Biogáz termelő mikroorganizmus közösségek vizsgálata metagenomikai megközelítéssel

Doktori értekezés

Készítette:

Wirth Roland

Témavezetők:

Prof. Dr. Kovács L. Kornél

Dr. Maróti Gergely

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

MTA SzBK Biofizikai Intézet

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 5
1. Bevezetés 6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 10
2.1 A biogáz termelő közösségek felépítése 10
2.1.1 Nagy molekulájú szerves anyagok hidrolízise 10
2.1.2 Savképző szakasz 11
2.1.3 Metántermelő szakasz 11
2.2 Biogáz termelő közösségek molekuláris vizsgálatai 12
2.2.1 Biogáz termelő mikrobák közösségének célzott vizsgálati módszerei 12
2.2.1.1 A 16S rRNS-t kódoló DNS szakasz vizsgálata 13
2.2.1.2 A Metil koenzim M reduktáz A szakaszának vizsgálata 14
2.2.1.3 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) vizsgálatok 14
2.2.1.4 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) vizsgálatok 15
2.2.1.5 Fluoreszcens In Situ Hibridizációs vizsgálatok 16
2.2.2 Teljes közösségi vizsgálatok 17
2.2.2.1 Szintézis alapú szekvenálás 17
2.2.2.2 Ligálás alapú szekvenálás 18
2.2.2.3 Második és harmadik generációs szekvenálási technológiák határán 19
2.2.2.4 A biogáz termelő mikroorganizmus közösségek metagenomikai vizsgálata 19
2.3 Mikroalga biomassza, mint alternatív szubsztrát 21
2.3.1 Mikroalgák anaerob fermentációja 21
3. **CÉLKITŰZÉSEK** 23
4. **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK** 25
4.1. Alkalmazott fermentációs technológia 25
4.1.1. Félfolyamatos üzemű fermentáció 25
4.1.2. Batch típusú fermentáció 26
4.2. Szárazanyag tartalom meghatározás 27
4.3. Szervesanyag tartalom meghatározás 27
4.4. Összes széntartalom, összes nitrogén tartalom meghatározás 28
4.5. A biogáz minőségi összetételének vizsgálata 28
4.6. pH meghatározás 28
4.7. Sűrűség meghatározás 28
4.8. Ammónium- ion tartalom meghatározás 29

4.9. Az összes szerves sav és pufferkapacitás meghatározása 29
4.10. Mikroorganizmusok 29
4.10.1. Kevert természetes kultúra (oltóiszap) 29
4.11. Szubsztrát biomasszák 30
4.12.Mikroalga tápoldatok 31
4.12.1. *Chlamydomonas sp.* és *Scenedesmus sp.* kevert mikroalga kultúra tápoldata 31
4.12.2. *Scenedesmus sp.* tápoldata (BG11) 32
4.13. DNS izolálási technikák 33
4.13.1. CTAB alapú tisztítás 33
4.13.2. Módosított Zymo Research kittel történő genomi DNS tisztítás 33
4.14. Metagenomika 34
4.14.1. A kísérletekben használt szekvenáló berendezések 34
4.14.2. Minták előkészítése, szekvenálása 34
4.14.3. Kiértékelésre használt bioinformatikai szoftverek 35
4.14.3.1. Kontig összeszerelés 35
4.14.3.2. Adatok kiértékelésére használt online szerver 36
4.14.3.3 Az adatok kiértékelése 37
4.15 *Scenedesmus obliquus* mikrohullámú kezelése 37
5. **EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK** 38
5.1 Biogáz üzem szimuláció 38
5.1.1 A szimuláció mikrobiális közösségének metabolikus vizsgálata 38
5.1.2 A kísérleti biogáz fermentorok mikrobiális összetételének vizsgálata 40
5.1.2.1 Bacteria domén 41
5.1.2.2 Archaea domén 46
5.1.3 A SOLiD metagenom adatok összehasonlítása más eredményekkel 48
5.2 Mikroalga biomassza fermentáció 51
5.2.1 Mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja 52
5.2.1.1 A keletkezett biogáz vizsgálata 53
5.2.1.2 Összes szerves sav és pufferkapacitás (FOS/TAC) meghatározása 55
5.2.1.3 NH_4^+ tartalom változásának vizsgálata 56
5.2.1.4 C/N arány vizsgálat eredményei 57
5.2.2 Metagenomikai vizsgálatok 59
5.2.2.1 Kukorica szilázs mikrobiológiai összetétele 59
5.2.2.2 Mikroalga és szintrófikus baktérium közösség mikrobiológiai összetétele 60

5.2.2.3 A biogáz termelő mikroba közösség vizsgálata 61
5.2.2.3.1 Kukorica szilázs fermentációjának mikrobiális közösség vizsgálata (Bacteria domén) 62
5.2.2.3.2 A kofermentáció mikrobiális közösségének vizsgálata (Bacteria domén) 63
5.2.2.3.3 Mikroalga keverék fermentációjának mikrobiális változásai (Bacteria domén) 64
5.2.2.3.4 A különféle fermentációk Archaea doménjének vizsgálata 65
5.2.3 Fotoautotróf módon növesztett *Scenedesmus obliquus* fermentációja 67
5.2.3.1 A keletkezett biogáz vizsgálata 67
5.2.3.2 Összes szerves sav és pufferkapacitás (FOS/TAC) meghatározása 69
5.2.3.3 NH_4^+ tartalom változásának vizsgálata 70
5.2.3.4 C/N arány vizsgálat eredményei 71
5.2.4 Metagenomikai vizsgálatok 72
5.2.4.1 Fotoautotróf módon nevelt *Sc. obliquus* kultúra metagenomikai vizsgálata..... 72
5.2.4.2 A biogáz termelő mikroba közösség vizsgálata 73
5.2.4.2.1 Kukorica szilázs fermentációjának mikrobiális közösség vizsgálata (Bacteria domén) 75
5.2.4.2.2 A kofermentáció mikrobiális közösségének vizsgálata (Bacteria domén) 76
5.2.4.2.3 Sc. obliquus biomassza fermentációjának mikrobiális vizsgálatai (Bacteria domén) 77
5.2.4.2.4 A különféle fermentációk Archaea doménjének vizsgálata 78
5.2.5 *Scenedesmus obliquus* előkezelésének hatása az anaerob fermentációra..... 79
6. **ÖSSZEFOGLALÁS** 82
7. Köszönetnyilvánítás 87
8. Irodalomjegyzék 88
9. Summary of Thesis 111

Rövidítések jegyzéke

NGS – Next Generation Sequencing (Következő/újgenerációs szekvenálás)

TGS – Third Generation Sequencing (Harmadik generációs szekvenálás)

CoA – Koenzim A

F420 – 8-hidroxi-5-deazaflavin

PCR – Polymerase Chain Reaction (Polimeráz láncreakció)

SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism (Egyszálú konformációs polimorfizmus)

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Denaturáló gélelektroforézis)

FISH – Fluorescent In Situ Hybridization (Fluoreszcens in situ hibridizáció)

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Fermentortípus)

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

TAP – Tris-acetát-foszfát

EDTA – Etilén-diamin-tetraecetsav

GC – Gas Chromatograph (Gázkromatográf)

FOS – Flüchtige Organische Säuren (Összes szerves sav)

TAC – Totales Anorganisches Carbonat (Pufferkapacitás)

CTAB – Cetil-trimetilammónium-bromid

TE – Tris-EDTA

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction (Kvantitatív PCR)

PTFE – Politetrafluoretilén

COG – Clasters of Orthologous Group (Funkcionális fehérje klaszter)

oTS – Organic Total Solid (Összes szerves anyag)

CoM-S-S-HTP –Koenzim M heterodiszulfid-heptamil treonin

HS-HTP – 7 merkaptoheptamil L treonin foszfát

KVIC – Khadi and Village Industries Comission (Fermentortípus)

1. Bevezetés

Napjaink társadalmának gazdasága fosszilis energiahordozókon (kőolaj, szén, földgáz) alapszik, melyek energiafelhasználásunk 80%-át teszik ki (Omer és mtsai. 2006). Kiváltásuk szükségességét sürgeti a Föld népességének növekedése, és az ezzel párhuzamosan egyre növekvő ipari energiaigény. A gazdaságosan kiaknázható fosszilis energiahordozók a jövőben már nem fogják tudni kielégíteni a fogyasztók energiaszükségletét. A fosszilis energiahordozók versenyképességüket elsősorban a kitermelés költségének rohamos növekedése miatt veszítik el. Ennél is riasztóbb a globális klímaváltozás jelensége, a fosszilis energiahordozók fokozott használata miatt a légkörbe jutó üvegházhatású gázok az egész bolygónkon veszélyeztetik az életfeltételeket. Ezért a kutatók figyelmének középpontjában már évek óta a jelenlegi energiahordozók kiváltása áll alternatív, megújuló energiahordozókkal, melynek köszönhetően az újabb technológiák rohamosan fejlődnek. Számos kutatás foglalkozik ilyen alternatívákkal, melyekben a közös pont az, hogy az energia teljes mértékben megújuló forrásból származik, azaz az alkalmazott alapanyag a felhasználás mértékében újratermelődik (Beneman 2000, Yadvika és mtsai. 2004, Bálint és mtsai. 2005, Sharma és mtsai. 2008). Ezeknek a megújuló energiahordozóknak a használata csökkenthetné a légkörbe kerülő károsanyag kibocsájtást, ami a klímaváltozás elleni küzdelmet is elősegítené.

A megújuló energiahordozók sorába tartozik a szélenergia, a geotermikus energia, a víz kinetikus energiája (pl.: hullám- és árapálymozgások, vagy folyami erőművek), fotoelektromos technológiák, valamint a biomassza felhasználása. A biomassza hasznosítás különféle módjai közé tartozik a biodízel, bioetanol, biohidrogén és a biogáz gyártása (Bai és mtsai. 2002, Bai 2003, Omer 2006, Celik 2008, Kovács és mtsai. 2014). Biogáz előállításához sokféle biomasszát felhasználhatunk, mely lehet növényi biomassza, állati ürülék, ipari vagy kommunális hulladék (Bai 2007). A növényi hulladékokról általánosságban elmondható, hogy fő alkotóik a cellulóz, hemicellulóz, valamint a lignin. Az állati eredetű biomasszák pedig általában a növényi hulladékoknál nagyobb mennyiségben tartalmaznak különféle fehérjéket, zsírokat, olajokat. A biogáz gyártás során keletkező termékek sokféleképpen felhasználhatóak. A legegyszerűbb és legelterjedtebb a biogáz elégetése, melyből egyszerre nyerhetünk hőt és elektromos energiát. A keletkező fermentációs maradékot pedig talajerő pótlóként

műtrágya kiváltására hasznosíthatjuk (Gerardi 2003, Bai 2007, Kovács és mtsai. 2014). A biogáz legnagyobb része metán, mely a fermentációs alapanyagoktól függően a gáz 50-75%-át teszi ki, ezen kívül ugyancsak alapanyagtól függően szén-dioxidot (28-48%), és ~1-2%-ban egyéb gázt, kénhidrogént, nitrogén vegyületeket tartalmaz (Gerardi 2003, Bai 2007). A földgáz több mint 90%-a metán, mely a fűtőértékének kb. 70%-át adja. Ezt az értéket a biogáz esetén is elérhetjük, ha a keletkezett biogázból a szén-dioxidot eltávolítjuk (Bai 2007, Kovács és mtsai. 2014). Tisztítás után a biogáz gyakorlatilag a földgázzal egyenértékű fűtőértékkel rendelkezhet, így a gáz akár a földgázhálózatba is táplálható.

Régóta ismeretes, hogy a biogáz termelődése spontán is lejátszódik mocsarakban, hulladéktároló telepeken, ahol kialakulhat anaerob környezet. Tehát a biogáz képződési folyamat anaerob körülmények között zajlik le, azonban a szerves anyagok bontásában fakultatív anaerobok is részt vesznek (Winter 1984). A különböző anyagok anaerob átalakítása bonyolult biokémiai folyamatok láncolata, mely az erjesztésre kerülő anyag összetételétől, minőségétől függően változó összetételű mikroorganizmus közösségek segítségével történik. A mikroorganizmusok tevékenysége meghatározott sorrendben követi egymást, minden lépést más speciális mikroba csoport végez. A különböző típusú mikrobák egymásra utaltak, és egymással összhangban működnek. A komplex szerves molekulák metánná történő átalakítása csak akkor sikeres, ha kialakul a baktériumok speciális közössége, melyben mindegyik faj meg tud élni, valamint olyan terméket hagy hátra, mely a következő mikroba csoportnak táplálékul szolgál (Winter 1984). Az ilyen közösségekben minden mikroba faj a túlélésért versenyez, a győztesen kikerülő fajok, melyek leginkább képesek az adott körülményekhez adaptálódni, túlélnek, dominánssá válnak. A nagy szerves molekulájú anyagok lebontásából egyre egyszerűbb szerkezetű vegyületek jönnek létre a folyamat során, melyeknek energiatartalma is egyre alacsonyabb, így már kevesebb organizmus számára nyújtanak tápanyagforrást (Gerardi 2003).

A szerves anyagok anaerob biodegradációjában részt vevő mikroorganizmusok három fő csoportba sorolhatók (Thielke és mtsai. 1988, Kovács és mtsai. 2014). Az első csoport tagjai a polimerek lebontásáért felelősek, ők a nagy molekulájú szerves vegyületeket bontják. Az általuk előállított termékeket használja fel az acetogén baktériumok csoportja, amely szerves savakat állít elő, illetve bizonyos mikrobák hidrogént is termelnek (Wolin 1975, Conrad és mtsai. 1985, Thiele és mtsai.1988, Cayol és mtsai. 2002, Kovács és mtsai. 2014). A harmadik csoportot a metanogén

mikroorganizmusok alkotják, ők a biogáz két fő komponensét, a metánt és a szén-dioxidot állítják elő. Ezek között megkülönböztetünk hidrogenotróf, acetotróf, és metilotróf metanogéneket. Tehát a biogáz termelés összetett mikrobiológiai folyamat, melyben a biogáz termelő mikroorganizmusok bonyolult láncolatot építenek fel, s ennek végtermékeként keletkezik a biogáz (Bryant és mtsai. 1967, Wolin 1975, Conradés mtsai. 1985, Schmidt és mtsai. 1993, Kovács és mtsai. 2014).

A fő probléma jelenleg a megújuló energiahordozókkal, hogy árban nem veszik fel a versenyt a fosszilis energiahordozókkal. Ezért a bioenergetikában a gazdaságos megoldások kifejlesztése, valamint a hatékonyság növelése a minél gyorsabb elterjedést segítheti elő, így meghatározó fontosságú. A biogáz gyártás szempontjából az olyan ismeretek, melyek segítségével megismerhetjük a folyamatban részt vevő mikroorganizmusokat, valamint ezek funkcióit egyre jobb és hatékonyabb rendszerek kialakítását teszik lehetővé. A metagenomika –mikroorganizmusok közösségeinek genom szintű analízise– egy újfajta lehetőség a mikrobiológiai ismeretek bővítésére, amely meghaladja az egyes gének szintjét (Handelsman 2004). A metagenomikai módszerek alkalmazásával olyan ismeretekre tehetünk szert, amelyeknek alkalmazása hatékonyabb, gazdaságosabb biogáz termelő mikroba közösségek kifejlesztéséhez vezet. Ilyen vizsgálatok kivitelezéséhez napjainkban rendelkezésre állnak a „második" vagy „Next Generation Sequencing" (NGS), valamint a legújabb „harmadik generációs" („Third Generation Sequencing -TGS") szekvenáló technológiák (Mardis 2008, Metzker 2009, Schadt és mtsai. 2010, Kovács és mtsai. 2014). Ezek az eljárások új utat nyitnak a mikrobiális közösségek vizsgálatában. A metagenomikai elemzés során a teljes közösségi DNS reprezentálja a templátot, amit szekvenálással nukleotid szinten azonosítunk, majd elemzünk filogenetikai és funkcionális szempontból (Mardis 2008, Metzker 2009, Pop és Salzberg. 2008). Az újgenerációs szekvenátorok újabb és újabb verzióinak megjelenésével a genomika gyorsan fejlődik, egyre kifinomultabbá és hatékonyabbá válik. Az NGS és TGS technológiák által biztosított hatalmas mennyiségű adathalmazokon keresztül lehetőség nyílt nagyszabású összehasonlító, valamint evolúciós vizsgálatokra. Ezek a vizsgálatok néhány évvel ezelőtt elképzelhetetlenek voltak. A metagenomika segítségével belátást nyerhetünk a gének közösségébe, amelynek segítségével feltárhatjuk a sokféle eddig azonosítatlan biogáztermelő mikroorganizmus világát. A folyamatban szereplő legtöbb mikroba tiszta kultúrában a jelenlegi ismereteink szerint nem tenyészthető, így azokat a klasszikus mikrobiológiai eszközökkel vizsgálni, jellemezni nem tudjuk.

Napjainkban a modern biogáz gyárak szubsztrátként 80%-ban kukorica szilázst használnak (Shildermann 2012). Azonban a kukorica szilázs előállítási és tárolási ára egyre nő, valamint a kukorica biogáz célú felhasználása miatt csökken az élelmiszertermelésre használható földterület. A biogáz gyártás szempontjából komoly lehetőségek rejlenek a napenergiát hasznosító mikroorganizmusok használatában. Ezért egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik világszerte a különböző alga –különösen az ún. „mikroalga" – fajok iránt. A mikroalgák mikroszkópikus autotróf organizmusok nagy és fajgazdag csoportja. A mikroalga biomassza hasznosításának a biogáz gyártás szempontjából számos előnye van a hagyományosan használt kukorica szilázzsal szemben. Egyes fajaik képesek megduplázni biomasszájukat 24 óra alatt, így jóval nagyobb mennyiségű biomasszát nyerünk, mint bármely más, talajon termesztett növénnyel (Rodolfi és mtsai. 2009). Továbbá nincs szükség gyomirtókra és növényvédő szerekre sem. Sokféle vizes közegben megélnek, de az előállított biomassza tömegre vetített vízigényük kisebb, mint a szárazföldi növényeknek (Richmond 2004). A mikroalga biomassza anaerob fermentációjának előnye, hogy a keletkezett biogáz minősége jobb (60-75% metán tartalom, míg kukorica szilázs esetében 50-55%). Megfelelő infrastruktúra mellett elvi lehetőség a biogáz elégetése során keletkező szén-dioxid elnyeletése, ugyanis a mikroalga fotoszintézis útján a CO_2-ot ismét felveheti saját biomasszájának növelésére (de Morais és mtsai. 2007). Így egy olyan körfolyamat építhető fel, mely még alacsonyabb emissziós eljárássá teheti a biogáz gyártás technológiáját. Továbbá a mikroalgákat felhasználhatjuk biodízel vagy biohidrogén, esetleg más értékes vegyületek gyártására is biomasszájuk biogázzá történő fermentálása előtt. Az eljárásokat kombinálva sokkal több energiát nyerhetünk ugyanabból a biomasszából (Sialve és mtsai. 2009, Lakainemi és mtsai. 2011).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A biogáz termelő közösségek felépítése

Az emberiség már régóta ismeri a szerves anyagokból történő természetes biogáz képződésének jelenségét. Írásos emlékek találhatóak arról, hogy időszámításunk előtt a 10. században Asszíriában és ie. a 16. században Perzsiában biogázt használtak fürdővíz melegítésére. Évezredekkel később újra felfedezték jelentőségét. Volta 1776-ban megállapította a mocsarakban képződő gázról, hogy éghető anyag, majd Dalton 1804-ben kimutatta a mocsárgázból a metánt (Bai és mtsai. 2002), melynek képletét Avogadro határozta meg 1821-ben (Schulz és Eber 2005). Ezekben az időkben a biogáz termelő mikrobákról még nem volt tudomásuk, de ma már ismeretes, hogy a szerves anyagok lebontásában fajgazdag mikroba közösség vesz részt, mely egy bonyolult táplálékláncon keresztül összetett szerves anyagokból állítja elő a szén-dioxid és metán keverékét (Cirne és mtsai. 2004).

