. Angelidaki, Hollow fiber membrane based H₂ diffusion for efficient in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 3739–3744. doi:10.1007/s00253-013-4811-3.
- [144] I. Bassani, P.G. Kougiyas, I. Angelidaki, In-situ biogas upgrading in thermophilic granular UASB reactor: key factors affecting the hydrogen mass transfer rate, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 485–491. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.083.
- [145] L. Rachbauer, G. Voithl, G. Bochmann, W. Fuchs, Biological biogas upgrading capacity of a hydrogenotrophic community in a trickle-bed reactor, *Appl. Energy.* 180 (2016) 483–490. doi:10.1016/j.apenergy.2016.07.109.
- [146] L. Rachbauer, R. Beyer, G. Bochmann, W. Fuchs, Characteristics of adapted hydrogenotrophic community during biomethanation, *Sci. Total Environ.* 595 (2017) 912–919. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.074.
- [147] M. Burkhardt, G. Busch, Methanation of hydrogen and carbon dioxide, *Appl. Energy.* 111 (2013) 74–79. doi:10.1016/j.apenergy.2013.04.080.

- [148] D. Strübing, B. Huber, M. Lebuhn, J.E. Drewes, K. Koch, High performance biological methanation in a thermophilic anaerobic trickle bed reactor, *Bioresour. Technol.* 245 (2017) 1176–1183. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.088.
- [149] D.E. Kimmel, K.T. Klasson, E.C. Clausen, J.L. Gaddy, Performance of trickle-bed bioreactors for converting synthesis gas to methane, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28–29 (1991) 457–469. doi:10.1007/BF02922625.
- [150] N. Nishimura, S. Kitaura, A. Mimura, Y. Takahara, Cultivation of thermophilic methanogen KN-15 on H₂-CO₂ under pressurized conditions, *J. Ferment. Bioeng.* 73 (1992) 477–480. doi:10.1016/0922-338X(92)90141-G.
- [151] M.B. Jensen, M.V.W. Kofoed, K. Fischer, N.V. Voigt, L.M. Agneessens, D.J. Batstone, L.D.M. Ottosen, Venturi-type injection system as a potential H₂ mass transfer technology for full-scale in situ biomethanation, *Appl. Energy.* 222 (2018) 840–846. doi:10.1016/j.apenergy.2018.04.034.
- [152] E. Garcia-Robledo, L.D.M. Ottosen, N. V. Voigt, M.W. Kofoed, N.P. Revsbech, Micro-scale H₂-CO₂ dynamics in a hydrogenotrophic methanogenic membrane reactor, *Front. Microbiol.* 7 (2016). doi:10.3389/fmicb.2016.01276.
- [153] K. Hassmann, Primary energy sources for hydrogen production, 18 (1993) 635–640.
- [154] S. Sharma, S.K. Ghoshal, Hydrogen the future transportation fuel: From production to applications, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 43 (2015) 1151–1158. doi:10.1016/j.rser.2014.11.093.
- [155] I.K. Kapdan, F. Kargi, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 569–582. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015.
- [156] P.P. Edwards, V.L. Kuznetsov, W.I.F. David, N.P. Brandon, Hydrogen and fuel cells: Towards a sustainable energy future, *Energy Policy.* 36 (2008) 4356–4362. doi:10.1016/j.enpol.2008.09.036.
- [157] J.D. Holladay, J. Hu, D.L. King, Y. Wang, An overview of hydrogen production technologies, *Catal. Today.* 139 (2009) 244–260. doi:10.1016/j.cattod.2008.08.039.
- [158] A. Herzog, M. Tatsutani, A HYDROGEN FUTURE? An Economic and Environmental Assessment of Hydrogen Production Pathways, *Nat. Resour. Def. Counc. Issue Pap.* (2005) 23.
- [159] B. Viswanathan, Hydrogen Storage, *Energy Sources.* (2017) 185–212. doi:10.1016/B978-0-444-56353-8.00010-1.
- [160] A. Züttel, Hydrogen storage methods, *Naturwissenschaften.* 91 (2004) 157–172. doi:10.1007/s00114-004-0516-x.
- [161] O.Y. Ako, Y. Kitamura, K. Intabon, T. Satake, Steady state characteristics of acclimated hydrogenotrophic methanogens on inorganic substrate in continuous chemostat reactors, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 6305–6310. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.016.
- [162] A. Salakkam, P. Plangklang, S. Sittijunda, M. Boonmee Kongkeitkajorn, S. Lunprom, A. Reungsang, Bio-hydrogen and Methane Production from Lignocellulosic Materials, *Biomass Bioenergy - Recent Trends Futur. Challenges [Working Title].* (2019). doi:10.5772/intechopen.85138.
- [163] D.J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, S. V Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T.M. Sanders, H. Siegrist, V.A. Vavilin, The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1), *Water Sci. Technol.* 45 (2002) 65–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12188579>.
- [164] Y. Liu, W.B. Whitman, Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125 (2008) 171–189. doi:10.1196/annals.1419.019.
- [165] D. Deubelin, A. Steinhäuser, Biorefineries – Industrial Biological Wastewater Artificial Photosynthesis Renewables - Based Beyond Oil and Gas, 2008.

- [166] A. Caballero, P.J. Pérez, Methane as raw material in synthetic chemistry: The final frontier, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 8809–8820. doi:10.1039/c3cs60120j.
- [167] D.J. Wuebbles, K. Hayhoe, Atmospheric methane and global change, 57 (2002) 177–210.
- [168] M. Saunois, A.R. Stavert, B. Poulter, P. Bousquet, J.G. Canadell, R.B. Jackson, P.A. Raymond, E.J. Dlugokencky, S. Houweling, P.K. Patra, P. Ciais, V.K. Arora, D. Bastviken, P. Bergamaschi, D.R. Blake, G. Brailsford, L. Bruhwiler, K.M. Carlson, M. Carrol, S. Castaldi, N. Chandra, C. Crevoisier, P.M. Crill, K. Covey, C.L. Curry, G. Etiope, C. Frankenberg, N. Gedney, M.I. Hegglin, L. Höglund-Isaksson, G. Hugelius, M. Ishizawa, A. Ito, G. Janssens-Maenhout, K.M. Jensen, F. Joos, T. Kleinen, P.B. Krummel, R.L. Langenfelds, G.G. Laruelle, L. Liu, T. Machida, S. Maksyutov, K.C. McDonald, J. McNorton, P.A. Miller, J.R. Melton, I. Morino, J. Müller, F. Murguía-Flores, V. Naik, Y. Niwa, S. Noce, S. O’Doherty, R.J. Parker, C. Peng, S. Peng, G.P. Peters, C. Prigent, R. Prinn, M. Ramonet, P. Regnier, W.J. Riley, J.A. Rosentreter, A. Segers, I.J. Simpson, H. Shi, S.J. Smith, L.P. Steele, B.F. Thornton, H. Tian, Y. Tohjima, F.N. Tubiello, A. Tsuruta, N. Viovy, A. Voulgarakis, T.S. Weber, M. van Weele, G.R. van der Werf, R.F. Weiss, D. Worthy, D. Wunch, Y. Yin, Y. Yoshida, W. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhao, B. Zheng, Q. Zhu, Q. Zhu, Q. Zhuang, The Global Methane Budget 2000–2017, *Earth Syst. Sci. Data.* 12 (2020) 1561–1623. doi:10.5194/essd-12-1561-2020.
- [169] Global Methane Initiative, Global Methane Emissions and Mitigation Opportunities, *Glob. Methane Initiat.* 2020 (2010) 1–4. <https://www.globalmethane.org/documents/gmi-mitigation-factsheet.pdf>.
- [170] P. Ciais, C. Sabine, G. Bala, L. Bopp, V. Brovkin, J. Canadell, A. Chhabra, R. DeFries, J. Galloway, M. Heimann, C. Jones, C. Le Quéré, R.B. Myneni, S. Piao, P. Thornton, The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, *Chang. IPCC Clim.* (2013) 465–570. doi:10.1017/CBO9781107415324.015.
- [171] A. van Amstel, Methane. A review, *J. Integr. Environ. Sci.* 9 (2012) 5–30. doi:10.1080/1943815X.2012.694892.
- [172] D.R. Boone, Biological Formation and Consumption of Methane. In: Khalil M.A.K. (eds) *Atmospheric Methane.*, (2000) 42–62.
- [173] C.K. McCalley, B.J. Woodcroft, S.B. Hodgkins, R.A. Wehr, E.H. Kim, R. Mondav, P.M. Crill, J.P. Chanton, V.I. Rich, G.W. Tyson, S.R. Saleska, Methane dynamics regulated by microbial community response to permafrost thaw, *Nature.* 514 (2014) 478–481. doi:10.1038/nature13798.
- [174] C. Tamocai, J.G. Canadell, E.A.G. Schuur, P. Kuhry, G. Mazhitova, S. Zimov, Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region, *Global Biogeochem. Cycles.* 23 (2009) 1–11. doi:10.1029/2008GB003327.
- [175] L. Sun, Y. Wang, N. Guan, L. Li, Methane Activation and Utilization: Current Status and Future Challenges, *Energy Technol.* 8 (2020) 1–13. doi:10.1002/ente.201900826.
- [176] N.J.H. Aversch, F. Kracke, Metabolic network analysis of microbial methane utilization for biomass formation and upgrading to bio-fuels, *Front. Energy Res.* 6 (2018). doi:10.3389/fenrg.2018.00106.
- [177] P.J. Strong, S. Xie, W.P. Clarke, Methane as a resource: Can the methanotrophs add value?, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 4001–4018. doi:10.1021/es504242n.
- [178] A. Boetius, K. Ravenschlag, C.J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gleeske, R. Amann, B.B. Jorgensen, U. Witte, O. Pfannkuche, A marine microbial consortium apparently mediating AOM., *Nature.* 407 (2000) 623–626. www.nature.com.
- [179] D.A. Vallero, Air pollution biogeochemistry, 2019. doi:10.1016/b978-0-12-814934-8.00008-9.
- [180] J.K. Stolaro, S. Bhattacharyya, C.A. Smith, W.L. Bourcier, P.J. Cameron-smith, R.D. Aines, Rapid Release of Methane from the Arctic, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6455–6469.