2.1.1 Nagy molekulájú szerves anyagok hidrolízise

Az első lépés a nagy molekulájú anyagok (összetett cukrok, zsírok és fehérjék) lebontása kisebb szerves anyagokká (egyszerű cukrok, aminosavak, zsírsavak, alkoholok). Ebben a lépésben olyan mikrobák játszanak fontos szerepet, melyek különböző típusú extracelluláris enzimekkel rendelkeznek (Bayer és mtsai. 2004). Ezeknek az enzimeknek a segítségével képesek hidrolizálni a nagy molekulájú anyagokat összetartó kötéseket, így kis molekulatömegű termékeket állítanak elő, melyeket már képesek a sejtek felvenni. A legtöbb hidrolízisben részt vevő törzs csak bizonyos típusú exoenzimet tud előállítani, így ahhoz hogy az összetett, nagy molekulákat tartalmazó biomassza megfelelően lebomolhasson, gazdag mikroba közösségre van szükség. A bomlás sebessége a hidrolízis fázisban függ a szubsztrát jellegétől. A cellulóz, és hemicellulóz bontása lassabban megy végbe, mint a fehérjéké és zsíroké (Warren 1996).

2.1.2 Savképző szakasz

A hidrolizáló törzsek fermentációs termékeit a savképző (acetogén) baktériumok alakítják tovább. Ebben a szakaszban található a legösszetettebb mikroba közösség, ugyanis itt sokféle anyag felhasználására van lehetősége a baktériumoknak (Colberg 1988, McInerney 1988). Ebben a szakaszban főként illékony szerves savak (ecetsav, propionsav, vajsav), nem illékony savak (borostyánkősav, tejsav, hosszú szénláncú zsírsavak), alkoholok, ammónia, szén-dioxid, és hidrogén keletkeznek. Az, hogy pontosan mely anyagok milyen arányban keletkeznek a szubsztráttól, a környezeti feltételektől (pl.: hőmérséklet, keverés) és a közösségben lévő mikroba csoportoktól függ. (Madigan és Martinko 2006).

2.1.3 Metántermelő szakasz

Ebben a szakaszban történik a metanogenezis, melyet speciális archaeák az ún. metanogén mikroorganizmusok végeznek. Ezeknek az organizmusoknak legfontosabb szubsztrátjai a szén-dioxid, a hidrogén és az acetát, de más anyagokat is, mint például metil-aminokat, bizonyos alkoholokat és formiátot is képesek felhasználni metántermelésre. Ezek a mikroorganizmusok oxigénre érzékenyek, sejtfaluk különleges, membránjuk egyedi lipid összetételű, s nem tartalmaz mureinsavat (Zeikus 1977). Talajban, vízi környezetben, emésztő szervrendszerben (pl. a kérődző állatok összetett gyomrában, de a humán bélflórában is) megtalálhatóak. A metanogének három fő csoportját különböztetjük meg. Az acetotróf metanogének acetátot használnak fel metántermelésre, melyből a szén-szén kötésekben tárolt kémiai energiát nyerik ki (Zinder 1993). Ez a folyamat a Wood-Ljungdahl útvonalon keresztül történik, melynek során az acetátot acetil-CoA-vá alakítják foszfotranszacetiláz és acetát kináz segítségével (Ferry 1997). A szén-monoxid dehidrogenáz az acetil-CoA-t metil csoportokra, CO-ra és CoA-ra bontja (Grahame és mtsai. 1991). A folyamat végén a CO oxidálódik szén-dioxiddá, ez elektronokat biztosít a metil gyökök metánná való redukciójához (Fischer és Thauer 1991). A hidrogenotróf metanogének a CO_2-ot metánná redukálják, mely folyamatban a hidrogén elektron donorként szolgál (Thauer és mtsai. 2008). Ebben a folyamatban a CO_2 redukciós útvonal az N-karboximetanofurán formilmetanofuránná történő redukciójával kezdődik. A redukáló

erőt az F420 (8-hidroxi-5-deazaflavin) koenzimen keresztül a hidrogenázok biztosítják. A központi elektronhordozó a hidrogenotróf metanogénekben az F420 (Deppenmeier és mtsai.1996). A metilotrófok metil csoportokkal rendelkező anyagokat (metanol, metilamin) használnak fel szubsztrátként, melyből metánt termelnek (Deppenmeier 2002). A metilotróf útvonal során a metil csoportok először a metanol:5-hidroxibenzimidazolil metiltranszferázhoz kapcsolódnak, majd onnan tetrahidrometanopterin segítségével metiltranszferázra kerülnek. Ezután a metil csoportok CH_4-ná redukálódnak, melyhez az F420 biztosít redukáló erőt. Egyes metanogének többféle metántermelő útvonalat is képesek folytatni, ezeket mixotróf metanogéneknek nevezzük. A metántermelők reprodukciós ideje hosszabb a baktérium törzsekénél (3-50 nap hőmérséklettől függően), ezért a fermentáció során megfelelően hosszú retenciós idővel kell számolni (Liu és Withman 2008). Ezek az Archaea fajok egyedi szerkezeti és funkcionális tulajdonságaik miatt a biogáz termelő közösség legérzékenyebb tagjai, így a metanogének az elsők, melyek érintettek a fermentációban bekövetkező zavarokban (pH változás, mérgező vegyületek) (Chen és mtsai. 2008, Liu és Withman 2008).

2.2 Biogáz termelő közösségek molekuláris vizsgálatai

A biogáz termelés folyamatában részt vevő fajok azonosítása gyakorlati jelentőséggel bír, ugyanis így következtethetünk arra, hogy az egyes fajok hol helyezkednek el a táplálékláncban, milyen feladatot láthatnak el, továbbá lehetőség nyílik arra, hogy a folyamatot, hatékonyabbá tegyük. A biogáz termelő közösség összetételének DNS alapú meghatározására alapvetően két megközelítés áll rendelkezésre. Az első a teljes közösség egy részének vizsgálata (pl. egy jellegzetes gén szekvencián keresztül), a másik stratégia a teljes értékű közösség vizsgálatok.

2.2.1 Biogáz termelő mikrobák közösségének célzott vizsgálati módszerei

A biogáz termelő közösség célzott vizsgálati módszerei olyan technikákat foglalnak magukban, amelyek a teljes közösség genetikai információjának egy részét vizsgálják (nem metagenomikai eljárások).

2.2.1.1 A 16S rRNS-t kódoló DNS szakasz vizsgálata

Ez az eljárás PCR-t használ fel, hogy a szelektálni kívánt régiót felsokszorozza a genomi DNS-ből a kimutathatóság érdekében. Az egyik kedvelt célpont a 16S riboszómális RNS-t kódoló DNS szakasz. Ez a génszakasz minden Eubacterium-ban és Archaea-ban megtalálható, mely egyedi azonosítást tesz lehetővé. Ezt a molekuláris marker gént használták fel anaerob biogáz fermentor mikrobiális vizsgálatára (Raskin és mtsai. 1995). Az oligonukleotid próbák a metanogének és szulfátredukáló mikrobák csoportjának 16S rRNS-t kódoló DNS egyes szakaszait vizsgálták. Az eredmények alapján a szulfát redukcióban a *Desulfovibrio* és *Desulfobulbus* nemzetségek voltak dominánsak, illetve a *Desulfobacter* és *Desulfobacterium* nemzetségek kisebb mennyiségben voltak jelen. A metanogének között pedig a Methanosarcinales rend volt a domináns, melynek tagjai a metanogenezis mindhárom útvonalát képesek használni. Griffin és munkatársai hasonló eredményre jutottak az említett marker gént használva a metanogének gyakoriságát illetően (1998). Kísérletükben a mixotróf *Methanosarcina* nemzetség volt túlnyomó többségben, míg a csak hidrogenotróf útvonalat használó Methanobacteriaceae családjába tartozó metanogének háttérbe szorultak. A további vizsgálatok riboszomális RNS-t kódoló DNS alapú oligonukleotid próbái ugyancsak különféle metanogéneket vettek célba (McMahon és mtsai. 2001). Az eredmények az előző két kísérlet sorozatot támasztották alá, miszerint a *Methanosarcina* nemzetség felelős leginkább az anaerob biogáz fermentorokban a metán termeléséért. Azonban a 16S rRNS-t kódoló DNS szakasz vizsgálatok ezekkel ellentétes eredményeket is hoztak az Archaea doménben. Delbès és kutatócsoportja a hidrogenotróf *Methanobacterium* nemzetséget találták dominánsnak (2001). Szerintük az acetotróf Methanoseata-k csak másodlagos szerepet kapnak a metántermelésben. Fontos szerepet tulajdonítottak a fermentációban a Firmicutes és a Bacteroides törzsek tagjainak. McHugh és munkatársai különböző hőmérsékleten működő bioreaktorokban az acetotróf Methanosaeta fajok dominanciáját figyelte meg (2003). Ezzel ellentétben Collins és munkacsoportja egy mezofil reaktorban a *Methanosarcina* nemzetség tagjait találta dominánsnak (2003). Újabb eredmények azt támasztották alá, hogy a domináns metanogének a hidrogenotrófok csoportjába tartoznak a mezofil biogáz fermentorban (Liu és mtsai. 2009, Bergmann és mtsai. 2010).

2.2.1.2 A Metil koenzim M reduktáz A szakaszának vizsgálata

A 16S rRNS-t kódoló DNS vizsgálat alternatívájaként léteznek más speciális gének is. Ilyen az *mcrA* gén, mely a metanogenezis egyik kulcs enzimét a metil koenzim M reduktáz A-t kódolja, amely az Archaea-kon belül csak a metanogén közösségre jellemző (Luton és mtsai. 2002). Ezt a speciális gént is többen használták a biogáz reaktor metanogén közösségének vizsgálatára (Rastogi és mtsai. 2008, Ács és mtsai. 2013). Rastogi és kutatócsoportja munkájukban a reaktor működésének két időpontjában vizsgálták a metanogének összetételének változását. Mindkét időpontban a hidrogenotróf Methanomicrobiales rend tagjai voltak többségben, az egyikben a Methanosarcinales a másikban a Methanobacteriales rend követte a Methanomicrobiales rendet. Mások ettől eltérő eredményeket kaptak (Zhu és mtsai. 2011). Azt találták, hogy a Methanobacteriales rend van többségben a Methanomicrobiales és Methanosarcinales rendek felett. Tehát a két munka egyetért abban, hogy a hidrogenotróf metanogenezis vezeti a metántermelést a mixotróf Methanosarcinales rend helyett, azonban a hidrogenotróf rendek dominanciájában nem mutattak ki egyezést. Későbbi tanulmányok a hidrogenotróf útvonal dominanciáját megerősítik (Kampmann és mtsai. 2012, Barret és mtsai. 2013). Ezek a munkák a Methanomicrobiales rend képviselőit mutatták dominánsnak.

2.2.1.3 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) vizsgálatok

Ez az ún. genetikai ujjlenyomat módszer az egyszálú DNS szerkezeti tulajdonságain alapszik. A módszer alapelve, hogy az egyszálú DNS fragmentumok - melyek különböző nukleotid sorrenddel rendelkeznek - egyedi másodlagos szerkezetet vesznek fel. A PCR terméket denaturálják az amplifikáció után, majd az egyszálú konformációk szétválasztása nem denaturáló poliakrilamid gélen, vagy kapilláris gélelektroforézis segítségével történik (Hiss és mtsai. 1994). SSCP technológiát alkalmaztak munkájuk során Delbès és kollégái. Laboratóriumi anaerob fermentorukban Spirochaetes és Clostridia fajokat detektáltak (2000). Leclerc és kutatócsoportja egy mezofil kísérleti reaktor metanogén közösségét vizsgálták. Megfigyelték, hogy a kísérlet időtartama alatt a metanogén közösség megváltozik, kezdetben a Methanomicrobia képviselői dominánsak, majd a fermentáció végére a Methanobacterium-ok kerülnek többségbe (Leclerc és mtsai. 2001). Chachkhiani és

munkatársai termofil batch fermentorukban a hidrogenotróf *Methanoculleus* nemzetséget találták dominánsnak. A Bacteria doménben főleg a Firmicutes törzsbe tartozó *Bacillus* fajokat azonosítottak (Chachkhiani és mtsai. 2004). Egy termofil szennyvíziszappal működő reaktor metanogénjeit vizsgálta Hori és kutatócsoportja. Eredményeik alapján az Archaea közösség főként a két hidrogenotróf *Methanothermobacter* és *Methanoculleus* fajok képviselőiből állt. Megfigyelték, hogy az illékony szerves savak alacsony koncentrációjánál -amikor a fermentáció stabilan működött- a *Methanoculleus* nemzetség került többségbe (Hori és mtsai. 2006). A hidrogenotróf metanogének jelentőségét emelik ki az acetotrófok felett Bauer és munkatársai is. Eredményeik szerint a Methanosarcinaceae család dominál, valamint jelentős mennyiségű Methanobacteriales rendbe tartozó fajt azonosítottak. Csupán egy acetotróf Methanosaetaceae osztályba tartozó szekvenciát találtak termofil fermentorukban (Bauer és mtsai. 2008). Mnif és munkacsoportja egy anaerob membrán bioreaktor mikrobiális közösségét vizsgálták. Eredményeik azt mutatták, hogy a Bacteria doménen belül a Bacteroides, Firmicutes, Synergistetes és Proteobacteria képviselői dominálnak, míg az Archaea doménben -ellentétben a fenti tanulmányokkal- az acetotróf *Methanosaeta*-k (Mnif és mtsai. 2012).

2.2.1.4 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) vizsgálatok

Az úgynevezett genetikai ujjlenyomat módszerek közé tartozik a denaturáló grádiens gélelektroforézis (DGGE) is. Az alapelv itt az, hogy a különböző PCR termékek szekvenciái nem azonosak, így különböző olvadási hőmérséklettel rendelkeznek. A PCR termékeket poliakrilamid gélen, egy denaturáló ágenst (karbamid, formamid) tartalmazó grádiensen szeparálják. Ezután a megfelelő sávokat kivágják a gélből, amplifikálják és szekvenálják. Ezt a módszert használták Liu és kollégái mezofil (37°C) és termofil (55°C) kísérleti reaktorok mikrobiális vizsgálatára. A Methanomicrobiales rendet találták mindkét körülmény között a leggyakoribbnak a Methanobacteriales és Methanococcales felett (Liu és mtsai. 2002). Termofil körülmények között a *Methanoculleus* nemzetség dominanciáját mutatták ki Tang és munkatársai alátámasztva a hidrogenotróf metanogenezis jelentőségét. Eredményeik alapján a Bacteria doménben a Firmicutes törzs képviselői a dominánsak (2004). Weiss és munkatársai termofil körülmények között alátámasztották a Firmicutes törzs, illetve a Methanobacteriales és Methanomicrobiales rendek dominanciáját (2008). Hwang és

kutatócsoportja DGGE technikát alkalmazva mezofil (37°C) batch fermentorukban a mixotróf Methanosarcinales rend képviselőit találták többségben a Methanobacteriales és Methanomicrobiales rendekkel szemben (2008). A fentiekkel ellentétben Supaphol és munkatársai mezofil fermentorban az acetotróf *Methanosaeta* nemzetség képviselőit találták dominánsnak, bár a Firmicutes törzs dominanciáját ez a munka is alátámasztja (2011).

2.2.1.5 Fluoreszcens In Situ Hibridizációs vizsgálatok

Egy másik eljárás a FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), mely a filogenetikai összetétel vizsgálatát teljes sejt hibridizáción keresztül fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próbák segítségével végzi. Ez a módszer is az egyes filogenetikai csoportokra jellemző speciális gének létét aknázza ki, így az előző eljárásokhoz hasonlóan hátránya, hogy ismeretlen gének vagy nem célpont mikrobák azonosítását nem teszi lehetővé. Azonban gyors és egyszerű egyes mikroba csoportok jelenlétének kimutatására, valamint a sejtszámra is következtethetünk (Price 1993). FISH technológiát alkalmazott Sekiguchi és kutatócsoportja is (1999). Munkájukban egy mezofil és egy termofil UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) fermentor mikroba közösségét vizsgálták. Kimutatták, hogy a fermentor granulumainak belsejében az acetotróf *Methanosaeta* nemzetség van többségben, melyeket a *Methanobacterium*, *Methanospirillum* és *Methanosarcina* nemzetségek képviselői követnek. Ezt a technikát alkalmazva Karakashev és munkatársai ugyancsak arra a következtetésre jutottak, hogy az acetotróf útvonal a domináns a metanogenezisben (2006), eredményeik a *Methanosaeta* nemzetség dominanciáját erősítették. Megfigyelték, hogy magas ammónia és illékony szerves sav koncentráció mellett a *Methanosarcina* nemzetség, míg alacsony ammónia és illékony szerves sav tartalom mellett a *Methanosaeta* nemzetség a domináns (Karakashev és mtsai. 2005). A FISH technológiát alkalmazva sem egyértelműek a metanogén mikrobák közötti dominancia viszonyok. Montero és kollégái a hidrogenotróf metanogenezis dominanciáját találták az acetotróf helyett (2009). Banks és munkatársai a FISH módszerrel szintén a hidrogenotróf útvonal képviselőit emelték ki a metán termelésében fő szereplőként (2012). Regueiro és kutatócsoportja megerősítették a hidrogenotrófok jelentőségét, valamint kimutatták a Bactéria doménben a Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria törzsek dominanciáját (2012).

2.2.2 Teljes közösségi vizsgálatok

Az automatizált Sanger szekvenálást általában „első generációs” szekvenálási technikának nevezik (Metzker 2009, Schadt és mtsai. 2010, Kovács és mtsai. 2014). A szekvenálási technológiák gyors fejlődésével a genomika tudománya a második (NGS-Next Generation Sequencing), majd a legújabb fejlesztések alapján a harmadik generációs (TGS-Third Generation Sequencing) szekvenátorok által új korszakba lépett. A metagenomika, azaz a teljes közösségi vizsgálatok körébe tartoznak azok a módszerek, melyek egy adott minta teljes genetikai információ tartalmát vizsgálják. Ennek segítségével teljes képet kaphatunk egy adott környezetben élő közösségről. A DNS szekvenciákat egyedi leolvasásokként vagy ezekből összeszerelt egybefüggő DNS szakaszokként ún. kontig-okként használhatjuk filogenetikai vagy funkcionális vizsgálatokra. Számos eszköz áll rendelkezésre metagenom adatok elemzésére. Egy közösség összetételére következtethetünk közvetlenül a nukleotid szekvenciából (Huson és mtsai. 2007, Brady és Salzberg 2009), a fehérje domént kódoló szekvenciákból (Finn és mtsai. 2010), vagy a 16S rRNS-t kódoló DNS szakaszokból (Schloss és mtsai. 2009). Az elemzésekből kapott eredményeket relatív értelemben ún. abundanciában mérhetjük (relatív fajmennyiség, egymáshoz viszonyított többség/kisebbség). Az újgenerációs szekvenátorok technológiája a jövőben várhatóan tovább fog fejlődni, mely magával vonja az adatok kiértékelésére használt bioinformatikai módszerek fejlődését is. 2003-ban az adenovírus DNS-ének megfejtésével a szekvenálási technológia belépett a következő korszakba. Ezt a munkát a Roche 454 piroszekvenátora segítségével végezték, mely lehetővé tette a rendkívül nagyszámú szekvenálási reakció egyidejű monitorozását (Margulies és mtsai. 2005). Azóta már számos újgenerációs technológia látott napvilágot, melyek különféle mechanizmusok alapján működnek. A következőkben a dolgozatban említett és munkám során használt szekvenálási technológia típusokat, illetve a biogáz termelő mikroba közösség metagenom ismereteit mutatom be.

2.2.2.1 Szintézis alapú szekvenálás

A szintézis alapú szekvenálási technológia lényege, hogy a DNS polimeráz által végzett nukleotid beépüléseket fotokémiai és/vagy fluoreszcens rendszerrel követik nyomon (Kovács és mtsai. 2014). Ebbe a kategóriába tartozik a Roche 454

piroszekvenátora. A szekvenálás előtti minta előkészítés során a DNS fragmentumokat adapterekkel (rövid mesterséges DNS szakasszal) látják el, majd ePCR (emulziós PCR) segítségével víz-olaj emulzióban mikrogyöngyökön könyvtárakat hoznak létre (Leamon 2003, Margulies és mtsai. 2005, Bentley és mtsai. 2008), ezzel felerősítve a szekvenálás során kapott jelerősséget. A 454 piroszekvenátor típustól függően (GS FLX, Titanium) 200-400bp hosszúságú leolvasásokat készít. A teljes kimeneteli szekvencia mennyiség átlagosan 300 és 500Mbp között mozog. A 454 megbízhatósága a vizsgált DNS homopolimer szakaszainak hosszától függ, ugyanis minél hosszabb ez a szakasz az annál negatívabban befolyásolja a hibaarányt (Marguiles és mtsai. 2005, Huse és mtsai. 2007). A piroszekvenátor által készített hosszú leolvasások lehetővé teszik a közvetlen felhasználást filogenetikai, vagy funkcionális elemzésre bioinformatikai szoftverek segítségével.