- [181] P. Menzel, K.L. Ng, A. Krogh, Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju, *Nat. Commun.* 7 (2016). doi:10.1038/ncomms11257.
- [182] D.H. Huson, S. Beier, I. Flade, A. Górska, M. El-Hadidi, S. Mitra, H.J. Ruscheweyh, R. Tappu, MEGAN community edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data, *PLoS Comput. Biol.* 12 (2016) 1–12. doi:10.1371/journal.pcbi.1004957.
- [183] I. Letunic, P. Bork, Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) 256–259. doi:10.1093/nar/gkz239.
- [184] A.M. Eren, O.C. Esen, C. Quince, J.H. Vineis, H.G. Morrison, M.L. Sogin, T.O. Delmont, Anvi'o: An advanced analysis and visualization platform for 'omics data, *PeerJ.* 2015 (2015) 1–29. doi:10.7717/peerj.1319.
- [185] L.J.H. Doug Hyatt, Gwo-Liang Chen, Philip F LoCascio, Miriam L Land, , Frank W Larimer, Integrated nr Database in Protein Annotation System and Its Localization, *Nat. Commun.* 6 (2010) 1–8. doi:10.3389/fgene.2015.00348.
- [186] R.D. Finn, J. Clements, S.R. Eddy, HMMER web server: Interactive sequence similarity searching, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 29–37. doi:10.1093/nar/gkr367.
- [187] A. Bateman, The Pfam protein families database, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 138D – 141. doi:10.1093/nar/gkh121.
- [188] L.Y. Geer, A. Marchler-Bauer, R.C. Geer, L. Han, J. He, S. He, C. Liu, W. Shi, S.H. Bryant, The NCBI BioSystems database, *Nucleic Acids Res.* 38 (2009) 492–496. doi:10.1093/nar/gkp858.
- [189] E. Quevillon, V. Silventoinen, S. Pillai, N. Harte, N. Mulder, R. Apweiler, R. Lopez, InterProScan: Protein domains identifier, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 116–120. doi:10.1093/nar/gki442.
- [190] J. Alneberg, B.S. Bjarnason, I. de Bruijn, M. Schirmer, J. Quick, U.Z. Ijaz, N.J. Loman, A.F. Andersson, C. Quince, CONCOCT: Clustering cONtigs on COverage and ComposiTiON, (2013) 1–28. <http://arxiv.org/abs/1312.4038>.
- [191] D.D. Kang, J. Froula, R. Egan, Z. Wang, MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities, *PeerJ.* 2015 (2015) 1–15. doi:10.7717/peerj.1165.
- [192] Y.-W. Wu, Y.-H. Tang, S.G. Tringe, B.A. Simmons, S.W. Singer, MaxBin: an automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using, *Microbiome.* 2 (2014) 4904–4909. doi:10.1073/pnas.1402564111.
- [193] D.G. Mulat, F. Mosbæk, A.J. Ward, D. Polag, M. Greule, F. Keppler, J.L. Nielsen, A. Feilberg, Exogenous addition of H₂ for an in situ biogas upgrading through biological reduction of carbon dioxide into methane, *Waste Manag.* 68 (2017) 146–156. doi:10.1016/j.wasman.2017.05.054.
- [194] W. Wang, L. Xie, G. Luo, Q. Zhou, I. Angelidaki, Performance and microbial community analysis of the anaerobic reactor with coke oven gas biomethanation and in situ biogas upgrading, *Bioresour. Technol.* 146 (2013) 234–239. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.049.
- [195] S. Kim, K. Choi, J. Chung, Reduction in carbon dioxide and production of methane by biological reaction in the electronics industry, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2013) 3488–3496. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.007.
- [196] J.C. Lee, J.H. Kim, W.S. Chang, D. Pak, Biological conversion of CO₂ to CH₄ using hydrogenotrophic methanogen in a fixed bed reactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87 (2012) 844–847. doi:10.1002/jctb.3787.
- [197] A. Lemmer, T. Ullrich, Effect of different operating temperatures on the biological hydrogen methanation in trickle bed reactors, *Energies.* 11 (2018) 6–8. doi:10.3390/en11061344.
- [198] N. Buan, G. Kulkarni, W. Metcalf, Genetic methods for Methanosarcina species, 1st ed., Elsevier Inc., 2011. doi:10.1016/B978-0-12-385112-3.00002-0.

- [199] F.R. Bengelsdorf, M.H. Beck, C. Erz, S. Hoffmeister, M.M. Karl, P. Riegler, S. Wirth, A. Poehlein, D. Weuster-Botz, P. Dürre, Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO₂ + H₂ Fermentation, *Adv. Appl. Microbiol.* 103 (2018) 143–221. doi:10.1016/bs.aambs.2018.01.002.
- [200] H. Imachi, S. Sakai, T. Kubota, M. Miyazaki, Y. Saito, K. Takai, *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (2016) 1293–1300. doi:10.1099/ijsem.0.000878.
- [201] D.E. Koeck, W. Ludwig, G. Wanner, V. V. Zverlov, W. Liebl, W.H. Schwarz, *Herbinix hemicellulosilytica* gen. Nov, sp. nov, a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (2015) 2365–2371. doi:10.1099/ijms.0.000264.
- [202] D.E. Koeck, S. Hahnke, V. V. Zverlov, *Herbinix luporum* sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (2016) 4132–4137. doi:10.1099/ijsem.0.001324.
- [203] J. Winter, E. Braun, H.P. Zabel, *Acetomicrobium faecalis* spec. nov., a strictly anaerobic bacterium from sewage sludge, producing ethanol from pentoses, *Syst. Appl. Microbiol.* 9 (1987) 71–76. doi:10.1016/S0723-2020(87)80058-9.
- [204] L. Solli, O.E. Håvelsrud, S.J. Horn, A.G. Rike, A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors, *Biotechnol. Biofuels.* 7 (2014) 1–15. doi:10.1186/s13068-014-0146-2.
- [205] E. Pelletier, A. Kreimeyer, S. Bocs, Z. Rouy, G. Gyapay, R. Chouari, D. Rivière, A. Ganesan, P. Daegelen, A. Sghir, G.N. Cohen, C. Médigue, J. Weissenbach, D. Le Paslier, “*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*”: Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 2572–2579. doi:10.1128/JB.01248-07.
- [206] A. Wasserfallen, J. Nölling, P. Pfister, J. Reeve, E.C. De Macario, Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* comb. nov., *Methano*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (2000) 43–53. doi:10.1099/00207713-50-1-43.
- [207] J.L.A. Pennings, J.T. Keltjens, G.D. Vogels, Isolation and characterization of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH mutants unable to grow under hydrogen-deprived conditions, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2676–2681. doi:10.1128/jb.180.10.2676-2681.1998.
- [208] Y. Wang, J. Song, Y. Zhai, C. Zhang, J. Gerritsen, H. Wang, X. Chen, Y. Li, B. Zhao, B. Zhao, Z. Ruan, *Romboutsia sedimentorum* sp. nov., isolated from an alkaline-saline lake sediment and emended description of the genus *Romboutsia*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (2015) 1193–1198. doi:10.1099/ijms.0.000079.
- [209] K.M. Ritalahti, S.D. Justicia-Leon, K.D. Cusick, N. Ramos-Hernandez, M. Rubin, J. Dornbush, F.E. Löffler, *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (2011) 210–216. doi:10.1099/ijms.0.023986-0.
- [210] O. Troshina, V. Oshurkova, N. Suzina, A. Machulin, E. Ariskina, N. Vinokurova, D. Kopitsyn, A. Novikov, V. Shcherbakova, *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* J101, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (2015) 4315–4322. doi:10.1099/ijsem.0.000575.
- [211] L. Sun, M. Toyonaga, A. Ohashi, D.M. Turlousse, N. Matsuura, X.Y. Meng, H. Tamaki, S. Hanada, R. Cruz, T. Yamaguchi, Y. Sekiguchi, *Lentimicrobium saccharophilum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum bacteroidetes, and proposal of *lentimicrobiaceae* fam. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (2016) 2635–2642.

doi:10.1099/ijsem.0.001103.

- [212] T. Aüllo, A. Ranchou-Peyruse, B. Ollivier, M. Magot, *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments, *Front. Microbiol.* 4 (2013) 1–12. doi:10.3389/fmicb.2013.00362.
- [213] J. Kuever, F.A. Rainey, H. Hippe, Description of *Desulfotomaculum* sp. Groll as *Desulfotomaculum gibsoniae* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 1801–1808. doi:10.1099/00207713-49-4-1801.
- [214] A. Bouanane-Darenfed, W. Ben Hania, J.L. Cayol, B. Ollivier, M.L. Fardeau, Reclassification of *acetomicrobium faecale* as *caldicoprobacter faecalis* comb. Nov, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (2015) 3286–3288. doi:10.1099/ijsem.0.000409.
- [215] M. Grazia Fortina, R. Pukall, P. Schumann, D. Mora, C. Parini, P. Luigi Manachini, E. Stackebrandt, *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 447–455. doi:10.1099/ijse.0.66507-0.
- [216] H.Y. Weon, S.Y. Lee, B.Y. Kim, H.J. Noh, P. Schumann, J.S. Kim, S.W. Kwon, *Ureibacillus composti* sp. nov. and *Ureibacillus thermophilus* sp. nov., isolated from livestock-manure composts, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 2908–2911. doi:10.1099/ijse.0.65232-0.
- [217] H. Shiratori, H. Ohiwa, H. Ikeno, S. Ayame, N. Kataoka, A. Miya, T. Beppu, K. Ueda, *Lutispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming bacterium isolated from a thermophilic methanogenic bioreactor digesting municipal solid wastes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 964–969. doi:10.1099/ijse.0.65490-0.
- [218] M.D. Collins, P.A. Lawson, A. Willems, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, J.A.E. Farrow, The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 (1994) 812–826. doi:10.1099/00207713-44-4-812.
- [219] C.R. Waldron, C.A. Becker-Vallone, D.E. Eveleigh, Isolation and characterization of a cellulolytic actinomycete *Microbispora bispora*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 (1986) 477–486. doi:10.1007/BF00250327.
- [220] Y. Li, F. Chen, K. Dong, G. Wang, *Actinotalea ferrariae* sp. nov., isolated from an iron mine, and emended description of the genus *Actinotalea*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63 (2013) 3398–3403. doi:10.1099/ijse.0.048512-0.
- [221] E. Stackebrandt, O. Kandler, Taxonomy of the genus *Cellulomonas*, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29 (1979) 273–282. doi:10.1099/00207713-29-4-273.
- [222] Y. Sekiguchi, H. Imachi, A. Susilorukmi, M. Muramatsu, A. Ohashi, H. Harada, S. Hanada, Y. Kamagata, *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (2006) 1621–1629. doi:10.1099/ijse.0.64112-0.
- [223] M.J. McInerney, M.P. Bryant, R.B. Hespell, J.W. Costerton, *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 1029–1039. doi:10.1128/aem.41.4.1029-1039.1981.
- [224] M. Baudrexl, W.H. Schwarz, V. V. Zverlov, W. Liebl, Biochemical characterisation of four rhamnosidases from thermophilic bacteria of the genera *Thermotoga*, *Caldicellulosiruptor* and *Thermoclostridium*, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–12. doi:10.1038/s41598-019-52251-0.
- [225] H. Yokohama, I.D. Wagner, J. Wiegel, *Caldicoprobacter oshimai* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, xylanolytic, extremely thermophilic bacterium isolated from sheep faeces, and proposal of *Caldicoprobacteraceae* fam. nov, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (2010) 67–71.

doi:10.1099/ijs.0.011379-0.

- [226] S. Ji, B. Wang, M. Lu, F. Li, *Defluviitalea phaphyphila*, 82 (2016) 868–877. doi:10.1128/AEM.03297-15.Editor.
- [227] J. Winter, C. Lerp, H.P. Zabel, F.X. Wildenauer, H. König, F. Schindler, *Methanobacterium wolfei*, sp. nov., a New Tungsten-Requiring, Thermophilic, Autotrophic Methanogen, *Syst. Appl. Microbiol.* 5 (1984) 457–466. doi:10.1016/S0723-2020(84)80003-X.
- [228] S.H. Zinder, K.R. Sowers, J.G. Ferry, *Methanosarcina thevmophila* sp. nov. a Thermophilic, Acetotrophic, Methane-Producing Bacterium, (1985) 522–523.
- [229] C. Bagnara, J.P.B. R. Toci, C. Gaudin, Isolation and Characterization of a Cellulolytic Microorganism, *Cellulomonas fermentans* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35 (1985) 502-507 0020-7713/85/O40502–06\$02 .OO/O Vol. doi:10.1007/BF00250327.
- [230] H. Yi, P. Schumann, J. Chun, *Demequina aestuarii* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the suborder Micrococccineae, and reclassification of *Cellulomonas fermentans* Bagnara et al. 1985 as *Actinotalea fermentans* gen. nov., comb. nov, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 151–156. doi:10.1099/ijs.0.64525-0.
- [231] A.I. Adnan, M.Y. Ong, S. Nomanbhay, K.W. Chew, Technologies for Biogas Upgrading to Biomethane : A Review, (2019) 1–24. doi:10.3390/bioengineering6040092.

8 Ph.D. dolgozatban bemutatott munka összefoglalása

A globális népességnövekedés és a technológia rohamos fejlődése miatt társadalmunk fokozott mértékben nyúlt hozzá bolygónk fosszilis készleteihez. Földünk fosszilis készletei azonban kimerülőben vannak, és hamarosan nem lesznek képesek ellátni folyamatosan növekvő szükségleteket, valamint felhasználásuk során a légkörbe kerülő üvegházható gázok jelentős mértékben járulnak hozzá Földünk klímájának rohamos mértékű előnytelen változásához.