2.2.2.2 Ligálás alapú szekvenálás

A legtöbb szekvenátor megbízhatósága a DNS polimeráz nukleotid specificitásától és a beépítés pontosságától függ. Az Applied Biosystem SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) szekvenátora polimeráz helyett DNS ligázt használ a DNS fragmentumok másolására (Durfee és mtsai. 2008, Sivastan és mtsai. 2008). A minta előkészítés ePCR segítségével történik a fragmentumokat adapterekkel való ellátás után mikrogyöngyökhöz kötött primerekhez hibridizálják (hasonlóan a 454 előkészítési mechanizmusához). A szekvenálás során a DNS ligáz nukleotidok helyett fluoreszcensen jelölt próbák összekötésével építi fel a komplementáris szálat. Minden egyes templátot a rendszer többször szekvenál, minden körben egy előzőtől n-1-es pozíciójú primer segítségével. A többszöri leolvasásoknak köszönhetően a szekvenálandó DNS minden egyes nukleotidját kétszer olvassa le a rendszer, így igen magas megbízhatóságot kölcsönözve annak. A SOLiD rövid 35-50 nukleotid hosszúságú másolatokat készít, azonban szekvencia kihozatala átlagban 60-100Gbp, mely jóval magasabb a 454-énél (Voelkerding és mtsai. 2009). A rövid leolvasásokat gyakorlatban filogenetikai vagy funkcionális vizsgálathoz kontigokba (*in silico* leolvasás összeszerelés) rendezik össze bioinformatikai szoftverek segítségével.

2.2.2.3 Második és harmadik generációs szekvenálási technológiák határán

Az NGS és TGS technológiák között helyezkedik el a Life Technologies Ion Torrent PGM szekvenátora. Az Ion Torrent szekvenáló berendezés egy nagy érzékenységű félvezető chip segítségével érzékeli a szintézis alapú szekvenálás során felszabaduló hidrogén ionokat. Ez a fajta eljárás szükségtelenné teszi a szintézis során felszabaduló fény detektálását, így olcsóbbá, gyorsabbá téve a folyamatot (Rothberg és mtsai. 2011). Habár ez a technológia egy másik megközelítése a DNS nukleotid összetételének meghatározására, mégis a többi újgenerációs szekvenátorhoz hasonlóan nukleotid detektálással működik, illetve a minta előkészítés is a fentiekben tárgyalt lépéseken keresztül történik. Az Ion Torrent hasonlóan a 454 piroszekvenátor egyes típusaihoz 100-400bp hosszúságú leolvsásokat készít.

2.2.2.4 A biogáz termelő mikroorganizmus közösségek metagenomikai vizsgálata

Az újgenerációs szekvenátorok utat nyitottak a biogáz termelő anaerob mikroba közösségek összetételének és a mikrobák közötti kapcsolatoknak a vizsgálatában. A szakmai irodalomban fellelhető első beszámolókban, a biogáz iparban leggyakrabban használt állati ürülék és zöld biomassza, tipikusan silókukorica keverékét, hasznosító mezofil biogáz üzemek mikroba közösségét vizsgálták (Schlüter és mtsai. 2008, Krause és mtsai. 2008, Kröber és mtsai. 2009, Jeanicke és mtsai. 2011). Ezekben a munkákban két hasonló piroszekvenátort használtak a 454 GS FLX-et és a 454 Titanium-ot. A Titanium átlagos leolvasási hossza valamivel több, mint a GS FLX-é, valamint a kihozatala is magasabb (a GS FLX átlagos leolvasási hossza ~ 200-250 nukleotid, míg a Titanium ~350-400 nukleotid hosszúságú leolvasásokat készít). A két piroszekvenátor szolgáltatta leolvasásokat közvetlenül, kontig összeszerelés nélkül hasonlították össze különböző adatbázisokkal. Az adatok szoros korrelációt mutattak.

A Bacteria doménen belül a két szekvenátor nyújtotta információ szerint a Clostridia osztály képviselői voltak a legnagyobb mennyiségben a biogáz fermentorokban. A Clostridumok hatékony cellulózbontó tulajdonságokkal rendelkeznek (Jeanicke és mtsai. 2011), így jelenlétük esszenciális a lignocellulóz tartalmú szubsztrátok bontásában. Ugyancsak ismeretes erről az osztályról, hogy igen változatos anyagcsere utakat tudnak megvalósítani és számos képviselőjük

hidrogéntermelő aktivitással is rendelkezik. A vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a poliszacharidok bontásában legjelentősebb Clostridium fajok a *Clostridium thermocellum, C. cellulolyticum* és *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* függetlenül attól, hogy melyik piroszekvenátor adatait vesszük alapul.

A Bacteria doménhez hasonlóan egybecsengő eredményeket kaptak az Archaea doménben is. A 454 GS FLX és Titanium adatai szerint a Methanomicrobiales rend a legelterjedtebb csoport az Archaea-k között. A Methanomicrobiales rend képviselőinek mindegyike hidrogenotróf metanogén, melyek a szén-dioxidot redukálják, ehhez elektron donorként hidrogént használnak. Ebben a taxonban a *Methanoculleus* nemzetség *Methanoculleus marisnigri* volt túlnyomó többségben.

A két újgenerációs szekvenátor adatainak összegzéseként tehát elmondható, hogy a Firmicutes és a Bacteroides törzsek tagjai nagy mennyiségben vannak jelen a vizsgált mezofil biogáz fermentorban, így fontos szerepet játszhatnak a növényi biomassza, mint szubsztrát bontásában. Az Archaea doménben a Methanomicrobiales rend tagjai vannak túlnyomó többségben, melyek hidrogenotróf metanogének.

Kukorica silóval táplált mezofil reaktorban a Clostridiales, Bacteroidales rendek dominanciáját Hanreich és munkatársai megerősítik (2013). 454 GS FLX segítségével végzett vizsgálatuk alapján a Clostridiales rend tagjai felelősek leginkább a cellulóz bontásáért, míg a másodlagos fermentációért a Bacteroidales rend. Az Archaea doménben a Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanosarcinales rendek dominanciáját mutatták ki, azonban a hidrogenotróf metanogenezissel egyenértékűnek tekintik az acetotróf útvonal jelentőségét. A metanogének aránya a fermentorban csupán 4% volt, melyből arra következtettek, hogy a metanogének metabolikus aktivitása magas a rendszerben.

Sundberg és munkatársai 21 üzemi méretű biogáz fermentor mikrobiális közösségét elemezték a 16S rRNS gén vizsgálatán keresztül 454 GS FLX piroszekvenátor segítségével (2013). Ezen reaktorok közül hét (hat mezofil és egy termofil) szennyvíz iszappal és 14 (10 mezofil és 4 termofil) különböző összetételű biomassza (vágóhídi, éttermi, és háztartásbeli hulladék) kofermentációjával működött. Az eredmények alapján a bakteriális közösség minden esetben nagyobb számú és fajgazdagabb volt, mint az archeák közössége. Törzs szinten a szennyvíz iszappal működő reaktorokban az Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi, Spirochetes és Euryarcheoata-k voltak többségben, míg a különböző, összetett biomasszával működő reaktorokban a Firmicutes volt domináns. A leggyakrabban előforduló baktérium osztály a Clostridia

volt ezekben a reaktorokban. A szennyvíz iszappal működő reaktorokban az acetotróf metanogének voltak többségben, míg a kofermentációs fermentorokban a hidrogenotróf *Methanoculleus* és *Methanobrevibacter* fajok. Az acetotróf metanogének relatív hiánya a kofermentációt végző fermentorokban arra utalt, hogy az acetátból történő metán előállításban a szintrófikus acetát oxidálók vesznek főként részt a változatosabb összetételű biomasszával működő reaktorokban. Tehát a mikrobiális közösség összetételét főként a szubsztrát összetétele és a fermentációs hőmérséklet befolyásolja.

2.3 Mikroalga biomassza, mint alternatív szubsztrát

Ma a legtöbb mezőgazdasági biogáz üzemben kukorica szilázst és trágyát használnak fő biomassza szubsztrátként. A kukorica szilázs termesztési és feldolgozási ára egyre nő, valamint biogáz előállításra való felhasználása miatt csökken az élelmiszertermelésre használható földterület. A mikroalgák egy lehetséges alternatívát nyújthatnak a siló kukorica kiváltására. A mikroalgákat felépítő vegyületek között találunk lipideket, fehérjéket, szénhidrátokat, továbbá más értékes anyagokat (antioxidánsokat, zsírsavakat, vitaminokat), melyek mind kiváló tápanyagok a biogáz termelő mikroba közösség számára (Schmidt-Straiger 2009). További pozitív tulajdonsága a mikroalgák anaerob fermentációjának, hogy a biomasszájukból keletkező biogáz magasabb metán tartalommal rendelkezik (60-75%), mint a növényi biomasszából nyerhető gáz (De Schamphelarie és mtsai. 2009), valamint az ilyen módon keletkezett biogáz kevesebb kén tartalmaz, mely kén a gázmotorok életidejét károsan befolyásolja (Sun és mtsai. 2002). Az mikroalga anaerob bomlásának hatékonysága többek között függ azok betáplálási módjától, a mikroalga fajától, sejtfaluk vastagságától, a pH-tól, a hőmérséklettől és a retenciós időtől (Kovács és mtsai. 2014).

2.3.1 Mikroalgák anaerob fermentációja

A mikroalga biomasszával való biogáz termelés csekély számú kísérleti adatra támaszkodik, de története mégis több mint 50 évre nyúlik vissza. Golueke és munkatársai munkájukban *Scenedesmus sp.* és *Chlorella sp.* zöld algák keverékét használták fel anaerob fermentorok táplálására. Arra a következtetésre jutottak, hogy a legjobb emésztési teljesítmény 11-30 nap után 50°C-on következik be. Ilyen

körülmények között (20 literes fermentorban, melyben 11 liter volt a fermentációs térfogat) ~227 liter biogázt termeltek, melyben 71 liter CO_2, 142 liter CH_4, 14 liter H_2, nitrogén és egyéb gázok voltak mérhetők (Golueke és mtsai. 1956). Mások vizsgálták a különböző mikroalga fajok biomasszájából származó biogáz jellemzőit, valamint a fermentáció stabilitását (Uziel és mtsai. 1974, Keenan 1977, Binot és mtsai. 1978, Samson és mtsai. 1982, Becker és mtsai. 1983, Klaus és mtsai. 1984, Hernández és mtsai. 1993). Napjainkban is kutatás tárgya ez a téma. Mezofil körülmények között hat különböző elterjedt mikroalga faj anaerob fermentációját összehasonlítva (édes és sós vízi algákat, valamint cianobaktériumokat) a biomasszájukból származó biogáz CH_4 tartalma átlagosan 7-13%-al volt magasabb, mint a kukorica szilázsból származó biogáz esetében. Azonban a keletkező biogáz mennyisége a különböző mikroalga fajok esetében 10-40%-al alacsonyabb volt. A legjobb biogáz hozamot a *Chlamydomonas reinhardtii* szubsztrátként való felhasználásakor sikerült elérni (Mussgnug és mtsai. 2010). Megfigyelték, hogy a biogáz hozam összefüggésben van a mikroalga sejtfalának vastagságával, valamint a szubsztrát minőségével, a mikroalga szárítása 20%-al csökkentette a gázhozamot.

Egy szennyvíztisztítóból kinyert természetes alga közösség (meg nem határozott fajok) mezofil anaerob fermentációjának metanogén közösségét vizsgálták az *mcrA* gén és 454 GS FLX piroszekvenátor segítségével (Ellis és mtsai. 2012). Az *mcrA* szekvenciákat főként a *Methanosaeta* nemzetséghez lehetett kötni a Methanosarcinales renden belül. A *Methanosaeta*-k obligát acetotróf metanogének, tehát az eredmények alapján a vizsgált alga fermentációban az acetotrófoknak tulajdonítottak domináns szerepet. Számos szekvenciát nem tudtak azonosítani, így az alga fermentáció metanogén közösségének pontos összetétele ismeretlen maradt.

A mikroalga fermentációról tehát annyi ismert, hogy a legelterjedtebb szubsztráthoz, a kukorica szilázshoz képest valamivel kevesebb a biogáz egységnyi szerves szárazanyagra vonatkoztatott mennyisége, azonban minősége a magasabb CH_4 tartalom miatt jobb. A mennyiséget és a minőséget befolyásoló tényezők minden egyes faj esetében egyediek. A mikroalga fermentáció során az Archaea doménben a Methanosarcinales rend domináns, azonban a fermentáció teljes mikrobiológiai háttere munkám kezdetekor még ismeretlen volt.

3.CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatban bemutatott munkában a biogáz termeléssel kapcsolatos specifikus kérdéseket tanulmányoztam, amelyek a következők voltak:

1. A biogáz üzem szimulációs kísérlet során a kukorica szilázs és hígtrágya szubsztrátokkal működtetett üzemi biogáz fermentorokat kívántam modellezni. Célom ebben a kísérlet sorozatban az volt, hogy megvizsgáljam az anaerob lebontásban részt vevő mikroba konzorcium összetételét, továbbá a kapott eredményeket összehasonlítsam az irodalomból ismert nem metagenomikai vizsgálatok, és más újgenerációs szekvenátorok (454 GS FLX és 454 Titanium) adataival. Így kiegészíthetjük és validálhatjuk az újgenerációs szekvenátorok eredményeit és használatukat az olyan komplex minták vizsgálatában, mint a biogáz termelő közösség.
2. A mikroalgákat felhasználhatjuk biohidrogén gyártására is biomasszájuk biogázzá történő fermentálása előtt. A hidrogéntermelés után visszamaradó biomassza anaerob fermentációjának modellezése során célom volt az alga-baktérium keverékből keletkező biogáz minőségének, mennyiségének összevetése a kukorica szilázsból és a kofermentációból keletkezett biogázéval. Feladatul tűztem ki továbbá a kísérlet teljes időtartama alatt a fermentációs paraméterek nyomon követését, a fermentáció stabilitásának, illetve a fermentorok biogáz termelő mikroba közösségének vizsgálatát. Ezek a paraméterek validálhatják az alternatív szubsztrát hasznosítását biogáz előállításra.
3. Fotoautotróf módon tenyésztett *Scenedesmus obliquus* mikroalga mellett jelentősen kevesebb a szintróf baktériumok mennyisége, így meghatározhatjuk a mikroalga fermentációjában szerepet játszó mikroba közösséget. Ezekben a kísérletekben az előzőhöz hasonlóan a fermentáció stabilitásának, és a keletkezett biogáz mennyiségének, minőségének vizsgálata, továbbá a fermentációk mikroba közösségének monitorozása volt a cél, összevetve a baktériummal erősen kevert korábbi mintákkal.
4. A *Sc. obliquus* mikroalga fajra jellemző, hogy vastag sejtfallal rendelkezik, ezért nehezen fermentálható. Azonban minden olyan anyagot tartalmaz, mely a fermentor mikroba közösségének értékes tápanyag lehet. Így a mikroalga

biomasszát hőkezelésnek és a mikrohullámú kezelésnek vetettem alá. Ezekben a kísérletekben a cél a mikroalga biomassza különféle előkezelését követő változások vizsgálata volt az eredményesebb biogáz termelés szempontjából.

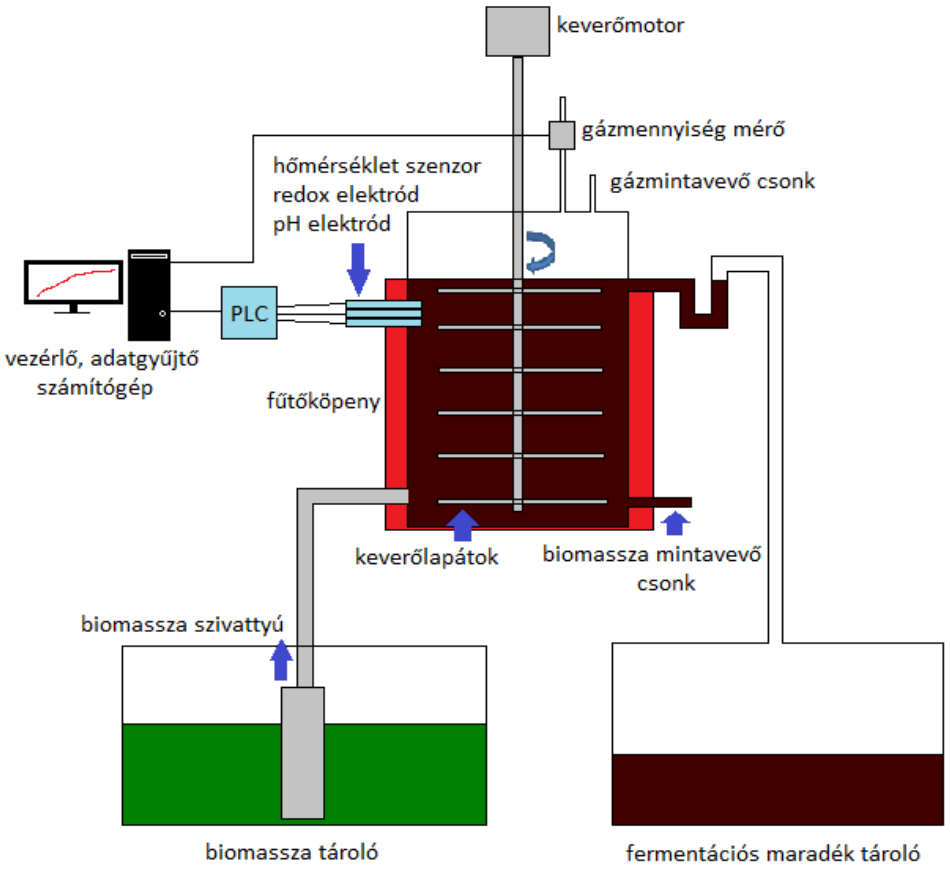
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletben használt vegyszerek a Qiagen, Zymo Research, Sigma, Reanal, és a Merck gyártók termékei. A kísérlethez használt mikroalga törzsek az Nyugat Magyarországi Egyetem Mosonmagyaróvári gyűjteményéből (*Chlamydomonas sp.* és *Scenedesmus sp.* keverék), valamint az ELMAT Kft.-től (Első Magyar Algatechnika Kft.) származtak (*Scenedesmus obliquus.*).

4.1. Alkalmazott fermentációs technológia

4.1.1. Félfolyamatos üzemű fermentáció

A félfolyamatos üzemű fermentáció speciálisan erre a célra egyedileg gyártott fermentorokkal történt (1. ábra). Az alkalmazott fermentor egy átalakított verziója a Kovács és munkatársai által leírt laboratóriumi anaerob fermentornak (2013).

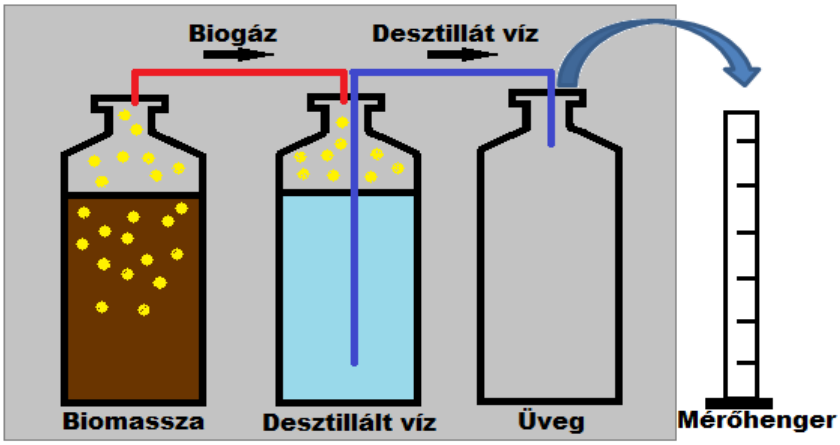


1. ábra. 5 literes folyamatos üzemű fermentorok sematikus felépítése.