Az elmúlt néhány évtizedben a megújuló energiaforrások hasznosítására alkalmazott technológiák rohamos fejlődésen mentek keresztül, amelyeknek köszönhetően napjainkban már egész régiók energiaszükségletét képesek vagyunk fedezni csupán megújuló forrásból. Azonban a megújuló energiahordozók által biztosított fel nem használt „zöld-áramot” a veszteségek elkerülése érdekében érdemes alternatív energiahordozók formájában tárolni. Ilyen alternatív energiahordozó a H_2 , amely amellet, hogy számos előnnyel rendelkezik, tárolására és szállítására létező technológiák nem elég biztonságosak és gazdaságosak. A „Power-to-Gas” technológia során az anaerob biogáz fermentáló mikrobaközösség fontos részét képező hidrogenotróf metanogének segítségével a H_2 CH_4 -ná alakítható. A CH_4 könnyen tárolható, szállítható energiahordozó a létező földgáz hálózatok segítségével és kényelmes potenciális alternatív energiahordozója a „zöld áramnak”.

Dolgozatomban a biogáz fermentációja során keletkező fermentációs maradék és annak mikrobaközösségének felhasználási lehetőségeit mutatom be, mint a „PtBio CH_4 ” folyamat alternatív katalizátorát. Célom az anaerob kevert mikrobakultúra anyagcsere folyamatainak vizsgálata, nyomon követése, H_2 -ben gazdag fermentációs körülmények között, valamint a mikrobiális összetétel-változások bemutatása.

Vizsgálataim során a fermentációs maradék mikrobáinak anyagcserefolyamatait 120 ml térfogatú szérum üvegekben követtem nyomon. A méréseim során a H_2 -t, CO_2 -ot szakaszosan, műanyag fecskendő segítségével juttattam a reaktorok légterébe. A fermentáció során végbemenő gázösszetételi változásokat gázkromatográf (GC) segítségével követtem nyomon. A fermentációs elegy pH-ját pH mérő segítségével határoztam meg. A mikrobiális anyagcserefolyamtok által katalizált szervessav-összetétel változásokat folyadékkromatográf (HPLC) segítségével ellenőriztem.

A H_2/CO_2 -ban gazdag környezet hatására átalakult mikrobiális összetétel metagenomikai vizsgálatok segítségével követtem nyomon. A minták szekvenálását Ion Torrent PGMTM útmutatója alapján végeztem. Leolvasás- és genomcentrikus elemzések segítségével

meghatároztam legjelentősebb változásokat a mikrobiális összetételben mezofil és termofil közösség esetén. A genomcentrikus metagenomikai eredmények kiértékelése segítségével H₂-hasznosító- és metanogén anyagcsere-útvonalak enzimeit azonosítottam.

Dolgozatomban a biogáz fermentációja során keletkező fermentációs maradék mikrobaközösségének felhasználási lehetőségeit mutattam be, mint a „PtBioCH₄” folyamat alternatív katalizátorát. A vizsgálatok főbb megállapításai a következőkben foglalhatóak össze:

1. A szakaszosan beadagolt H₂-t felhasználásával a hidrogenotróf metanogén mikrobák a közegben oldott CO₂ redukcióját hatékonyan megvalósították, amit megnövekedett CH₄ termelés bizonyított. A hasznosított H₂ mennyiségével arányosan emelkedett a termelt CH₄ mennyisége és csökkent a reaktorok légtérének CO₂ tartalma. Amikor a reaktorban az oldott CO₂ elfogyott, a naponta beadagolt H₂ további felhasználása nem volt lehetséges, ezért a H₂ felhalmozódott a légtérben és a fermentációs közeg lúgosodása következett be. Mezofil körülmények között ez a gátló folyamat 48,94 ml H₂ (40,78%) napi adagolás mellett a 11. napon, még 37,75 ml H₂ (31,46%) esetén a 14. napon jelentkezett. A napi 21,4 ml (17,83%) H₂ bevitel mellett a CO₂ redukciója CH₄-ná hatékonyan ment végbe, a H₂ átalakítási hatékonysága 97,41% volt a fermentáció teljes időtartama alatt (29 nap). Termofil körülmények között a rendszerből hamarabb elfogyott az oldott és szabad CO₂, ezért már a 4-5. nap között megfigyelhető volt a CH₄ képződés leállása 40,53 (33,78%) és 54,71 ml (45,59%) napi H₂ bevitel esetén. A fermentációs közeg CO₂ tartalmának kimerülése a 10. naptól a 23,82 ml (19,85%) H₂-nel „táplált” reaktorokban is bekövetkezett.
2. A Power-to-Gas technológia megvalósításának feltételeit megvizsgáltam szakaszos szerves szubsztrát adagolás esetében a labor reaktorokban. A szerves szubsztrát utánpótlása az ipari biogáz erőmű szakaszos működését modellezte. A H₂ adagolás hatására megnövekedett CH₄ hozamot és csökkent CO₂ képződést tapasztaltam a bejuttatott H₂ mennyiségével arányosan a mérés korai szakaszában. A H₂ emelkedő napi dózisa (~40-60 ml (33,33-50%) napi adagolás) mezofil és termofil körülmények között is a CO₂ készlet kimerülését eredményezte a kísérlet második szakaszában. A metanogén mikrobák anyagcserejének leállása szerves savak felhalmozódását és a pH csökkenését eredményezte. A korábbi megfigyelésekhez hasonlóan az alacsonyabb napi H₂ bevittel (~20 ml (16,67%)) működtetett reaktorok CH₄ termelése stabil tudott maradni a fermentáció teljes idejében és a hidrogenotróf metanogének aktivitása révén 23,5% -os (mezofil), 10,15%-os (termofil) CH₄ többletet biztosítottak.

3. A folyamat hosszú távon való fenntarthatóságát biztosította, a sztöchiometrikus H_2/CO_2 gázelegy adagolása. A CO_2 bevitellel egyrészt biztosítottam a hidrogenotróf metanogének szénforrását, másrészt oldott (karbonát/bikarbonát) formában pufferelte a rendszert. A $4H_2+CO_2$ gázelegyet mikroba közösség a kísérlet teljes futamidejét figyelembe véve mezofil körülmények között 90%, még termofil esetben 74% feletti hatékonysággal alakították át CH_4 -ná. A légtérben mérhető gázelegy átlagos $bioCH_4$ tartalma mezofil esetben 97%-nál, míg termofil esetben 95%-nál magasabb volt.
4. A reaktorok mikrobiális összetételét természetesen befolyásolta az üzemi biogáz termelő körülményektől eltérő környezet, ami szerves komponensekben szegény de H_2/CO_2 -ban kellően ellátott. Az elvégzett leolvasás alapú elemzések alapján mezofil körülmények között a *Methanobacterium*, *Herbinix* és a *Clostridium* nemzetség mikrobái domináltak, míg termofil fermentáció során a *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Caldicoprobacter* és a *Methanobacterium* nemzetségek relatív gyakorisága volt a legmagasabb (37. ábra).
5. Genom centrikus elemzések során a mezofil konzorciumból 34 db, míg a termofilből 43 db bint tudtam összeszerelni. Az összeszerelt genomok relatív gyakoriságának változása szorosan követte a leolvasás alapú eredményeket (36., 38. ábra). A genomok azonosított génkészlete alapján a H_2/CO_2 -ban gazdag környezetben a hidrogenotróf, acetotróf metanogenezis és a redukzív acidogenezis útvonalai maradtak aktívak. Ezzel szemben a metilotróf metanogenezisre és szulfát redukcióra jellemző géneket alig, vagy egyáltalán nem tudtam azonosítani (40-44. ábra). Így gyakorlatilag feltérképezhetők voltak a mintavétel időpontjában a rendszerben megnyilvánuló főbb reakció utak, ami a Power-to-Gas technológia működésének mikrobiológiai ellenőrzését és szabályozását teszi lehetővé.

9 Summary of the Ph.D. Thesis

The global energy consumption increases continuously and rapidly while the available fossil energy carriers become limited. This, together with the alarming climate change, put a special emphasis on the development of the renewables. The rapidly expanding renewable energy technologies, i.e. photovoltaics and wind power, generate fluctuating “green electricity”. The excess “green electricity” needs to be stored independently from the electricity grid. H₂ is a promising alternative energy carrier despite of the existing underdeveloped storage, transportation technologies. H₂ can be converted to CH₄ via hydrogenotrophic methanogenesis. This microbiological by-pass route offers an affluent solution of the energy storage and transportation problems. The “Power-to-Gas” technology directs the fluctuating “green electricity” to the more flexible natural gas grid by converting it to CH₄. BioCH₄ is chemically indistinguishable from the fossil “natural gas” and can replace “natural gas” in every applications the non-renewable and environmentally unfriendly energy carrier.

In this Thesis work, I investigated the application of a mixed microbial community developed from the fermentation effluents of biogas plants. The results corroborated the advantages of using mixed anaerobic communities in the Power-to-Gas conversion. The major findings were as follows:

1. In a batch-type fermentation system H₂ was daily injected into the reactor head space. Although H₂ is poorly soluble in the aqueous medium, it was converted by the hydrogenotrophic methanogens as indicated by the increased yield of CH₄ and concomitant reduction of CO₂. The depletion of the residual organic substrate supply and dissolved CO₂ resulted in diminishing CH₄ production in time. This was also accompanied by H₂ accumulation in the headspace and elevation of pH due to the lack of the buffering capacity of CO₂/HCO₃⁻. At mesophilic temperature these effects were apparent on days 11 and 14 in the case of 48.94 mL (40.78%) and 37.75 mL (31.46%) daily H₂ dosages, respectively. The reactors receiving 21.4 mL (17.83%) daily H₂ dosage converted the H₂ to CH₄ with 97.4% efficiency throughout the 29-days long experimental period. At thermophilic temperature the conversion took place substantially faster.
2. The effects of a systematic organic substrate supply were also investigated. The regular organic substrate addition mimicked the industrial conditions of the in-situ P2G process on the one hand, and on the other hand, it was expected to balance the dangerous pH increase

caused by the dissolved CO₂ depletion. The results indicated an intricate and sensitive equilibrium between H₂/CO₂ consumption and system stability at both mesophilic and thermophilic temperatures. The inhibition of the acetoclastic pathway resulted in the accumulation of volatile organic acids (VFAs) and acidification of the pH. Close to the optimal conditions stable microbial activity could be maintained. Surplus CH₄ evolution of 23.5% (mesophilic) and 10.15% (thermophilic) were measured, respectively.

3. The stoichiometric mixture of H₂+CO₂, i.e. 4H₂+CO₂, successfully modeled the ex-situ P2G industrial process conditions. Long term bioCH₄ production was achieved at balanced pH. The hydrogenotrophic methanogens converted the injected H₂ to CH₄ with 90%, 74% efficiency at mesophilic and thermophilic temperatures, respectively. The bioCH₄ content of the reactor's headspace was over 97% in the mesophilic and over 95% in the thermophilic reactors. Both values are compatible with the quality requirements for injection into the natural gas grid.
4. The read based metagenomic analyses revealed a shift in the microbial community. In the mesophilic reactors the H₂/CO₂ rich headspace diminished the genera *Candidatus Cloacimonas*, *Methanosarcina*, *Sedimentobacter* and the *Clostridium* while the genera *Bacteroides*, *Romboutsia* and the H₂ utilizing *Methanobacter* and *Methanoculleus* became predominant. At thermophilic temperature the abundance of the genera *Ureibacillus*, *Lutispora*, *Herbinix*, *Clostridium*, *Bacillus* and the *Tepidanaerobacter* decreased and the growth of *Actinotalea*, *Methanobacterium*, *Cellulomonas* and the hydrogenotrophic *Methanothermobacter* was facilitated.
5. 34 and 43 bins were assembled from the mesophilic and thermophilic consortia, respectively. The genome-centric read-based analyses corroborated and validated each other. In the H₂/CO₂ rich environment hydrogenotrophic-, acetotrophic methanogenesis and reductive acidogenesis specific genes were observed in the assembled genomes. Methylothermophilic methanogenesis or sulfate reduction specific genes were scarcely detected.