A reaktor hasznos térfogata 5 liter, felette 1 liter gáztérfogat található. A redox potenciált, pH-t, valamint a keletkező gázmennyiséget a fermentorhoz kapcsolt számítógép rögzíti 4 óránként (napi 6 mintavételi pont). A szubsztrát biomassza egy tároló tartályban került elhelyezésre, majd a kívánt tartózkodási idő függvényében a rendszer megfelelő időközönként (esetünkben naponta egyszer –részletesebb leírás: 5.1, 5.2.1 és 5.2.2 fejezetek-) a fermentorba adagolja. A keverés spirális keverőlapát segítségével történik. Az egyedi fermentorokon kialakításra került egy folyadék és egy gáz mintavételi csonk. A fermentáció teljes időtartama alatt a pH-t és a tartózkodási időt (naponta beadagolt friss biomassza mennyiségét) meghatározott értéken tartottam. A hőmérsékletet elektromos fűtőköpeny segítségével az automatika a kívánt értéken (37°C±1°C) szabályozta. A pH-t 7,5-8,5 közötti tartományba állítottam be. A gáz mennyiségét közvetlen tömegáramú érzékelőkkel rögzítettük (DMFC Brooks Instruments). A kapott adatok gyűjtése, tárolása és kiértékelése egy speciális szoftver segítségével történt, melyet a Merat Kft. (Budapest) fejlesztett.

4.1.2. Batch típusú fermentáció

A batch típusú fermentáció során a vizsgálni kívánt biomasszát a fermentorba helyezzük, majd a rendszert lezárjuk. A biogáz keletkezése a fermentorban lévő biomassza elfogyásával leáll, ellentétben a folyamatos fermentációval, ahol a tápanyag utánpótlás folyamatos vagy szakaszos lehet. A batch-típusú fermentáció során a vizsgált biomassza biogázzá való átalakítását légmentesen zárható 150 ml-es térfogatú laboratóriumi reaktorokban végeztem. A folyadék fázis térfogata 100 ml volt. A fermentorokat kevert természetes kultúrát tartalmazó oltóiszappal indítottam, mely egy stabilan működő biogáz üzem fermentorából származott (Zöldforrás Energia Kft., Szeged). Az üzemi fermentor sertés hígtrágya és növényi biomassza (silókukorica és silózott cukorcirok) keverékét hasznosítja. A vizsgált biomasszával a reaktorokat 3 g száraz szerves anyag/liter -VDI 4630 1X- térterhelésnyi mennyiséggel töltöttem meg, a maradék térfogatot desztillált vízzel pótoltam. A VDI (Verein Deutscher Ingenieure) 4630 egy olyan szabvány, mely az adott szubsztrát maximális biogáz potenciáljának meghatározásához nyújt egységesített vizsgálati módszert (VDI Richtlinien 2006).



2. ábra. Batch fermentáció kísérleti elrendezése.

A reaktorok légterét nitrogén gázzal cseréltem ki, hogy biztosítsam az anaerob környezetet. A fermentorokat 37°C-os inkubátorba helyeztem. A keletkezett biogáz mennyiségét vízkiszorítás elvén alapuló rendszer segítségével vizsgáltam (2. ábra). Az eljárás lényege, hogy a fermentorhoz, amelyben az oltóiszap és a vizsgálni kívánt biomassza van egy második, vízzel töltött üveget csatlakoztatunk, így a gáz (sárga körök az ábrán) szabadon áramolhat a második üvegbe. A beáramló gáz a saját térfogatával egyenlő vizet szorít ki a harmadik üres üvegbe, melynek mennyiségét mérőhenger segítségével mértem le. A kísérlet során figyelembe kell venni, hogy a gázok térfogata különböző hőmérsékleten eltérő. Így a keletkezett gáztérfogatot normál állapotra számítottam át (15°C 1 bar) Gay-Lussac 2. törvénye alapján. A keletkezett biogáz minőségi meghatározása gázkromatográf segítségével történt (Agilent Technologies 6890N GC) a 4.8. pontban leírtak szerint.

4.2. Szárazanyag tartalom meghatározás

A szubsztrátként használt biomassza szárazanyag tartalmának meghatározásához 105°C-os szárítószekrényben a mintákat egy éjszakán keresztül szárítottam, majd a visszamaradt tömeg alapján következtettem azok szárazanyag tartalmára.

4.3. Szervesanyag tartalom meghatározás

A szárazanyag tartalom meghatározás után keletkezett mintákat 550°C-on hevítettem tömegállandóságig (Nabertherm LE 4/11/R6 kemence), a visszamaradt tömegből következtettem azok szervesanyag tartalmára.

4.4. Összes széntartalom, összes nitrogén tartalom meghatározás

A minták vizsgálatát Elementar automata analizátorral (Thermo Scientific, Elementar Vario MAX CN) végeztem. A műszer katalitikus oxidáció elvén működik, melyet magas hő és állandó oxigén ellátás alatt működtetünk (égési hőmérséklet: 900°C, utóégetés hőmérséklet 900°C, redukciós hőmérséklet: 830°C, oszlop hőmérséklete 250°C). A kívánt komponensek elválasztása egymástól abszorbciós cső segítségével történt (Sicapent-et tartalmazó, C/N méréshez tartozó cső), a detektálás termikus vezetőképesség detektorral történt. A mérés során kalibrációt követően (a kalibráció aszkorbinsavval történt) következtettem a minták szén és nitrogén tartalmára. A mérés során hélium volt a hordozó gáz.

4.5. A biogáz minőségi összetételének vizsgálata

A keletkezett biogáz összetételének meghatározását gázkromatográf (GC) segítségével végeztem el. A GC típusa: Agilent Technologies 6890N GC. Ennek részletei: Split/splitlers inlet HP –MOLESIEVE 5Å 30m, 0,53mm x 25µm filmvastagság, nitrogén vivőgáz. 0,2:1 splittarány 150°C-os belhőmérséklet 160ml/min áramlási sebesség a kolonnán, 60°C-os kolonnatér hőmérséklet, TCD detektor hőmérséklet 160°C. A folyamatos üzemű fermentorokon kialakítottunk egy gázminta vételre alkalmas szeptumot, melyen keresztül vettem a gázmintákat (1. ábra). A batch fermentor üvegek szájára egy gázminta vételre alkalmas szeptumot erősítettem, ezen keresztül vettem a gázmintákat.

4.6. pH meghatározás

A minták pH értékét pH mérő elektród (Radelkis 1, Budapest) segítségével mértem.

4.7. Sűrűség meghatározás

A minták sűrűségét automata sűrűségmérő berendezéssel határoztam meg (Grabner Instruments, MINIDENS).

4.8. Ammónium- ion tartalom meghatározás

A minták ammónium–ion tartalmának vizsgálata Spectoquant Nova 60 (Merck) reagensteszt (1.00683.0001) segítségével történt. A használt műszer spektrofotometriás elven működik, ezért a mintákat mérés előtt először szűrőpapíron, majd 0,2µm pórusátmérővel rendelkező fecskendőszűrőn leszűrtem, hogy az esetleges szennyeződések fényszórásából származó hibát kiküszöböljem.

4.9. Az összes szerves sav és pufferkapacitás meghatározása

A minták összes szerves sav tartalmát, valamint pufferkapacitását Pronova FOS/TAC 2000 típusú automata titráló berendezéssel vizsgáltam. 0,1N H_2SO_4 titráló oldat felhasználásával a mintákat pH=4,3-ig titráltam. A mérés során az FOS (Flüchtige Organische Säuren: összes szerves sav), a TAC (Totales Anorganisches Carbonat: pufferkapacitás) és a kettő hányadosa (FOS/TAC) határozható meg. A FOS értékét g ecetsav-egyenérték/l - ben határozzuk meg, míg a TAC mérés elfogadott egysége g $CaCO_3$/l-ben adunk meg.

4.10. Mikroorganizmusok

4.10.1. Kevert természetes kultúra (oltóiszap)

A kísérletben használt biogáz fermentációt indító oltóiszap mikroba keverék egy működő biogáz üzem anaerob reaktorából származott (Zöldforrás Energia Kft., Szeged). A reaktorokat kukorica szilázs (70% száraz anyag tartalom –szá.–) és sertés hígtrágya (~ 30% szá.) keverékével táplálták, a fermentációs hőmérséklet 37°C, pH= 7,5-8,5.

A biogáz üzem szimuláció során a laboratóriumi reaktorokban a fermentációs paraméterek a következők voltak: pH= 7,9 – 8,2, ammónium tartalom: 1,5-2,1g/l, acetát koncentráció: 0,1g/ml, összes szerves sav mennyisége: 1,6g/l, pufferkapacitás: 9,28g $CaCO_3$/l.

A különböző mikroalga biomasszák biogázzá való fermentálásának kísérleteit megelőzően az oltóiszapban maradt szerves anyagok lebomlása érdekében a kísérleti fermentorokba betöltött 5 liter oltóiszapot egy hétig 37°C-on inkubáltam. Ennek célja, hogy az oltóiszapban maradt szerves anyag maradék is lebomolhasson és a szubsztrátok hatását a mikroba konzorciumra és a biogáz termelődésre zavartalanul nyomon

követhessem. A mikroalgákkal folytatott kísérletekben használt oltóiszapok paramétereit az 1. táblázat foglalja össze.

Óltóiszap paraméter /kísérlet	Alga és szintróf baktériumok keveréke	*Sc. obliquus*	Előkezelt *Sc. obliquus*
Ammónium (mg/l)	1100	2280	2130
pH	7,5	8	8
FOS (g/l)	1,5	2,47	2,13
TAC ($gCaCO_3$/l)	7,5	13,22	13,54
FOS/TAC	0,2	0,19	0,16

1. táblázat. A folyamatos fermentáció során használt oltóiszapok paraméterei a kiindulási időpontban.

4.11. Szubsztrát biomasszák

Az alábbi táblázat a dolgozatban tárgyalt négy kísérlet sorozat (1.: biogáz üzem szimuláció, 2.: mikroalga-baktérium keverék fermentáció, 3.: fotoautotróf módon tenyésztett mikroalga fermentáció 4.: *S. obliquus* előkezelés hatásának vizsgálata a fermentációra) során használt szubsztrátok főbb paramétereit foglalja össze.

Szubsztrát	Nedves tömeg N (mg/g)	Nedves tömeg C (mg/g)	C/N arány	Szárazanyag tartalom (%)	Szervesanyag tartalom (%/SZÁA)
1., 2. és 4. kísérlet kukorica siló (kontroll)	4,35	196,86	45,3: 1	41,19	94,59
Harmadik kísérlet kukorica siló (kontroll)	4,86	147,05	30,3: 1	32,28	91,79
***Scenedesmus sp. és Chlamydomonas sp.* keverék és szintrófjai (vizsgált szubsztrát)**	18,65	98,33	5,3: 1	30,30	88,83
Fotoautotróf *Sc. obliquus* (vizsgált szubsztrát)	8,10	72,22	8,9: 1	16,99	97,71

2. táblázat. Szubsztrát biomasszák paraméterei.

A mikroalga keverék–baktérium biomasszát átfolyós centrifuga segítségével választottam el a tápfolyadéktól. A centrifugált biomasszát, illetve a többi szubsztrátot (kukorica siló, *Sc. obliquus*) felhasználásig -20°C-on tároltam.

4.12.Mikroalga tápoldatok

4.12.1. ***Chlamydomonas sp.* és *Scenedesmus sp.* kevert mikroalga kultúra tápoldata**

A kevert mikroalga kultúra növesztéséhez TAP (TRIS-acetát-foszfát) tápoldatot használtunk fel, mely a következő komponensekből áll (Gorman és mtsai. 1965):

1. TAP sók:

NH_4Cl	15.0 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	4.0 g
$CaCl_2 . 2H_2O$	2.0 g

1 liter vízzel kiegészíteni

2. Foszfát oldat:

K_2HPO_4	28.8 g
KH_2PO_4	14.4 g

100 ml vízzel kiegészíteni

3. Hunter féle nyomelemek:

EDTA Na_2	50 g	250 ml
$ZnSO_4 . 7 H_2O$	22 g	100 ml
H_3BO_3	11.4 g	200 ml
$MnCl_2 . 4 H_2O$	5.06 g	50 ml
$CoCl_2 . 6 H_2O$	1.61 g	50 ml
$CuSO_4 . 5 H_2O$	1.57 g	50 ml
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4 H_2O$	1.10 g	50 ml
$FeSO_4 . 7 H_2O$	4.99 g	50 ml

4. A végső tápoldat elkészítése:2.42 g Tris-HCl, 25 ml 1. oldat (sók), 0.375 ml 2. oldat (foszfát), 1.0 ml 3. oldat (nyomelemek), 1.0 ml acetát, 1 liter vízzel kiegészíteni, pH 7-re állítani HCl-el.

4.12.2. *Scenedesmus sp.* tápoldata (BG11)

A növesztéshez használt tápoldat összetett, különböző részkomponensek keverékéből épül fel, melyek a következők (Rippka és mtsai. 1979, Stainer és mtsai. 1971).

- Stock I. (100 ml):
  - 0,3g Citromsav;
  - 0,3g Vas-ammóniumcitrát;
  - 0,05g EDTA-Na_2
- Stock II. (1000 ml):
  - 30g $NaNO_3$;
  - 0,78g K_2HPO_4;
  - 1,5g $MgSO_4x7H_2O$
- Stock III. (100 ml):
  - 1,9g $CaCl_2x2\ H_2O$
- Stock IV. (100 ml):
  - 2g Na_2CO_3
  - (5,04g $Na_2CO_3x10\ H_2O$)
- Stock V. (1000 ml):
  - 2,86g H_3BO_3
  - 1,81g $MnCl_2x4\ H_2O$
  - 0,222g $ZnSO_4x7\ H_2O$
  - 0,39g $Na_2MoO_4x2\ H_2O$
  - 0,079g $CuSO_4x5\ H_2O$
  - 0,04g $Co(NO_3)_2x6\ H_2O$

Végső tápoldat elkészítése:1000 ml BG11 esetében = 904 ml desztillált víz + 2 ml Stock I. + 50 ml Stock II. + 2 ml Stock III. + 1 ml Stock IV. + 1 ml Stock V. A tenyésztést az ELMAT kft. végezte.

4.13. DNS izolálási technikák

4.13.1. CTAB alapú tisztítás

A fermentorokból származó 2ml minta pelletjét (centrifuga: 13000 rpm 10 perc) használtam a teljes közösségi DNS preparálására, melyet CTAB (cetil-trimetilammónium-bromid) alapú lízisoldattal tártam fel (Miller és mtsai. 1999, Entcheva és mtsai. 2001, Minas és mtsai. 2011). Ennek összetétele 1 literre: 1M Tris-HCl (tris-hidroximetil-aminometán – sósav) 100ml, 500mM EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) 50ml, 5M NaCl 300ml, 10% CTAB (10g), 20% SDS (nátrium-dodecil-szulfát) (20g), pH=8. A lizálás egész éjszakán át 50°C-on történt. Fenol-kloroform 1:1-es térfogati arányú keverékét használtam a szennyeződések eltávolítására, majd a genomi DNS-t 90%-os etanollal csaptam ki. A DNS pelletet 100µl TE (Tris-EDTA összetétel: 1M Tris, 1M EDTA) pufferben vettem fel (Sambrook és mtsai. 1989). A tisztított DNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Washington, USA) segítségével spektrofotometrikusan határoztam meg. A DNS tisztaságát agaróz gélelektroforézissel teszteltem (1%-os agaróz gél, felvitt DNS oldat térfogata 2µl). Az elfogadható DNS tisztasága A_{260}/A_{280}=1.8, mennyisége legalább 200-800 ng/µl.

4.13.2. Módosított Zymo Research kittel történő genomi DNS tisztítás

A kittel történő genomi DNS preparálás során három lízisoldat keveréket használtam minden egyes mintára (2ml minta üledéke) párhuzamosan.

1. Lízisoldat összetétele:

550µl Zymo Research (ZR) lízis oldat
100µl 10% CTAB
100µl Qiagen lízis oldat

2. Lízisoldat összetétele:

300µl Zymo Research lízis oldat
250µl lizozim (100mg/ml)
100µl Qiagen lízis oldat
100µl 10% CTAB

3. Lízisoldat összetétele:

300µl genomi CTAB alapú lízis oldat
250µl lizozim (100mg/ml)

200µl Qiagen lízis oldat

A Zymo Research lízis oldat a ZR Fecal DNA MiniPrep-hez tartozó lízisoldat, a Qiagen lízisoldat pedig a QIAmp DNA Stool minikit-hez tartozó ASL puffer, a genomi CTAB alapú lízis oldat az előző protokollban használt oldat. Az egy típusú három párhuzamos minta pelletjét három lízis oldattal szuszpendáltam fel, majd ez a Zymo Research kit protokollja alapján golyós lizálócsőbe helyeztem, és maximális sebességen 3-5 percig vortexeltem. A feltárás után a ZR kit protokollját követtem.

4.14. Metagenomika

4.14.1. A kísérletekben használt szekvenáló berendezések

A kísérletek során két eltérő mechanizmus alapján működő újgenerációs szekvenátort használtunk az Applied Biosystems SOLiD V4 típusú szekvenátorát, valamint a Life Technologies Ion Torrent PGM szekvenátorát.

	Applied Biosystems SOLiD V4	Life Technologies Ion Torrent PGM
Leolvasási hossz	35-50bp	100-200bp
Szekvenciák száma	100 millió	100-200 ezer
Megbízhatóság	99,99%	98-98,5%
Futási idő	3-7 nap	3-6 óra

3. táblázat: A két szekvenátor főbb paramétereinek összehasonlítása.

4.14.2. Minták előkészítése, szekvenálása

SOLiD V4 szekvenátor esetében:

A fragment könyvtár készítésére a SOLiD Fragment Library Core Kit-el történt (Life Technologies, LT). A genomi DNS 100-250bp-os darabolására a Covaris S2 rendszert használtuk. A darabolt DNS-eket P1 és P2 adapterekkel láttuk el. Ezután a templátokat méret szerint elkülönítettük, majd AgencourtAMPure XP (Beckman Coulter) segítségével a PCR termékeket tisztítottuk. Nick transzlációhoz Platinum PCR Amplification Mix-et (reagens keverék) alkalmaztunk, majd a fragment könyvtárat qPCR készülékkel kvantitáltuk a SOLiD Library TaqMan Quantitation kit segítségével (Life Technologies). A templátok kolónia amplifikációja emulziós PCR-el történt. A templátokkal dúsított gyöngyöket SOLiDFlowchip-re töltöttük, majd a slide-ot SOLiD V4 rendszerbe helyeztük és a gyártó protokollja alapján szekvenáltunk.

Ion Torrent PGM esetében:

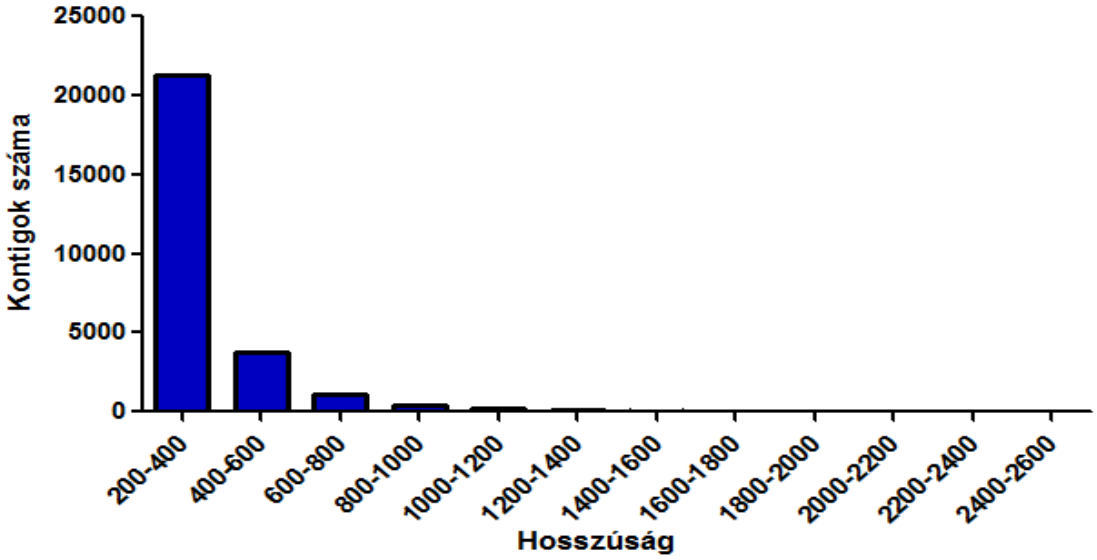
A minta könyvtárak előkészítése a Life Technologies IonXpress plus fragment library kit (4471269) protokollja szerint történt. Az előkészített minták kvantitálását Step One Real time PCR (Applied Biosystems) készülék segítségével az Ion library (Tachman) Quantitation kit (4468802) használatával végeztük. Az emulziót Ion OneTouch 2 és Ion OneTouch ES készülékkel végeztük az Ion PGM Template OT2 200 kit felhasználásával (4480974). Minden szekvenálás során a minták elkülönítése céljából a DNS szekvenciákat molekuláris „vonalkódokkal" (barcode) láttuk el. A barcode-olásra az IonXpress barcode kitet használtuk (4471250). A szekvenálást Ion PGM 200 seq. kit-el végeztük (4474004) az Ion Torrent PGM 316-os chip-jén.