10 Függelék

	Vizes gázmosás	Szerves gázmosás	Kémiai gázmosás	PSA	Membrán szűrési technológai	Kriogén gázválasztás	Kémiai hidrogén kezelés
Energiaszükséglet nyers biogázból [kWh/Nm ³]	0,25-0,3	0,2-0,3	0,05-0,15	0,23-0,3	0,18-0,2	0,76	n.a.
Befektetési költség	Közepes	Közepes	Magas	Közepes	Magas	Magas	n.a.
Hőmérséklet igény [C°]	10-40	55-80	100-180	15-40	-	-25-(-196)	270
CH ₄ veszteség [%]	<2	2-4	<0,1	<4	<0,6	2	-
CH ₄ tisztaság [%]	96-98	96-98	96-99	96-98	92-98	97-98	97-99
Előtisztítási igény	Javasolt	Javasolt	Igen	Igen	Javasolt	Igen	Igen
Nyomás tartomány [bar]	4-10	4-8	1-5	3-10	4-8	8-80	8-10

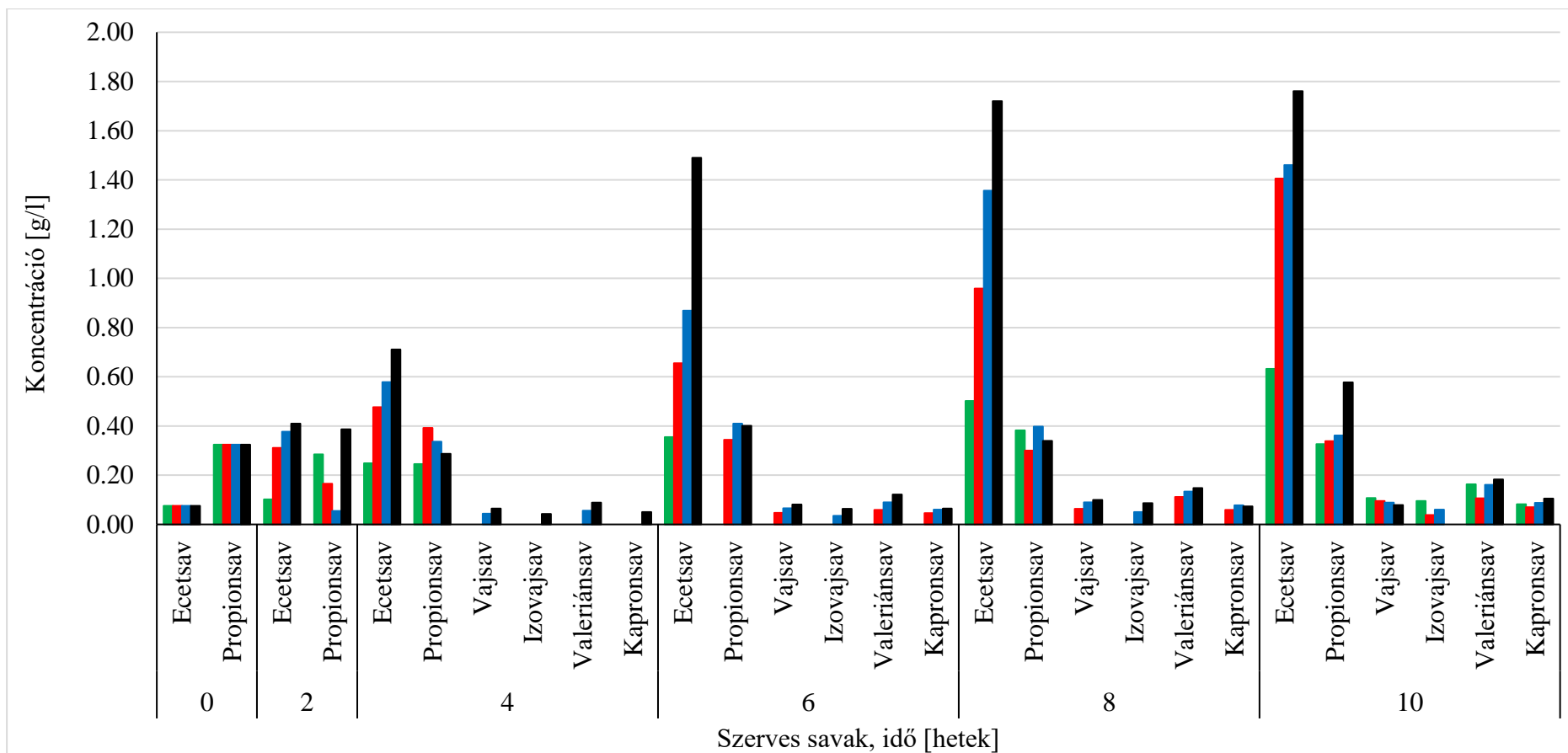
10. táblázat: A fizikai és kémiai biogáz tisztító eljárások ([8,231] alapján módosítva)

	Összesen termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Összes beadagolt H ₂ mennyisége [ml]	Fel nem használt H ₂ mennyisége [ml]	Exogén H ₂ átalakításából termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ átalakulási hatékonysága CH ₄ -ná [%]
Kontroll reaktor	157,68	0,00	0,00	0,00	0,00	n.a.
"A" reaktor	314,25	642,93	0,00	156,56	642,93	97,41
"B" reaktor	287,43	1132,47	459,03	129,74	673,44	77,06
"C" reaktor	262,75	1468,04	835,38	105,07	632,66	66,43