4.14.3. Kiértékelésre használt bioinformatikai szoftverek

A kísérletek során a két típusú szekvenátorból nyert adatokat eltérően kezeltük. A SOLiD tulajdonsága (2.2.2.2 fejezet és 3. táblázat), hogy nagy mennyiségű leolvasást produkál, azonban ezek hossza átlagosan 35-50 nukleotid, míg az Ion Torrent 100-200 nukleotid hosszúságú leolvasásokat készít. Ezért a további (faj, funkcionális) elemzések előtt a SOLiD szekvenátor által kapott leolvasásokat kontigokba rendeztük össze, míg az Ion Torrent esetében a nyers szekvenciákat használtuk.

4.14.3.1. Kontig összeszerelés

Az átlagosan 50 nukleotid hosszúságú leolvasásokat a CLC Bio cég Genomics Workbench 4.6 programja segítségével illesztettem össze kontigokba (CLC Bio Genomics Workbench). A beállított paraméterek a programban a következőek voltak: minimum contig length=200, similarity=0.8, length fraction=0.5, insertion cost=3, deletion cost=3, mismatch cost=2, color space alignment=yes, color error cost=3. Az összeszerelt kontigok száma 26892 volt, melyek 8978367bp-t foglaltak magukba. Az összeszerelés során 288 több mint 1000bp hosszúságú kontig keletkezett. Az átlagos kontig hossz 333bp. A kontighosszak eloszlását az 3. ábra foglalja össze.



3. ábra. A SOLiD szekvenálással nyert kontigok hosszúságának eloszlása.

4.14.3.2. Adatok kiértékelésére használt online szerver

Az összeszerelt kontigokat, valamint az Ion Torrent segítségével kapott nyers leolvasásokat az MG-RAST online szoftver csomag segítségével elemeztem, amely a RAST (Rapid Annotations based on Subsystem Technology) módosított változata (Meyer és mtsai. 2008). Az MG-RAST szerver kezdetben egy minőség ellenőrző tesztet futtat. Ha az adatok megbízhatónak bizonyulnak (egy automatikusan beállított minőségi határt meghaladnak), akkor a rendszer az adatokat automatikusan potenciális fehérje kódoló régiókhoz köti (PEGs: Protein Encoding regions) a BLASTX keresőn (Atschul és mtsai. 1997), valamint a SEED adatbázison keresztül, melyet aztán további nyilvánosan elérhető szekvencia központokkal vet össze (Overbeek és mtsai. 2005). Ezek az adatbázisok magukba foglalnak riboszomális DNS adatbázisokat, mint a GREENGENES (DeSantis és mtsai. 2006), RDP II (Cole és mtsai. 2007), és az European 16 S RNA (Wuyts és mtsai. 2002), valamint más forrásokat is. A biogáz üzem szimulációs kísérlet során az összeszerelt kontigokat funkcionálisan ún. klaszterekbe soroltam (COGs: Clusters of Orthologous Groups of proteins) az MG-RAST szerver segítségével, hogy a gének eloszlását is nyomon követhessük. A filogenetikai rekonstrukcióhoz a SEED és a riboszomális RNS adatbázisokat használtam. A funkcionális összehasonlítások során először tehát PEG számítás történik, majd ezeket SEED FIGfams-hoz (Meyer és mtsai. 2009), illetve további adatbázisokhoz kötjük (Overbeek és mtsai 2005), az MG-RAST egyedi M5nr bázisán keresztül (M5nr: non redundant protein database). Az automatikus elemzések után a filogenetikus és

funkcionális rekonstrukcióhoz a felhasználói felület további paraméterek beállítását teszi lehetővé (Meyer és mtsai. 2008). A vizsgálatok során ezek a beállítások a következőek voltak: a kontigok/leolvasások adatbázisokhoz való százalékos egyezése: >70%, minimum leolvasási hosszak: 35 nukleotid, e-érték határ: $<10^{-6}$.

4.14.3.3 Az adatok kiértékelése

A biogáz üzem szimulációs kísérletben a metagenomikai adatok kiértékelésekor az MG-RAST M5nr adatbázisa nyújtotta abundancia értékeket tüntettem fel az előző fejezetben tárgyalt beállított paraméterek szerint.

A mikroalga biomassza fermentációs kísérletekben ugyancsak az M5nr adatbázist használtam a megadott paraméterekkel, bár itt a mikrobák egymáshoz viszonyított arányát a fermentációk során átlagos relatív abundancia értékben adom meg (százalékos abundancia érték) (Kovács és mtsai. 2013).

4.15 *Scenedesmus obliquus* mikrohullámú kezelése

A mikrohullámú kezeléseket egy háztartási mikrohullámú berendezésből átalakított, folyamatos anyagtovábbítású készülékben végeztük. A berendezésben a mikrohullámú energiát 700W teljesítménnyel, 2450 MHz frekvencián sugárzó magnetron biztosítja. Az anyagtovábbításra perisztaltikus pumpát használtunk. A kezelt anyag a rezonátor-térben egy 8mm belső átmérőjű spirális csőben áramlott, amely - a mikrohullámú hőkeltés minimalizálása céljából- PTFE alapanyagból készült. A folyamatos anyagtovábbítású kezeléseknél 150ml/perc átáramlási térfogatáramot alkalmaztunk, a fajlagos kezelési teljesítményintenzitás (mikrohullámú teljesítmény/a kezelőtérben aktuálisan tartózkodó anyag térfogata) 5,3W/ml volt. A kezelt minta hőmérséklete 82-85°C tartományban változott. A munkát az SZTE Mérnöki Karával együttműködésben végeztem.

5. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK

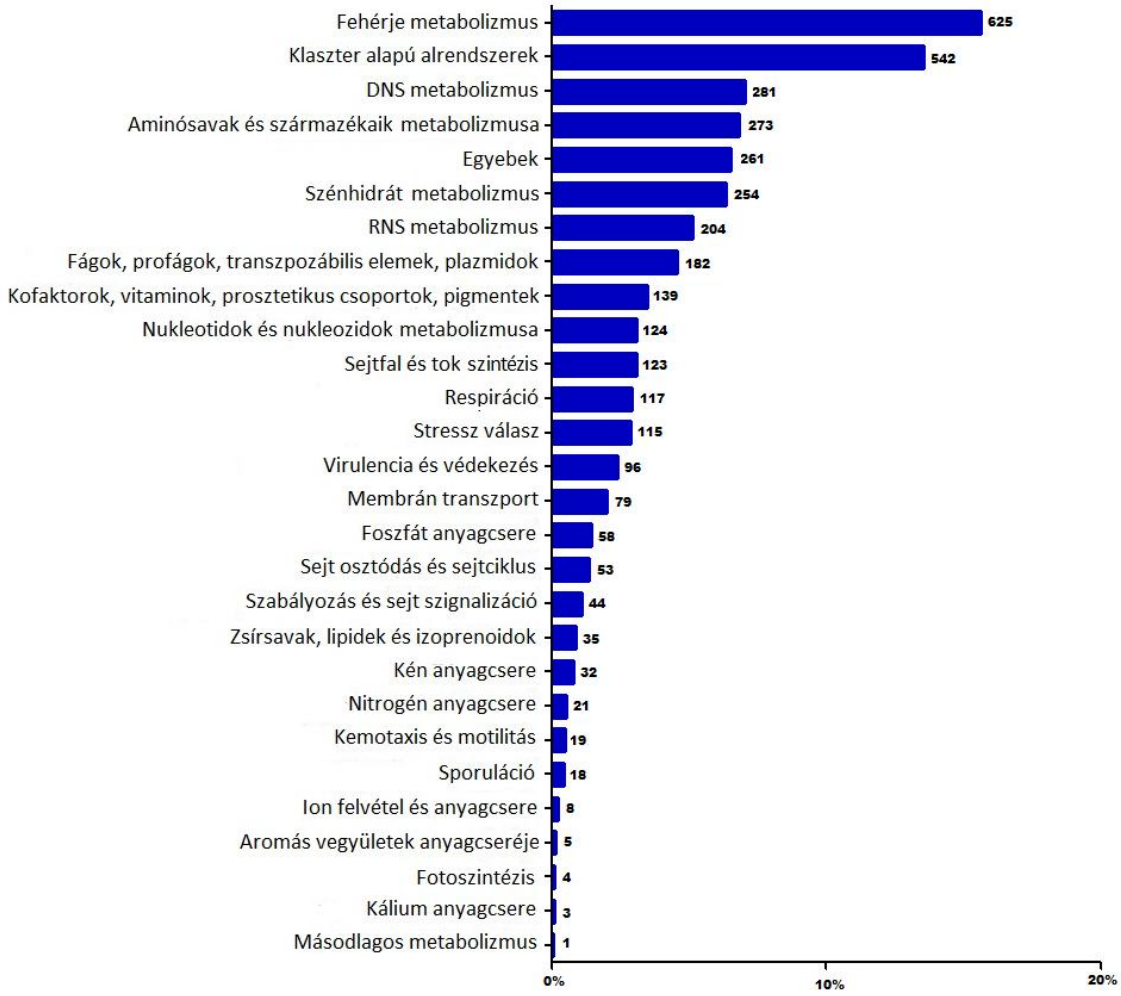
Az eredményeket két részre osztottam: az első részben egy kukorica szilázzsal működtetett kísérleti 5 literes fermentor mikroba közösségét vizsgálom meg SOLiD újgenerációs szekvenátor segítségével. A kukorica szilázs a legelterjedtebb szubsztrát a biogáz üzemekben, de gazdasági és élelmiszer biztonsági megfontolások alapján a biogáz üzemek alternatívákat keresnek. Olyan megoldások jöhetnek számításba, melyek segítségével megtartható az előállított biogáz minősége és szervesanyag tartalmára vonatkoztatott mennyisége. Egy ígéretes jelölt lehet erre a mikroalga biomassza. Biomasszájukat közvetve, illetve közvetlenül csak biogáz előállításra is felhasználhatjuk. A dolgozat második felében az alga biomasszát, mint alternatív szubsztrátot vizsgáljuk a biogáz termelés és stabilitás szempontjából, valamint ennek mikrobiális hátterét.

5.1 Biogáz üzem szimuláció

A kísérletek során a kukorica szilázzsal és állati trágyával, mint szubsztráttal működtetett üzemi biogáz fermentorokat kívántuk modellezni. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az anaerob lebontásban részt vevő mikroba konzorcium összetételét, továbbá, hogy a kapott eredményeket összehasonlítsuk az irodalomból ismert nem metagenomikai vizsgálatok, illetve más újgenerációs szekvenátorok (454 GS FLX és 454 Titanium) adataival. A 454 piroszekvenátorok eltérő mechanizmussal és kihozatallal dolgoznak, mint az általunk használt SOLiD szekvenátor. A SOLiD szekvenátor nagy pontossága és szekvencia kihozatala lehetővé tette, hogy az irodalomban egyedülálló módon biogáz termelő közösség tanulmányozására használjuk. Az egyéb újgenerációs szekvenátorok eredményeit kívántuk így validálni, illetve azok használatát az ilyen komplex minták tanulmányozásában.

5.1.1 A szimuláció mikrobiális közösségének metabolikus vizsgálata

Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a biogáz termelő közösségek összetett biokémiájába az összeszerelt kontigokat funkcionálisan fehérje klaszterekbe (FK) csoportosítottuk. Ennek eredményét a 4. ábrán foglaltam össze.



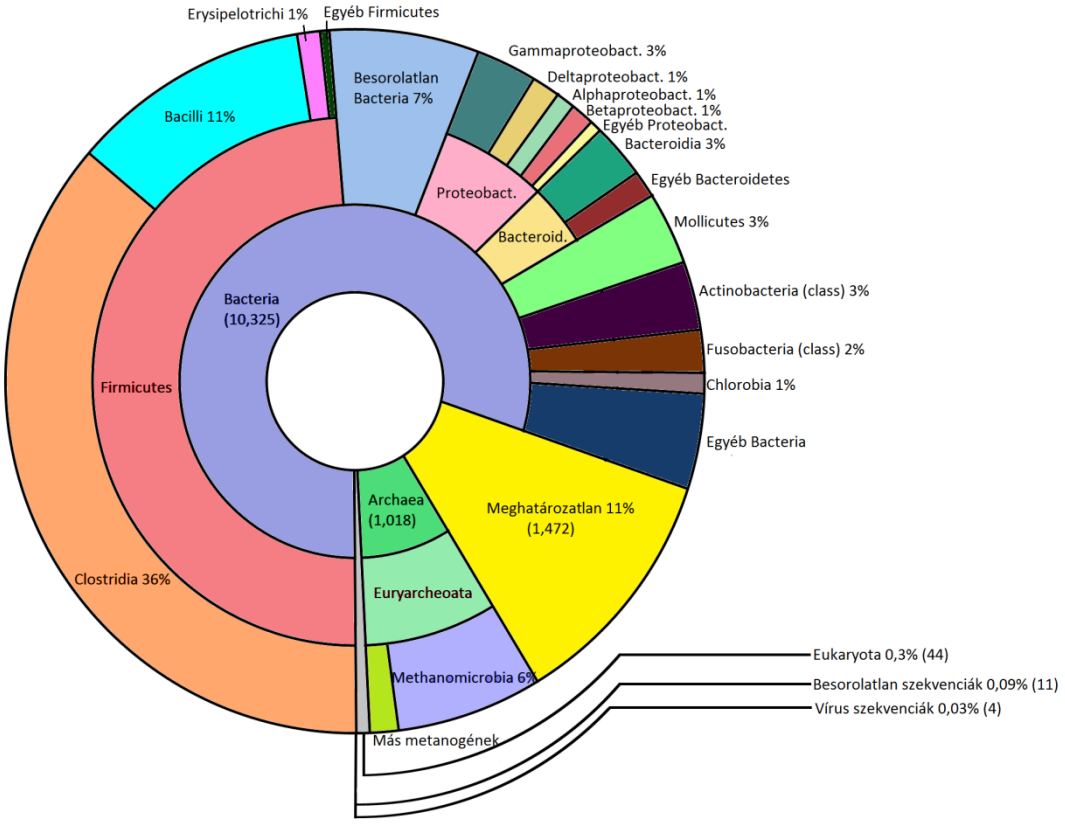
4. ábra: Funkcionális hierarchikus osztályozás.

A legtöbb FK az információraktározáshoz és szerves makromolekulák (fehérjék, nukleinsavak, lipidek, és szénhidrátok) anyagcseréjéhez köthető. Továbbá sok FK a sejt komponensek bioszintéziséhez sorolható, mint a sejtfal és vitaminok szintéziséhez, valamint a védekező mechanizmusokhoz, stressz válaszokhoz. Ezek a funkciók a mikrobiális közösség megfelelő működéséhez szükségesek. A nagyszámú fehérje és DNS metabolizmussal kapcsolatos fehérje kalszterekből arra következtethetünk, hogy a sejtek a fermentorban aktívak. Az energiatermelés és raktározás funkciók szintén jelentős szerepet képviselnek a rendszerben. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi tanulmányokkal, melyek azt mutatták, hogy a „háztartási" (house keeping) és szénhidrát anyagcsere mechanizmusok dominálnak. A szénhidrát anyagcsere COG-be tartoznak azok a gének is, melyek fehérje termékei a cellulóz bontásában játszanak szerepet, tehát fontosak a cellulóz tartalmú biomassza degradációjában. A filogenetikus és funkcionális vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a Firmicutes törzs cellulózbontó tulajdonsága miatt kiemelkedő jelentőségű a biogáz termelő közösségünkben, mely

eredmény összhangban van korábbi vizsgálatokkal (Schlüter és mtsai. 2008, Krause és mtsai. 2008, Kröber és mtsai. 2009, Jeanicke és mtsai. 2011).

5.1.2 A kísérleti biogáz fermentorok mikrobiális összetételének vizsgálata

A SOLiD által kapott nyers leolvasásokat kontigokba szereltük össze, ezeket használtuk fel a taxonómiai vizsgálatok során. A beazonosított mikrobák listája alapján a Bacteria és Archaea domének fajai a mikroba közösség domináns képviselői. A relatív eloszlást foglalja össze az 5. ábra.



5. ábra. Biogáz közösség taxonómiai eloszlása. A koncentrikus körszelvényekben belülről kifelé haladva a közösség domén, törzs és osztály szerinti besorolásait tüntettem fel.

Általában megállapíthatjuk, hogy a Bacteria doménen belül a Firmicutes törzs bizonyult leggyakoribbnak. A Clostridia és Bacilli osztályok képviselik a törzsön belül előforduló legnagyobb gyakorisággal rendelkező taxonómiai egységet. Az Archaea doménben a beazonosított fajok nagy része a Methanomicrobiales rendbe tartozik. A fent említett szisztematikus csoportokat a korábbi vizsgálatok során is azonosították sertés hígtrágyával és kukorica szilázzsal működtetett biogáz reaktorokban (Schlüter és mtsai. 2008, Krause és mtsai. 2008, Kröber és mtsai. 2009, Jeanicke és mtsai. 2011,

Wirth és mtsai. 2012). Megjegyzendő, hogy számos szekvencia nem mutatott homológiát egyetlen ismert szekvenciájú mikrobával sem. Ebből arra következtetünk, hogy a biogáz fermentorokban számos beazonosítatlan faj él. A továbbiakban az adatok részletes elemzését mutatom be.

5.1.2.1 Bacteria domén

A metagenom adatbázisokban a Bacteria domén több mint 1000 különböző képviselőjét azonosítottam. Az első lépés az anaerob bomlás során az összetett szerves anyagok hidrolízise (Lynd és mtsai. 2002, Drake és mtsai. 2002). A fermentációs szubsztrát legnagyobb szerves tömegét kitevő lignocellulózban gazdag növényi biomassza hidrolízisét számos mikroba képes elvégezni. A legtöbb ilyen baktérium a Clostridia és Bacilli osztályokba tartozik. Ennek megfelelően a legtöbb találat a vizsgált biogáz fermentorban a Clostridia (36%) és Bacilli (11%) osztályra esett, ezen osztályokon kívül a Bacteroidia (3%), Mollicutes (3%), Gammaproteobacteria (3%) és Actinobacteria (3%) osztályok tagjai voltak még nagyobb mennyiségben jelen (5. ábra).

A Clostridia osztályon belül a *Clostridium thermocellum* bizonyult a leggyakoribbnak (4. Táblázat). Ez a faj celluloszómába rendeződő extracelluláris cellulázai segítségével hatékonyan hidrolizálja a cellulózt (Zverlov és mtsai. 2005, Gold és mtsai. 2007). Kiemelkedő tagja ennek az osztálynak a *C. kluyveri* is, mely a Clostridiumok között egyedülálló módon képes etanolt és acetátot használni egyedüli energiaforrásként, és átalakítani ezeket butiráttá és hidrogénné (Seedorf és mtsai.2008). Jól jellemzett faj a *C. acetobutylicum*, melyről ismert cellulolitikus és hidrogéntermelő tulajdonsága is. Fermentálni képes szerves savakat, mint pl. az ecetsav és vajsav (acetogenezis), vagy alkoholokat: acetont, butanolt, vagy etanolt (szolventogenezis) (Jones és Woods 1986, Sabathé és mtsai. 2002). A *C. perfingens* cukrokból acetátot, butirátot, laktátot készít valamint [FeFe] hidrogenáza segítségével hidrogént termel (Kaji és mtsai. 1999). A *C. thermocellum*-hoz hasonlóan a *C cellulolyticum* is rendelkezik cellulolitikus tulajdonsággal, így hatékonyan bontja a cellulózt, melyből acetátot készít, emellett CO_2-t és H_2-t termel (Guedon és mtsai. 2002). A *C. saccharolyticum* ugyancsak cellulóz hidrolizáló, melyből acetátot, etanolt készít, valamint CO_2-t és H_2-t (Murray és mtsai. 1982). A *C. difficile* egyike a gyakori kórokozóknak, amelyet a biogáz közösségben találtunk (Larson és mtsai. 1978). A *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* egy H_2 termelő baktérium, mely a

Törzs	Osztály	Faj	Abundancia	Celluláz	H_2 termelés
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium thermocellum*	406	+	+
Firmicutes	Clostridia	*Alkaliphilus metalliredigens*	310	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Desulfitobacterium hafniense*	246	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Caldanaerobacter subterraneus*	237	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Pelotomaculum thermopropionicum*	227	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Finegoldia magna*	208	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Syntrophomonas wolfei*	203	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium difficile*	188	+	+
Firmicutes	Clostridia	*Moorella thermoacetica*	186	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium kluyveri*	176	n.a.	+
Firmicutes	Clostridia	*Carboxydothermus hydrogenoformans*	161	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Heliobacterium modesticaldum*	150	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Desulfotomaculum reducens*	139	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium cellulolyticum*	126	+	+
Firmicutes	Bacilli	*Enterococcus faecalis*	112	n.a.	+
Firmicutes	Bacilli	*Bacillus cereus*	102	+	+
Firmicutes	Bacilli	*Streptococcus suis*	93	+	-
Firmicutes	Clostridia	*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*	93	+	+
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium perfringens*	87	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*	86	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Ruminococcus albus*	83	+	+
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium saccharolyticum*	78	+	+
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium acetobutylicum*	63	+	+
Firmicutes	Bacilli	*Bacillus thuringiensis*	62	+	+
Firmicutes	Bacilli	*Streptococcus pneumoniae*	61	-	n.a.
Firmicutes	Bacilli	*Listeria monocytogenes*	61	n.a.	n.a.
Firmicutes	Bacilli	*Streptococcus agalactiae*	57	n.a.	-
Firmicutes	Bacilli	*Enterococcus faecium*	57	n.a.	+
Firmicutes	Clostridia	*Anaerotruncus colihominis*	55	n.a.	n.a.
Firmicutes	Clostridia	*Faecalibacterium prausnitzii*	54	-	+
Firmicutes	Clostridia	*Clostridium carboxidivorans*	49	-	+
Firmicutes	Bacilli	*Staphylococcus epidermidis*	44	+	+
Bacteroidetes	Bacteroidia	*Bacteroides capillosus*	73	+	+
Bacteroidetes	Bacteroidia	*Bacteroides thetaiotaomicron*	46	+	+
Bacteroidetes	Bacteroidia	*Parabacteroides distasonis*	46	-	+
Tenericutes	Mollicutes	*Acholeplasma laidlawii*	247	-	-
Proteabacteria	Gammaproteobacteria	*Escherichia coli*	23	-	+
Actinobacteria	Actinobacteria (oztály)	*Slackia heliotrinireducens*	70	-	+
Actinobacteria	Actinobacteria (osztály)	*Bifidobacterium longum*	46	-	-
Meghatározatlan (Bacteria domén)	Meghatározatlan (Bacteria domén)	*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*	889	-	+

4. táblázat: A 40 leggyakoribb faj a Bacteria doménen belül, illetve ezek cellulolitikus és hidrogéntermelő képessége. Az eredmények az M5nr adatbázis

alapján készültek. n.a.: nem találtam adatot a fehérje adatbázisban, vagy hipotetikus proteinként ismert.

C. thermocellum-al gyakran képez ko-kultúrát, melynek köszönhetően több hidrogént képes termelni, mint a tiszta kultúra (Shin és mtsai. 2004, Liu és mtsai. 2008). A *Ruminococcus albus* is hatékony cellulózbontó aktivitással bír, fő fermentációs terméke az etanol (Mutolik és mtsai. 2011). Az *Anaerotruncus colihominis* és a *Faecalibacterium prausnitzki* megtalálhatóak a bélflórában, mindkettő glükózból és acetátból szerves savakat állít elő (Lawson és mtsai. 2004, Duncan és mtsai. 2002). A *Desulfitobacterium hafniense* képes szulfidot termelni szulfitból, de nem tudja redukálni a szulfátot. Szén forrásként piruvátot és laktátot használ, valamint ismeretes erről a fajról, hogy Hup (hydrogen uptake) típusú [NiFe] hidrogenázzal rendelkezik (Nokaga és mtsai. 2006). A *Heliobacterium modesticalum* képes fototróf, illetve kemotróf módon is élni. Kemotróf módon acetátot fermentál CO_2 és H_2-re. Ez a faj [NiFe] és [FeFe] hidrogenázzal is rendelkezik (Tang és mtsai. 2010). Laktózból, glükózból, és cellobiózból a *Caldanaerobacter subterraneus* hidrogént és acetátot készít (Yokoyama és mtsai. 2007). A metanogén archeákkal ko-kultúrában élő *Syntrophomonas wolferi* előszeretettel hosszú láncú zsírsavakat fermentál (McInerney és mtsai. 1981). Az anaerob közösség fontos tagja a *Pelotomaculum thermopropionicum*, mely ugyancsak szintrófikus kapcsolatot tart fenn metanogénekkel. A szintróf mikrobák fontos szerepet játszanak a hatékony biogáz termelésben (Schink 1997). Figyelemre méltó tagjai a Clostridia osztálynak az *Alkaliphilus metalliredigens* és a *Desulfotomaculum reducens*, melyeket relatíve nagyobb mennyiségben találtunk a vizsgált kísérleti fermentorunkban. Ezek a fajok acetátot és laktátot használnak fel elektron forrásként a vas és kobalt anaerob respirációjához (Ye és mtsai. 2004). Jelenlétük az anaerob biogáz reaktorban nem triviális, de érdemes megemlíteni, mivel ezek a baktériumok is rendelkeznek [FeFe] hidrogenázzal (Junier és mtsai. 2010). A *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* egy hatékony cellulózbontó faj, mely hidrogén termelésére is képes. Állati ürülékkel és növényi biomasszával működő reaktor mikrobiális közösségéhez való hozzáadása jelentősen megnövelte a biogáz termelés sebességét (Bagi és mtsai. 2007). A *Finegoldia magna* egy szubsztrát-specifikus mikroba ugyanis csak fruktózt képes hasznosítani, melyből acetátot gyárt (Goto és mtsai. 2008). A Clostridiales rend tagjainak nagy arányából arra lehet következtetni, hogy nagyon fontos szerepet játszanak a komplex szubsztrát bontásában az anaerob fermentorban. A Clostridiaceae család képviselői általában cukrokat és szerves savakat fermentálnak (Demian és mtsai. 2005), azonban

más útvonalon is energiához tudnak jutni. Ilyen a Wood-Ljungdahl metabolikus útvonal, melyet reduktív acetil-CoA (acetil koenzim A) útvonalként is ismerünk. Ez a folyamat acetogén baktériumokban, illetve ennek reverz változata acetotróf archeákban is lejátszódik (Müller 2003). Az acetogén Clostridiák mellett a *Moorella thermoacetica* és *Carboxidothermus hydrogenoformans* fajok is képesek energiát előállítani a Wood-Ljungdahl útvonalon. Ebben a folyamatban a CO_2 redukálódik CO-á, majd ez konvertálódik acetil-CoA-vá, a reakció sorban a hidrogén elektron donorként játszik szerepet (Rother és mtsai. 2008). Az anaerob reaktorban az acetotróf archeák energia előállításra acetátot használnak fel, a folyamatban CH_4 és CO_2 keletkezik (Ragsdale és mtsai. 2008). A Clostridia fajok nagy része hidrogéntermelő aktivitással bír, így a cellulóz tartalmú fermentációban nem csak cellulolitikus, hanem hidrogéntermelő aktivitásuk miatt is fontosak lehetnek, ugyanis a hidrogén redukáló erőként szolgál a hidrogenotróf metanogének számára. A Clostridiák és a hidrogenotróf metanogének között egyensúlyt feltételezünk, melynek megléte fontos a hatékony biogáz termelődéshez. A *Ca. hydrogenoformans* képes CO-t használni egyedüli szén forrásként és elektron donorként, valamint vizet elektron akceptorként, hogy acetátot és hidrogént állítson elő (Wu és mtsai. 2005, Debarati és mtsai. 2010). A *Ca. hydrogenoformans* és a *M. thermoacetica* is hidrogént tud termelni (Pierche és mtsai. 2008).

A második legnépesebb csoport a Bacteria doménen belül a Bacilli osztály. A Bacilli osztályból a leggyakoribb fajnak az *Enterococcus faecalis* bizonyult, amely egy Gram pozitív baktérium és a normál bélflórában megtalálható, ahol poliszacharidokat hidrolizál (Xu és mtsai. 1998). Az *E. faecium* is egy gyakori faj a bélrendszerben, szénhidrátokat (fruktóz, maltóz, laktóz és galaktóz) használ fel acetát és etanol előállítására (Wei és mtsai. 1987, Guerra és mtsai. 2010). A *Bacillus cereus* és *B. thuringiensis* baktériumok fakultatív anaerobok. Anaerob körülmények között a *B. cereus* glükózból acetátot, laktátot és etanolt állít elő, míg a *B. thuringiensis* többnyire laktátot termel (Duport és mtsai. 2006, Ohara és Yakata 1996). A *Streptococcus pneumoniae* egy patogén, mely a glükózt laktáttá alakítja (Hoskins és mtsai. 2001). Rokona a *S. suis* glükózt, maltózt, laktózt és trehalózt alakít át különböző illékony szerves savakká (Klipper-Balz és Schliefer 1987), míg az *S. agalactiae* etanolt is készít az illékony szerves savak mellett (Glaser és mtsai. 2002). További Bacillus családba tartozó patogének a *Staphylococcus epidermis* és a *Listeria monocytogenes* (Ramick és mtsai. 1996), amelyek kis számban fordulnak elő a biogáz reaktor mikroba közösségében.

A Clostridia és Bacilli osztályokon kívül más csoportok is képviseltetik magukat. Relatív mennyiségüket tekintve jelentőségük valószínűleg kisebb, de nem elhanyagolható a biogáz termelő mikrobiális táplálék láncban. A Bacteroidia tagjai gyakoriak a természetben, ahol bomló szerves anyagok, növényi vagy más eredetű biomasszák találhatóak. A *Bacteroides capillosus* egy bélbaktérium, mely laktátot fermentál és hidrogént állít elő, továbbá cellulolitikus aktivitással is bír (Betian és mtsai. 1977). Kiemelkedő példája az ember-baktérium szimbiózisnak a *Bacteroides thetaiotamicron*, mely fontos és állandó alkotóeleme a bélflórának, cellulózt és keményítőt használ fel szén forrásként (Bjursel és mtsai. 2006). A *Parabacteroides distasionis* egy Gram-negatív baktérium, mely illékony szerves savakat termel (Sakamato és mtsai. 2006).

A Mollicutes osztály tagja az *Acoleplasma laidlawii*, mely glükózból telített zsírsavakat, laktátot és acetátot állít elő (Lazarev és mtsai. 2011). Ezeket a fermentációs termékeket biogázzá konvertálják az acetotróf archeák a metanogén közösségben. A Gammaproteobacteria osztályon belül a leggyakoribb és egyben legjobban tanulmányozott faj az *Escherichia coli*, mely rendkívűl sokoldalú anyagcserét folytat. Anaerob körülmények között fermentációs termékei a laktát, a szukcinát, etanol, acetát, CO_2, H_2 és kölönféle egyéb savak (Han és mtsai. 1992), ráadásul több hidrogenázzal is rendelkezik (Menon és mtsai. 1994). Az Actinobacteria tagjai gyakran megtalálhatóak a talajban és természetes vizekben. Némelyikük hatékonyan bontja a komplex szerves anyagokat, mint a cellulóz, ezért fontos szerepet játszik a szén ciklusban (Ventura és msai. 2007). Ennek a csoportnak néhány tagja a rendkívűl ellenálló lignin bontására is képes (Kirby és mtsai. 2006). Az Actinobacteria-k közül két faj volt számottevő mennyiségben jelen a biogáz fermentorban a *Slackia heliotrinireducens* és a *Bifidobacterium longum*. A *Sl. heliotrinireducens* Gram-pozitív baktérium, mely a nitrátot ammóniává redukálja elektron donor jelenlétében (hidrogén vagy formát). Erről az organizmusról azt is leírták, hogy acetátot és laktátot is képes termelni (Pukal és mtsai. 2009). A *Bf. longum* egy Gram-pozitív baktérium, mely a humán bélflórában is megtalálható (Schell és mtsai. 2002). Ez a faj oligoszacharidokat metabolizál és laktátot állít elő ezzel segítve a normál mikroflóra szabályozását.

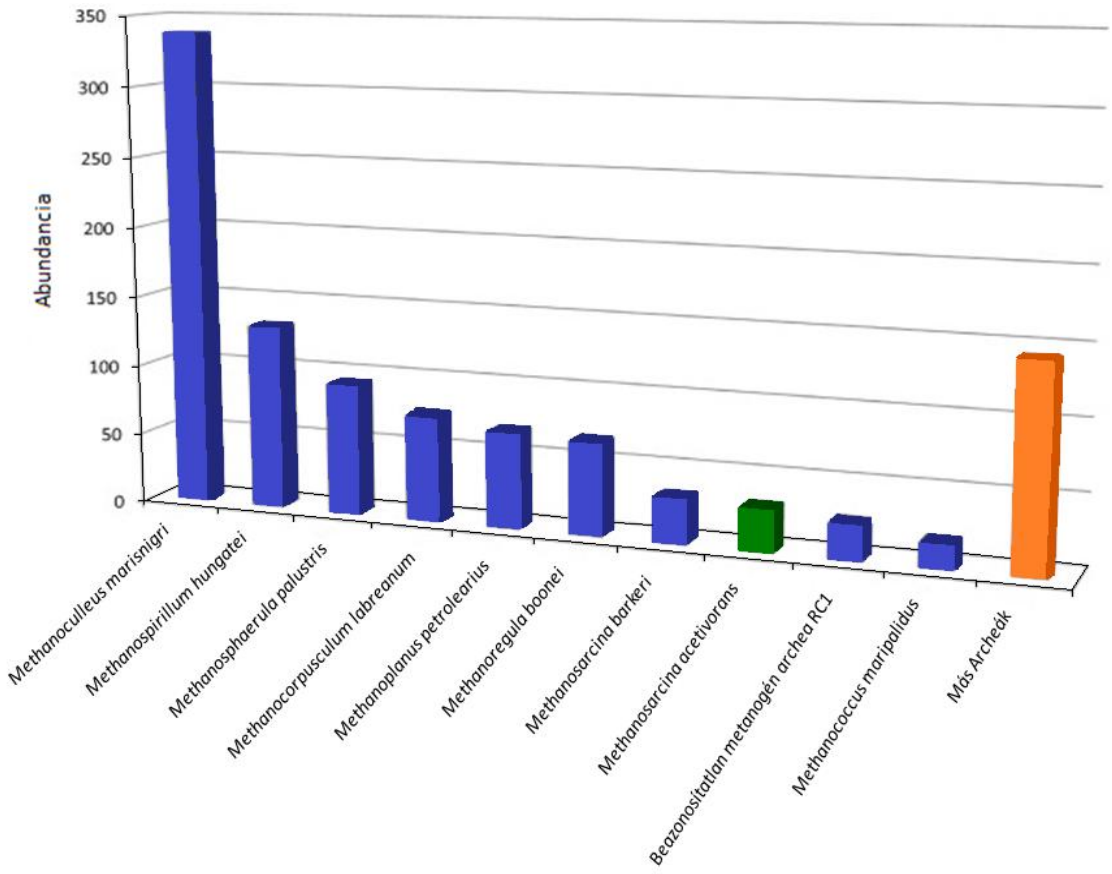
Az ismert filogenetikai kategóriákon kívül 7%-nyi olyan szekvenciát találtunk, melyet a Bacteria doménhez lehetett kötni, de részletesebb besorolása jelenleg még kérdéses. Ebbe a csoportba tartozik a *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*, mely törzset viszonylag nagy mennyiségben találtuk a vizsgált biogáz fermentorban és más

anaerob reaktorban is leírták már jelenlétét (Kröber és mtsai. 2009, Pelletier és mtsai. 2008). A *C. C. acidaminovorans* energiáját az Embden-Meyerhof útvonalon kereszül cukrokból nyeri, továbbá képes aminosavakat fermentálni, valamint [FeFe] hidrogenáza segítségével hidrogént termel, így ugyancsak fontos szerepe lehet a szintrófikus metabolizmusban (Chouari és mtsai. 2005).

5.1.2.2 Archaea domén

Az acetogén baktériumok illékony szerves savakat, CO_2-t, és H_2-t termelnek, melyek a metanogenezist végző különféle archeák számára tápanyagok (Deppenmeier és mtsai. 2008, Thauer és mtsai. 2008, Kovács és mtsai. 2014).

A vizsgált biogáz fermentorban az azonosított mikrobák közül számosságban mintegy 10%-ot tesznek ki az Archaea domén képviselői (5. és 6. ábra). Ez jól korrelál a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Krause és mtsai. 2008, Jeanicke és mtsai. 2011, Wirth és mtsai. 2012). Az Archaea domén közösségén belül a Methanomicrobiales rend dominál. Az említett renden belül a *Methanoculleus marisnigri* volt a leggyakoribb (Anderson és mtsai. 2009). Ezt az archeát több metanogén közösségben is megtalálták (Nettman és mtsai. 2010, Ziganshin és mtsai. 2011, Wirth és mtsai. 2012). A Methanoculleusok mellett a Methanomicrobiales rend további hidrogenotróf metanogénjei is képviseltették magukat, mint a *Methanospirillum hungatei* (Southam és mtsai. 1990), *Methanosphaerula palustris* (Cabillo-Quiroz és mtsai. 2009), *Methanoregula boonei* (Bräuer és mtsai. 2010), *Methanocorpusculum labreanum* (Zhao és mtsai. 1989), és a *Methanoplanus petrolearius* (Brambilla és mtsai. 2010). A Methanococci osztályból pedig a *Methanococcus maripalidus* volt nagyobb számban jelen, mely ugyancsak hidrogenotróf metanogén (Klessler és mtsai. 1998) (8. ábra). Az acetotróf metanogének között a *Methanosarcina acetivorans* (Galagan és mtsai. 2002) volt relatív többségben. A biogáz termelő közösségben egy ismeretlen archeát is találtunk, melyet korábban rizs rizoszférában írtak le. Leírták erről a törzsről, hogy aerotoleráns szén-dioxid és hidrogénfüggő életmódot folytat, valamint szulfát redukciójára is képes (Ercel és mtsai. 2006).

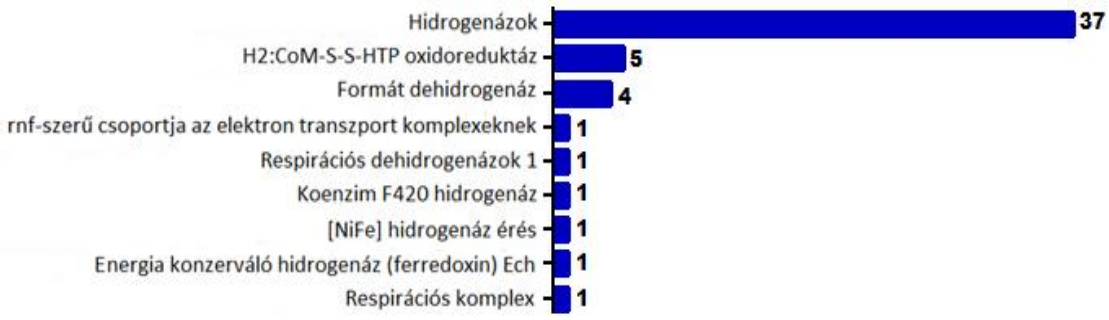


6. ábra: A 10 leggyakoribb archea a kísérleti biogáz fermentorban. A hidrogenotróf (kék), acetotróf (zöld) metanogének, és egyéb (narancssárga) archaea fajok relatív gyakoriságát tüntettük fel.