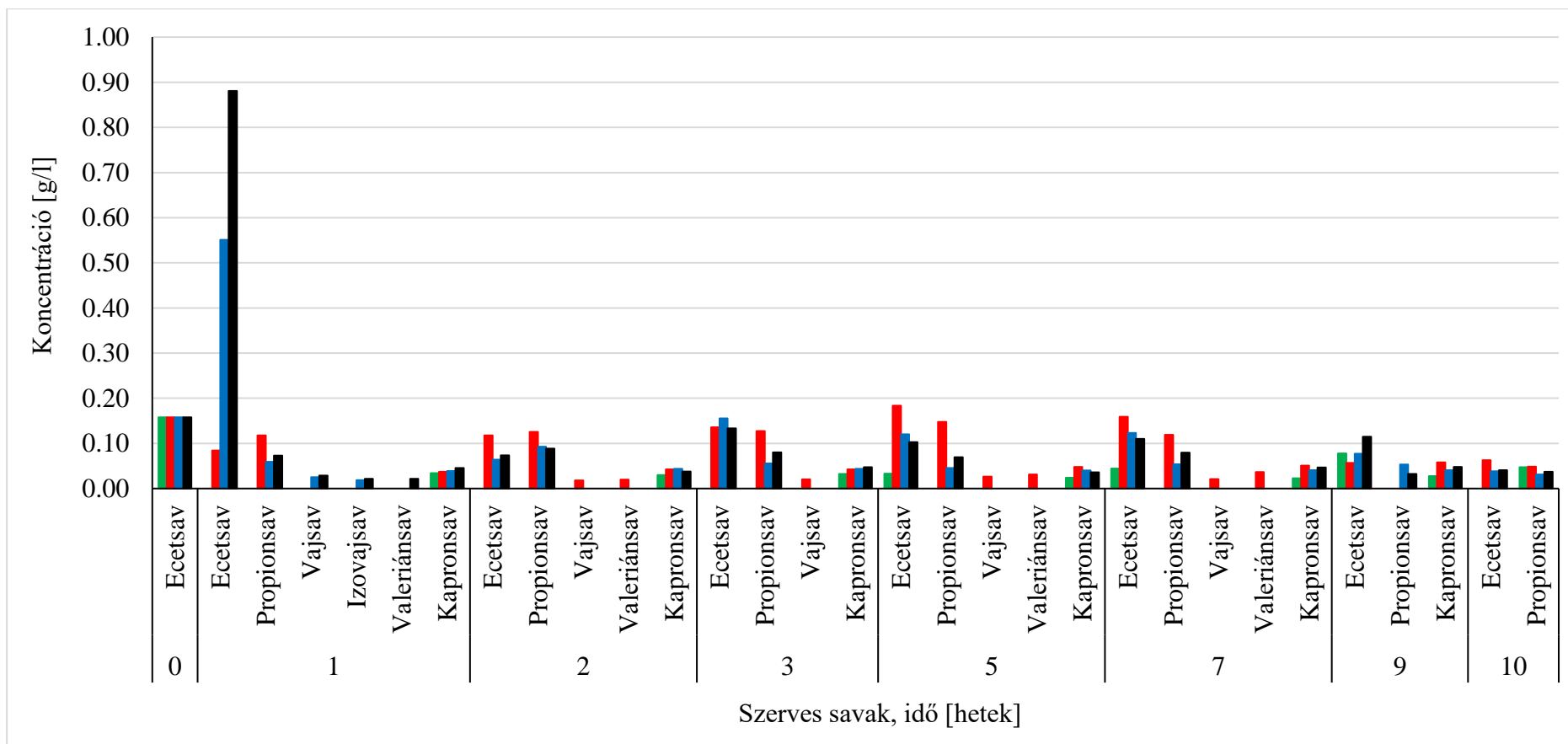
11. táblázat: A mezofil batch kísérlet összesített eredményei

	Összesen termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Összes beadagolt H ₂ mennyisége [ml]	Fel nem használt H ₂ mennyisége [ml]	Exogén H ₂ átalakításából termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ átalakulási hatékonysága CH ₄ -ná [%]
Kontroll reaktor	46,94	0,00	0,00	0,00	0,00	n.a.
"A" reaktor	101,68	404,91	241,44	54,75	163,47	133,96
"B" reaktor	120,96	694,09	225,42	74,02	468,67	63,18
"C" reaktor	110,16	930,03	271,03	63,23	659,00	38,38

12. táblázat: A termofil batch kísérlet összesített eredményei



47. ábra: A mezofil fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervesav összetétel tekintetében (zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ bevitel)



48. ábra: A termofil fermentáció ideje alatt végbemenő változások az illékony szervesav összetétel tekintetében (zöld: kontroll, piros (A): 20 ml, kék (B): 40 ml, fekete (C): 60 ml H₂ bevitel)

	Összesen termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Összes beadagolt H ₂ mennyisége [ml]	Fel nem használt H ₂ mennyisége [ml]	Exogén H ₂ átalakításából termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ átalakulási hatékonysága CH ₄ -ná [%]	Átlagos CH ₄ tartalom (stabilizálást követően) [%]
Kontroll reaktor	30.26	5.13	0.00	0.00	0.00	n.a.	9.32 (9.32)
"A" reaktor	328.75	1254.19	50.03	298.49	1204.15	99.15	78.11 (98.28)
"B" reaktor	628.73	2445.17	42.94	598.48	2402.24	99.65	87.87 (97.73)
"C" reaktor	801.59	3688.66	291.78	771.34	3396.88	90.83	80.83 (98.40)

13. táblázat: A hosszútávú mezofil kísérlet összesített eredményei.

	Összesen termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Összes beadagolt H ₂ mennyisége [ml]	Fel nem használt H ₂ mennyisége [ml]	Exogén H ₂ átalakításából termelt CH ₄ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ mennyisége [ml]	Felhasznált H ₂ átalakulási hatékonysága CH ₄ -ná [%]	Átlagos CH ₄ tartalom (stabilizálást követően) [%]
Kontroll reaktor	56.09	0.00	0.00	0.00	0.00	n.a.	7.07 (7.07)
"A" reaktor	372.49	1556.01	19.98	316.40	1536.03	82.39	83.59 (89.53)
"B" reaktor	560.30	2723.33	8.39	504.21	2714.94	74.29	84.50 (95.30)
"C" reaktor	768.77	3761.01	34.62	712.68	3726.39	76.50	84.00 (94.06)

14. táblázat: A hosszútávú termofil kísérlet összesített eredményei.