A hidrogenotróf metanogének túlsúlya arra enged következtetni, hogy a kísérleti fermentorunkban ez a fő metántermelő útvonal, és az acetotrófok a folyamatban csak másodlagos szerepet játszanak. Az acetát azonban szintén fontos közti termék a biogáz termelésben, mivel az acetát bizonyítottan serkenti a növekedést a *Methanospirillum hungatei* (Southam és mtsai. 1990), *Methanosphaerula palustris* (Cabillo-Quiroz és mtsai. 2009), *Methanoregula boonei* (Bräuer és mtsai. 2010), *Methanocorpusculum labreanum* (Zhao és mtsai. 1989), *Methanococcus maripalidus* (Klessler és mtsai. 1998), és a *Methanoplanus petrolearius* (Brambilla és mtsai. 2010) metanogéneknél. Ezzel szemben a *Methanoculleus marisnigri* csak CO_2-t képes felhasználni szénforrásként (Anderson és mtsai. 2009).

A hidrogenáz enzimekhez köthető DNS leolvasások relatíve nagy gyakoriságából arra lehet következtetni, hogy ezek az enzimek fontos szerepet játszanak a közösség életében (7. ábra). A hidrogenázok mellett más redox enzimeket is azonosítottam, melyek a hidrogén anyagcseréhez kapcsolódnak. Ilyen enzimek a Thauer és Ferry által

leírt koenzim M heterodiszulfid heptanil treonin foszfát (CoM-S-S-HTP) oxidoreduktáz, a formát dehidrogenáz és a koenzim F420 hidrogenáz. CoM-S-S-HTP oxidoreduktáz katalizálja a CoM-S-S-HTP átalakítását HS-HTP (7-merkaptoheptanil-L-treonin foszfát)-ra, amely egyedülálló kofaktor minden metanogénben (Thauer és mtsai. 1993).



7. ábra. A biogáz termelő közösség energia és hidrogén anyagcseréhez köthető enzimei. A számok a szűrt találatok számát jelzik. A beállítások: 4.14.3.2 fejezet.

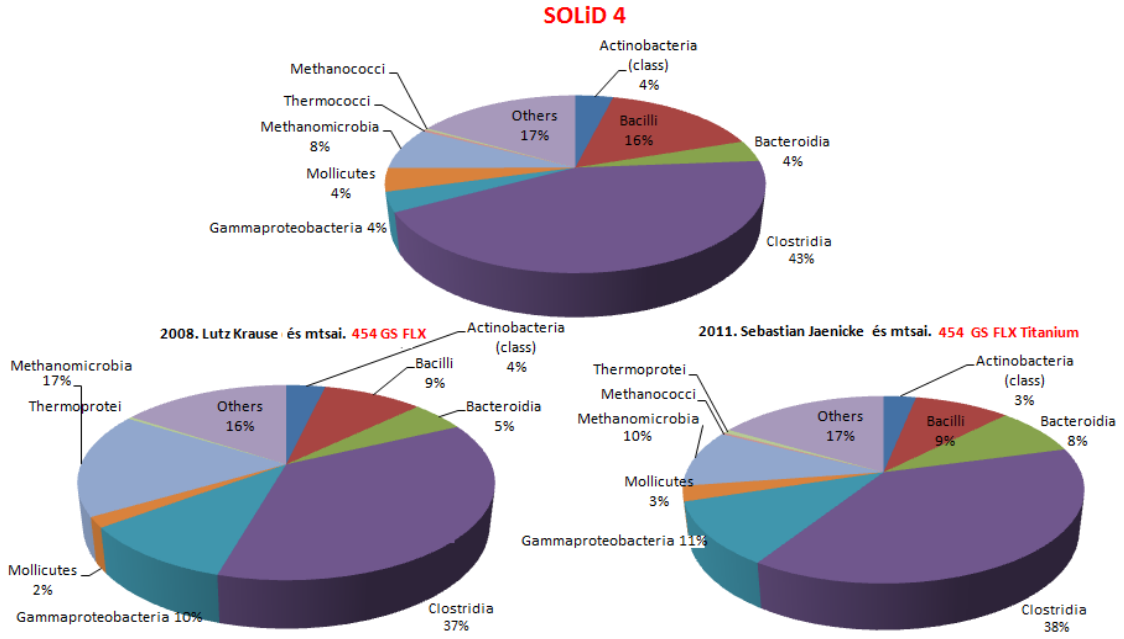
A formát dehidrogenáz hidrogént állít elő a formátból CO_2 felszabadulással (Ferry 1990). A redukált F420 a membrán kötött elektron transzport segítségével oxidálódik. Amikor az F420 oxidálódik a CoM-S-S-HTP redukálódik. A CoM-S-S-HTP oxidoreduktáz általános a metanogénekben de a formát dehidrogenáz csak a hidrogenotróf metanogénekre jellemző (Ferry és mtsai. 1997).

5.1.3 A SOLiD metagenom adatok összehasonlítása más eredményekkel

A korábbi tanulmányokban az újgenerációs szekvenátorok közül a 454 piroszekvenátor technikát használták a biogáz termelő közösségek mikrobiális összetételének tanulmányozására (Schlüter és mtsai. 2008, Krause és mtsai. 2008, Kröber és mtsai. 2009, Jeanicke és mtsai. 2011). A vizsgált üzemi méretű fermentorok mindegyike állati ürülékkel és zöld növényi biomasszával (kukorica és rozs silóval) működtek. Az általunk használt laboratóriumi fermentorban ugyancsak ezeket a szubsztrátokat használtuk hasonló összetételben. Ezért eredményeink összevethetőek a kisszámú irodalmi adattal.

A biogáz üzemet modellező kísérlet mikrobiális elemzésére használt SOLiD újgenerációs szekvenátor által kapott eredmények jó egyezést mutattak a korábbi, ugyancsak újgenerácós 454 piroszekvenátor segítségével nyert adatokkal (8. ábra). Minden esetben a Clostridia osztály képviselői voltak a leggyakoribb mikrobák a biogáz

fermentorokban. A Clostridia-k jelenléte a fentebb tárgyalt okok miatt elengedhetetlen a magas cellulóz tartalmú biomasszák bontásában (Jeanicke és mtsai. 2011). Az is ismert az osztály számos tagjáról, hogy hidrogenáz enzimekkel rendelkeznek. A Clostridia osztály abundanciája és a hidrogenázok nagy mennyiségű jelenléte a redox enzimek között a funkcionális vizsgálat során összefüggésben lehet egymással (5. és 7. ábra). Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a *Clostridium*-ok két fontos szerepet is betöltenek a biogáz termelő közösségben. Az egyik a poliszacharid szubsztrátok hidrolízise a másik a hidrogéntermelés, mely fontos a hidrogenotróf metanogének számára (Herbel és mtsai. 2010, Wirth és mtsai. 2012).



8. ábra: Az azonosított leggyakoribb osztályok eloszlásának összehasonlítása (Lutz Krause és Sebastian Jeanicke munkája ugyanabból a DNS mintából indult ki, a különbség a 454 szekvenátor típusa volt).

Nem csak a relatív mennyiségben, hanem az egyes fajok szintjén is egyezéseket találtunk a kétféle NGS szekvenálási technikával kapott adatok között. Ilyen baktériumok az előzőleg már említett magas cellulolitikus aktivitással bíró fajok, mint például a *Clostridium thermocellum*, *C. cellulolyticum* és a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus.* Az Archaea doménben is egyezéseket fedeztünk fel. A hidrogenotróf Methanomicrobiales rend bizonyult a legelterjedtebbnek, mint ahogy azt a korábbi 454-es vizsgálatok is kimutatták (Schlüter és mtsai. 2008, Krause és mtsai. 2008, Kröber és mtsai. 2009, Jeanicke és mtsai. 2011). Ezen belül a *Methanoculleus marisnigri* bizonyult dominánsnak, mely faj dominanciáját a már említett források mindegyike

alátámasztja. Érdekes módon szilárd fázisú anaerob fermentációban az acetotróf és hidrogenotróf metanogének egyaránt megtalálhatók voltak (Li és mtsi. 2013).

A metagenomikai vizsgálatokban általánosan az egyes rendszertani kategóriák képviselőinek relatív gyakoriságát tekintjük a biogáz képződésben játszott fontosságát mérő tulajdonságnak. Kétséget kizáróan azonban nincs bizonyítva, hogy a fiziológiás szerep és relatív számosság között feltételezett szoros összefüggés valóban minden esetben létezik. A kérdés eldöntéséhez nagy számban elvégzett funkcionális vizsgálatokra (metatranszkriptomika, metaproteomika) lesz szükség. Az egyetlen ismert metatranszkriptomikai tanulmány általában megerősíti, hogy a legnagyobb gyakoriságban jelen levő mikrobák transzkriptjei fordulnak elő leggyakrabban, de kiemeli, hogy az archaeák metabolikus aktivitása sokkal erőteljesebb, mint a közösségben mérhető relatív számosságuk (Zakrzewski és mtsai. 2012). Az előzetes metaproteomikai eredmények ugyan nagyon fragmentáltak és kevés következtetést engednek meg, de szintén arra utalnak, hogy a filogenetikai eloszlás és az aktív fehérjék alapján talált közösségi struktúra csak részlegesen hozható fedésbe. (Abram és mtsai. 2011).

Nem metagenom vizsgálatok közül a speciális *mcrA* alapú azonosítási módszerrel szarvasmarhatrágyával működő mezofil KVIC (statikus, nem kevert, „lebegő" gáztartályos, kisméretű, egyszerű berendezés, elsősorban Indiában használatos) típusú biogáz berendezésben ugyancsak a Methanomicrobiales rend képviselőit mutatták ki dominánsnak (Rastogi és mtsai. 2008). Egy sertéstrágyával működő 105m^3-es mezofil reaktorban szintén a hidrogenotróf metanogéneket találták nagyobb számban (Zhu és mtsai. 2011). A 16S rDNS vizsgálatok során Delbès és kutatócsoportja a Firmicutes és Bacteroides fajok képviselőit azonosították nagy mennyiségben 10 literes kísérleti mezofil anaerob reaktorukban, melyet működő biogáz üzemből származó oltóiszappal töltöttek meg, és szubsztrátként glükózt adagoltak. A metanogének között a hidrogenotróf Methanobacterium fajokat találták dominánsnak (Delbès és mtsai 2001). Szintén riboszómális RNS géneket vizsgálva 600m^3-es sertés trágyával működő mezofil reaktorban ugyancsak a hidrogenotrófok voltak többségben (Liu és mtsai. 2009). A FISH technikát használva batch típusú fermentációkban mezofil hőmérsékleten a metanogének között szintén a hidrogenotrófok voltak túlnyomó többségben (Banks és mtsai. 2012). A metanogének kimutatására alkalmas ANAEROCHIP rendszert alkalmazva egy kevert, de lignocellulózban gazdag szubsztrátokkal táplált termofil biogáz üzem mikroba elemzése során a hidrogenotrófok,

ezen belül a Methanoculleus nemzetség túlsúlyát találták (Franke-Whittle és mtsi. 2009).

A hidrogenotróf metanogenezis dominanciáját azonban nem minden vizsgálat támasztja alá. Raskin és munkatársai egy szennyvíz telep mezofil biogáz fermentorában kialakult metanogén közösség összetételét vizsgálták 16S rRNS gének segítségével. Eredményeik azt mutatták, hogy a metanogének között a mixotróf *Methanosarcina* nemzetség volt többségben. Laboratóriumi méretű reaktorban, amely szennyvíziszappal és szarvasmarhatrágyával működött megerősítették ezeket az eredményeket (Raskin és mtsai. 1995, Griffin és mtsai. 1998). FISH adatok az acetotróf életmódot folytató *Methanosaeta* nemzetséget mutatták jelentősnek a biogáz termelésben. Hasonló eredményre jutottak a metanogén közösség vizsgálata során egy szintetikus szubsztráttal táplált UASB típusú fermentor esetében, valamint egy üzemi méretű reaktorban, melyben állati trágyát és ételmaradékokat dolgoztak fel (Sekiguchi és mtsai. 1999, Karakashev és mtsai. 2006).

5.2 Mikroalga biomassza fermentáció

A mikroalga biomasszát közvetlenül és közvetve is felhasználhatjuk biogáz gyártására. A közvetett felhasználás során a mikroalgával megtermeltetjük, illetve abból kinyerjük a kívánt terméket (pl. biodízel, biohidrogén, élelmiszeriparban vagy gyógyszeriparban használható vegyületek), majd az alga biomassza maradékot hasznosítjuk biogáz termelésre (Brennan és mtsai. 2010). A mikroalga biomassza fermentációval kapcsolatos munkám három nagy kísérlet sorozatot foglalt magába. Az első esetben a közvetett felhasználást kívántuk modellezni. Ennek során egy nem steril mixotróf módon Tris-foszfát-acetáton (TAP) növesztett mikroalga keverék *(Scenedesmus sp*. és *Chlamydomonas sp*.) és szintróf baktériumok együttes biomasszáját használtuk fel biogáz alapanyagként. Tehát a keverék könnyen (*Chlamydomonas sp.*) és nehezebben (*Scenedesmus sp.*) fermentálható mikroalgákat tartalmazott (Mussgnug és mtsai. 2010). A kísérletben használt mikroalga keverék és szintrófjainak használata egy másik párhuzamos munkához kapcsolódik, mely során alga és baktérium keveréket használnak fel biohidrogén előállítására. (A hidrogéntermeléssel kapcsolatos vizsgálatok eredményeit Lakatos Gergely PhD

dolgozata foglalja össze). A mikroalgák mellett természetesen kialakuló baktérium flórát és előnyös hatásukat a mikroalga növekedésére már korábban is megfigyeltek (Keshtacher-Lubson és mtsai. 1995, Watanabe és mtsai. 2005, Nikolaev és mtsai. 2008, Amin és mtsai. 2009). A kapcsolódó munka lényege, hogy az elterjedt kénmegvonás segítségével indukált biohidrogén termeltetés mellett (Melis és mtsai. 2001, Zhang és mtsai. 2002, Fouchard és mtsai. 2005, Laurinavichene és mtsai. 2006, Tsygankov és mtsai. 2006) egy másfajta alternatívát nyújtson. Kollégáim arra a következtetésre jutottak, hogy a mikroalga és a mellette kialakuló szintróf mikroorganizmusok keveréke alkalmas fenntartható biohidrogén termelésre kénmegvonás nélkül is (Lakatos és mtsai. publikálás alatt).

A második kísérlet sorozat egy fotoautotóf módon BG11 tápoldatban, 2,5m^3 ipari fotofermentorban növesztett mikroalga (*Scenedesmus obliquus*) faj fermentációját vizsgálta. E kísérlet során a mikroalga szerves száraz anyagra vonatkoztatott adagolási mennyisége megegyezett a *Scenedesmus sp*. és *Chlamydomonas sp*. keverék adagolási mennyiségével. A használt *Sc. obliquus* biomassza csak kis mennyiségben tartalmazott szintrófikus baktériumokat.

A harmadik kísérlet sorozatban fotoautotróf módon tenyésztett mikroalga biomasszát különböző módon előkezeltem, illetve vizsgáltam annak hatását a biogáz termelődésre batch-típusú fermentációval a VDI alapján.

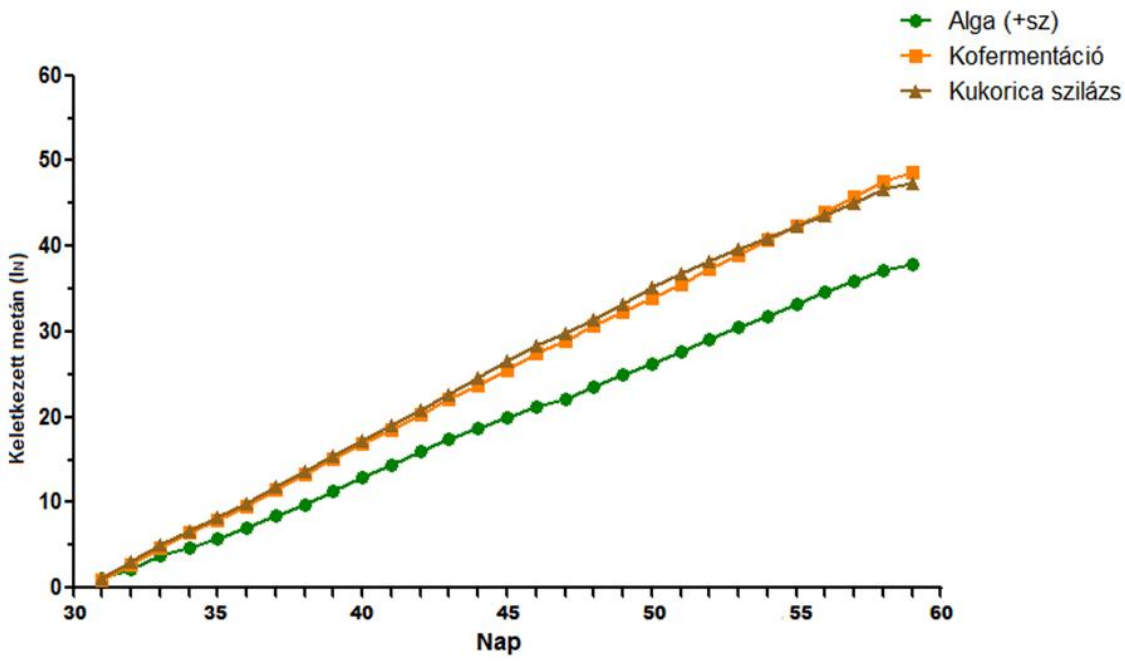
5.2.1 Mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja

A mikroalga keveréket 1g szerves száraz anyag/liter térterheléssel naponta adagoltam az 5 literes kísérleti fermentorba (4.1.1. fejezet), illetve ezzel párhuzamosan másik két reaktor egyikébe 0,5-0,5g szerves száraz anyag/liter térterheléssel kofermentációban kukorica szilázst és mikroalga keveréket, valamint a harmadikba csak kukorica szilázst adagoltam (1g szerves száraz anyag/l). A fermentáció két hónapig tartott, ebből az első hónap volt az ún. felfutási fázis, mely során a vizsgálni kívánt szubsztráttal fokozatosan töltöttem fel a reaktorokat és stabilizált biogáz termelést értem el. A második hónapban a kialakult mikroba közösség folyamatos biogáz termelő aktivitását kísértem figyelemmel. Célom ebben a kísérletben a mikroalgából keletkező biogáz minőségének, mennyiségének összevetése volt a kukorica szilázsból és a kofermentációból keletkezett biogázéval, továbbá a kísérlet teljes két hónapja alatt a

fermentációs paraméterek nyomon követése, a fermentáció stabilitásának vizsgálata, mely megerősítheti ennek az alternatív szubsztrátnak hasznosíthatóságát biogáz előállításra. A háromféle fermentációból össz-DNS mintákat készítettem. A fermentációnként négy időpontban vett DNS mintákat vetettem alá részletes metagenomikai vizsgálatnak. A kísérlet kezdetén, illetve egy, öt, és kilenc héttel a fermentációk indítását követően tanulmányoztam a mikroba közösség összetételét. A kiválasztott időpontok a fermentáció kezdeti, felfutási, legjobban termelő szakaszának és végpontjának felelnek meg. A mintákat Ion Torrent PGM típusú újgenerációs szekvenátorral szekvenáltuk. A viszonylag hosszú átlagos leolvasási hosszaknak (100-200bp) köszönhetően a nukleotid leolvasásokat kontig összeszerelés nélkül használhattam filogenetikai vizsgálatokra (4.14.3.2 fejezet).

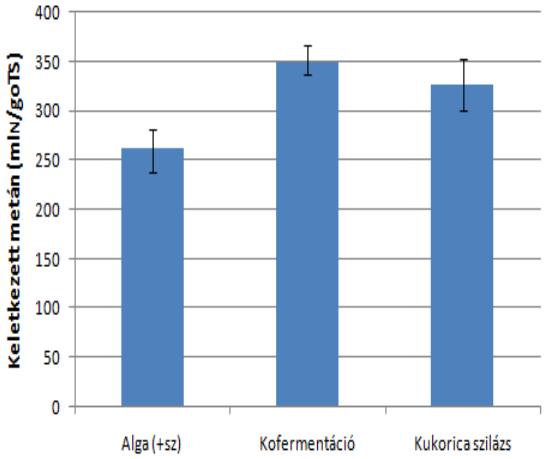
5.2.1.1 A keletkezett biogáz vizsgálata

A kísérletben használt szubsztrátokból keletkezett biogáz minőségének és mennyiségének rendszeres mérése az egy hónapos felfutási fázis után, a biogáz termelés stabilizálódását követően ad értékes információt. Az eredmények alapján elmondható, hogy a mikroalga és szintrófjainak fermentációjából keletkezett biogáz minősége jobb (58-61% CH_4 tartalom –irodalmi adatoknak megfelel–), azonban a termelt gáz mennyisége átlagban néhány százalékkal (4-6%) elmarad a különböző mikroalga fajokból mások által mért biogáz hozamoktól (Mussgnug és mtsai. 2010, De Schampelarie és mtsai. 2009), melynek oka a mikroalgával együtt bevitt mikroba mennyisége lehet. A kukorica szilázsból termelődött biogáz minősége (50-52% CH_4 tartalom) megfelel az irodalmi adatoknak (Amon és mtsai. 2010), illetve a kofermentáció az előző kettő között helyezkedik el a minőséget tekintve (54-57% CH_4 tartalom). A keletkezett biogáz mennyisége átlagosan a kukorica szilázs esetében 3,2 l/nap, kofermentációnál 3,15 l/nap és a mikroalga keveréknél 2,2 l/nap volt (összes keletkezett metán mennyiség: kofermentáció: 51,97 l, kukorica siló: 48,96 l, mikroalga-baktérium keverék: 39,27 l). Az adatokat a 9. ábrán tüntettem fel.



9. ábra. Különböző szubsztrátokból keletkezett kumulatív metán tartalom normál literben (Alga+sz: mikroalga keverék és szintrófjai)

A naponta adagolt szubsztrátokból keletkező metán tartalomat 1g szerves száraz anyagra vonatkoztatva a 10. ábrán tüntettem fel.



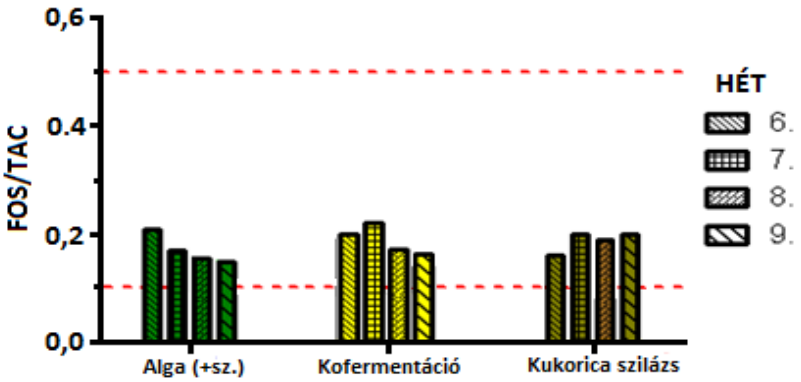
10. ábra. Különböző szubsztrátokból keletkezett metán tartalom 1g szerves száraz anyagra vonatkoztatva (Alga+sz: mikroalga keverék és szintrófjai).

A napi biometán hozam eredmények azt jelzik, hogy az alga keverék olyan jó biogáz szubsztrát, mint a költségesebb és tárolásra szoruló kukorica szilázs hiszen kofermentációban helyettesítette a kukorica szilázs felét. Önmagában kevésbé előnyösen használható, mivel ugyanannyi bevitt szerves anyagból a kukorica szilázshoz hasonlítva csak mintegy 75%-nyi metán keletkezett (ez a különbség feltehetően a mikroalga kezelésével csökkenthető). Az mindenesetre figyelemre méltó, hogy a

területegységen előállítható biomassza hozamokat is számításba véve (alga csaknem egész éven keresztül, folyamatosan tenyészthető és jóval magasabb biomassza hozamokat produkál, mint a silókukorica) a nem-steril algakeverék biogáz alapanyagként nagyon ígéretes biomassza forrás. Ez a kísérlet nem adott választ arra a kérdésre, hogy a vizsgált 30 napos időszak elegendő volt-e az alga biomassza teljes lebomlásához. Azt tudjuk irodalmi adatok alapján, hogy a kukorica szilázs biogázzá alakításához ez az idő elegendő, de lehetséges, hogy a keverékből a nehezebben lebontható *Scenedesmus* sejtfallal ennyi idő alatt nem tudnak hasonló eredményességgel megbirkózni a fermentor mikroba közösség tagjai.

5.2.1.2 Összes szerves sav és pufferkapacitás (FOS/TAC) meghatározása

A fermentáció stabilitásának nyomon követésére használt egyik fontos paraméter az összes szerves sav és pufferkapacitás, illetve ezek hányadosának (FOS/TAC) meghatározása (Nordmann és mtsai. 1977, McGhee és mtsai. 1968). Ha a FOS/TAC arány 0,1 alatt van, akkor a reaktor éhezik, biomassza bevitel szükséges. Azonban ha FOS/TAC érték 0,5 felett van akkor a rendszer túlterhelt. A folyamat során az összes szerves sav mennyisége 3 g/l (teoretikus felső határ, mely a metanogén közösség növekedését és aktivitását gátolja) alatt volt -átlagosan 1,5 g/l-, az összes szervetlen széntartalom (TAC) átlagosan 9-10 $gCaCO_3$/l volt. A hetente mért FOS/TAC arányokat a 11. ábra foglalja össze.

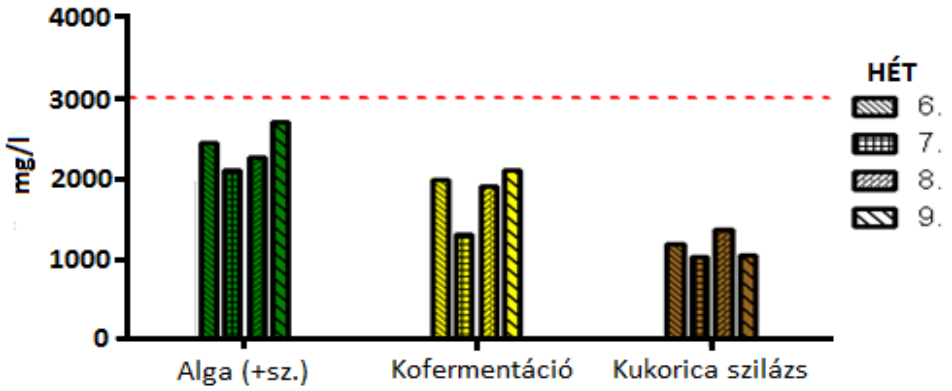


11. ábra. Hetente mért FOS/TAC arányok. A piros szaggatott vonalak az irodalmi adatok mutatta határértékeket jelölik (Alga+sz: mikroalga keverék és szintrófjai).

A fermentációk során a biomasszabevitel (1g/l) alacsonynak bizonyult, nem történt túladagolás. A FOS/TAC arányának közel állandó értéke az egyik megbízható mutatója a fermentációs folyamatok stabilitásának.

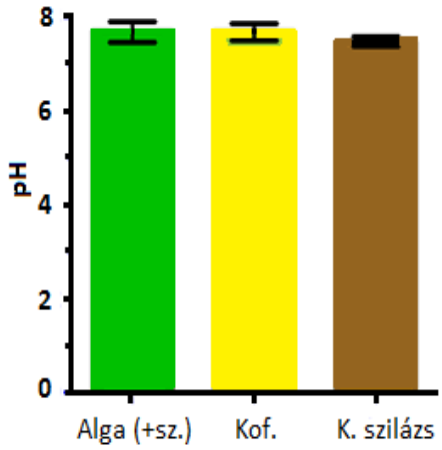
5.2.1.3 NH_4^+ tartalom változásának vizsgálata

A nitrogén tartalmú komponensek bomlásából ammónia keletkezik, ez a vizes közegben ammónium ion formában van jelen (Alexander 1985). Az ammónium tartalom 3000mg/l feletti értéke negatívan hathat a metanogén közösségre (Chen és mtsai. 2008, Nielsen és mtsai. 2008). A kísérlet során az ammónium tartalom a kukorica szilázs esetében közel azonos értékeket mutatott, míg a kofermentációnál az érték ingadozott 1000-2000mg/l között. A mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja során az ammónium tartalom növekedett, de a két hónapos fermentáció során 3000mg/l alatt maradt. Azonban a tendencia szerinti további emelkedése már negatívan hatna a fermentációra, így hosszú távon problémát okozhat (12. ábra).



12. ábra. Heti szintenmonitorozott ammónium tartalom. A piros szaggatott vonal az irodalmi adatok alapján ajánlott felső határt jelzi (Alga+sz: mikroalga keverék és szintrófjai).

A fermentáció során az összes szerves sav mennyiségéből a folyamat savasságát, az ammónium tartalomból pedig lúgosságát állapíthatjuk meg. Amennyiben a reaktorban a kétféle komponens közel azonos mennyiségben és egyszerre termelődik, akkor a fermentáció enyhén lúgos pH-ja, mely a metántermelő mikroba konzorcium számára megfelelő, fennmarad. A kísérlet során a pH értékek nem változtak számottevően (13. ábra).



13. ábra. Különböző fermentációk pH értékeinek változása a kísérlet során (Alga+sz: mikroalga keverék és szintrófjai).

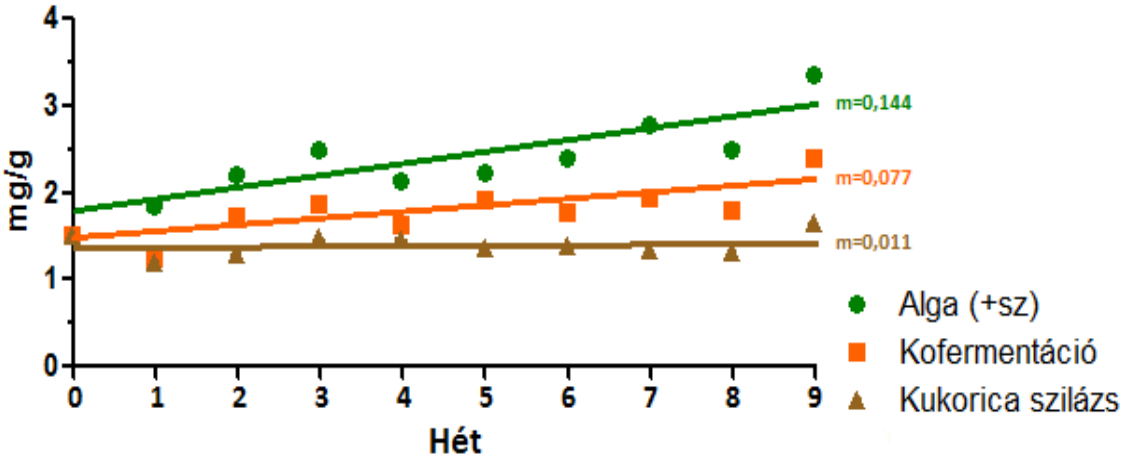
Az ammónium ion koncentráció az alga biomassza esetén emelkedést mutatott (14. ábra), a lúgosodás mértéke azonban nem volt jelentős, mely a rendszer magas pufferkapacitásával magyarázható (~10g$CaCO_3$/l).

5.2.1.4 C/N arány vizsgálat eredményei

Az anaerob bomlási folyamat során lényeges paraméter a szubsztrátok szén/nitrogén (C/N) aránya. A szakirodalomban ennek ideális értékét 20-30 között állapítják meg (Parkin és Owen 1986, Yadvika és mtsai. 2004). A fermentáció során ugyanis a reaktorban élő mikrobák 20-30-szor gyorsabban hasznosítják a szenet, mint a nitrogént (Yadvika és mtsai. 2004). Ha a szubsztrát C/N aránya alacsony, akkor fennáll a tápanyaghiány veszélye és alacsony pufferkapacitás esetén a bomlási folyamat sérülékennyé válik, mivel a magas nitrogén tartalmú komponensek fermentációjából szabad ammónia keletkezik, ami végső soron gátolhatja a metanogenezist. Ha a C/N arány túl magas, akkor pedig az illékony zsírsavak mennyisége növekszik meg, ami ugyancsak negatívan hathat a fermentációs folyamatra.

A kísérletben használt szubsztrátok C/N arányát a 4.11 fejezet táblázata foglalja össze. A fermentorokból minden héten vett mintákból C/N méréseket végeztem. A mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja során a N tartalom növekedését tapasztaltam a fermentációs folyadékban, amely összefüggésben van az ammónium tartalom növekedésével. A mikroalga keverék C/N aránya (5,3:1) alacsonynak bizonyult. Magas volt a szubsztrát N tartalma a fermentáció során, így a biomassza adagolásával és bomlásával párhuzamosan nőtt a fermentorban a N tartalom a C tartalommal szemben (14. ábra). Ennek valószínű magyarázata, hogy a fermentor

mikroba közössége a mikroalga (különösen a könnyen bomló *Chlamydomonas sp.*) C tartalmát rövid idő alatt felhasználta, ezzel szemben a N tartalmú vegyületek a mikroalga sejtből kikerülve lassabban bomlottak, melynek következménye az lett, hogy a fermentáció végére a szabad ammónia tartalom lassan növekedett a fermentációs folyadékban. A kofermentáció kisebb mértékű N felhalmozódást mutatott (5.2.1.3 fejezet), mely magyarázható a fele annyi mikroalga biomassza bevitellel, illetve a magasabb C/N aránnyal rendelkező kukorica szilázs (45,3:1) kompenzációs hatásával. A kukorica szilázs fermentációjánál a N mennyisége végig közel állandó maradt, a fermentáció kiegyensúlyozott volt.



14. ábra. A fermentációk N tartalmának alakulása az idő folyamán (Alga+sz: mikroalga keverék és szintrófjai).

Olsson és mtsai.-nak megfigyelése hasonló eredményeket mutatott. Kísérletükben szennyvíz iszappal kevertek össze egy tóból izolált mikroalga biomasszát. Vizsgálatuk alapján a mikroalga biomassza nagy mennyiségben történő adagolása a fermentációra negatív hatással járt termofil (55°C) és mezofil (37°C) körülmények között egyaránt. Ennek magyarázatát a mikroalga magas nitrogén tartalmával hozták összefüggésbe (Olsson és mtsai. 2013). Hasonló következtetésre jutott Yen és Brune is (2007). Ezért munkájukban a kofermentáció hasznosságát emelik ki, melyet mikroalga és hulladék papír együttes fermentációjában figyeltek meg. Két előnyt fogalmaztak meg. Az egyik a C/N arány egyensúlya. Ennek optimális értékét 20-25-ben állapították meg. A másik előny a celluláz aktivitás növekedése. Ez az előny kifejezetten a kofermentált papír jótékony hatásáról szól, ugyanis a papír (magasabb C/N aránya) miatt a megnövekedett celluláz aktivitás hatására a mikroalga biomassza is hatékonyabban bomlik, így az algában található értékes tápanyagok gyorsabban szabadulnak fel, ami végső soron növeli a biometán hozamot. Az általam végzett kísérlet eredménye megerősíteni látszik

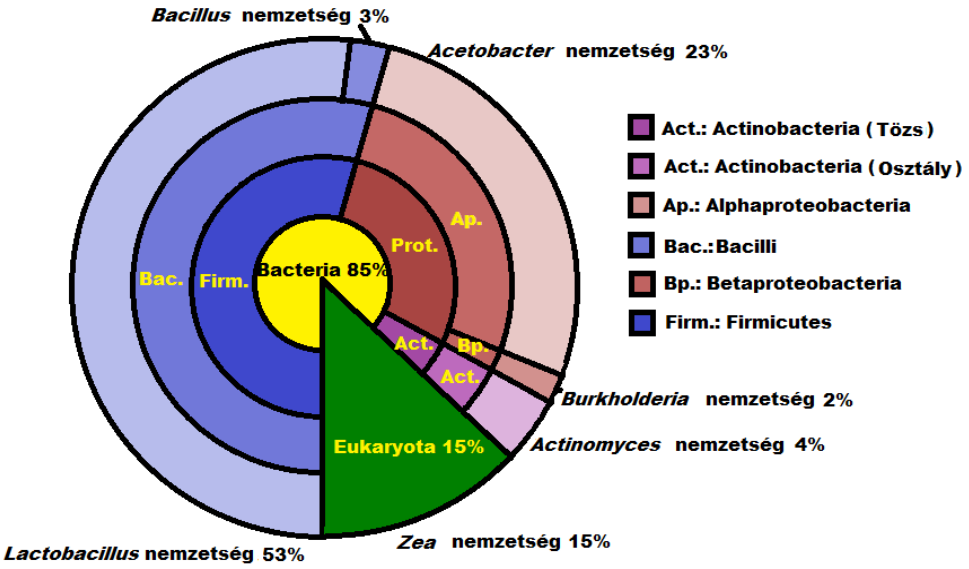
ezeket a megfigyeléseket, az alacsony C/N aránnyal rendelkező alga fermentációjánál előnyös a kofermentáció, ugyanis így a N kevésbé halmozódik fel, tehát a fermentációs folyamat tovább fenntartható, mint az alacsony C/N aránnyal rendelkező mikroalga monoszubsztrátként történő adagolásával. A keletkező biogáz mennyisége is magasabb kofermentáció esetén.

5.2.2 Metagenomikai vizsgálatok

A következőekben a mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációs kísérletéből vett minták metagenomikai vizsgálatának eredményeit mutatom be. A kísérlet során négy különböző időben (kiindulás, 1, 5, 9 héttel a fermentáció indítást követően) vizsgáltam a három féle fermentáció mikrobiális közösségének változását. Továbbá megvizsgáltuk a szubsztrátokon élő/együtt élő mikroba közösséget és azok arányát.

5.2.2.1 Kukorica szilázs mikrobiológiai összetétele

A közvetett felhasználást modellező mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációs kísérlete során az irodalomban egyedülálló módon megvizsgáltuk magának a beadagolt szubsztrátnak is a mikrobiális összetételét Ion Torrent PGM újgenerációs szekvenátor segítségével (15. ábra).



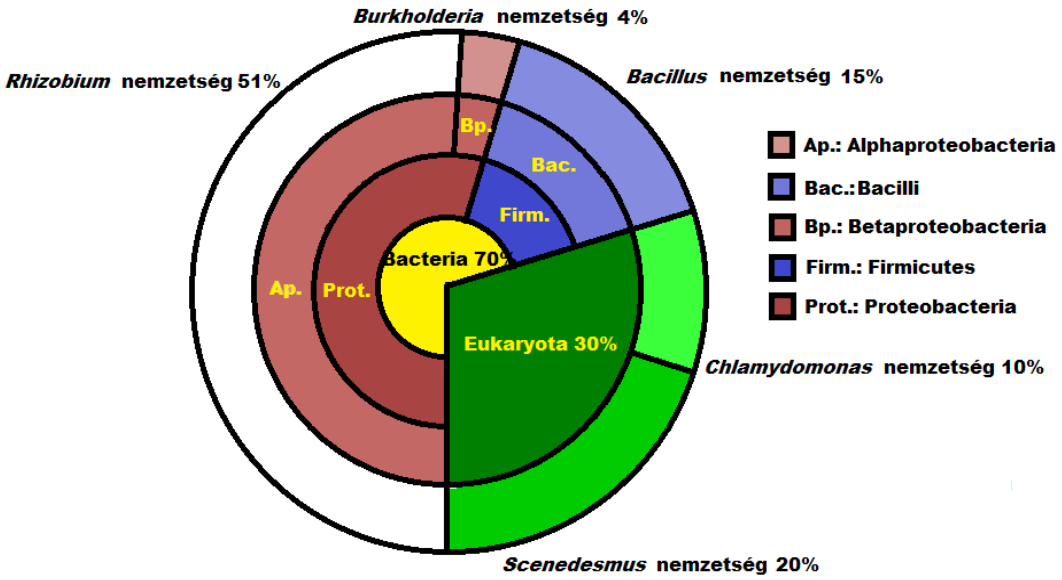
15. ábra. A kukorica szilázs mikrobiológiai összetétele. A koncentrikus körszelvényeken belülről kifelé haladva a közösség domén, törzs osztály és nemzetség szerinti bersorolását tüntettem fel.

A szilázs készítése során a zöld silókukorica növényt összeszecskázzák 1-5 cm nagyságú darabokra, tömörítik és lefedik. Az előfermentációs folyamat lényegében egy

tejsavas részleges fermentáció, mely legalább két hétig tart miközben a szénhidrátok egy része acetáttá és laktáttá fermentálódik és a biomassza az alacsony pH miatt stabilizálódik, sokáig tárolhatóvá válik (Pelhate 1977). Ennek megfelelően a kukorica szilázs mikrobiális elemzése során *Lactobacillus* és *Acetobacter* fajok képviselőit találtuk nagy számban. A bélflórában is előforduló *Lactobacillusok* a tejsav baktériumok csoportjába tartoznak, melyek megtalálhatóak bomló növényi anyagokon is. Ezek a mikrobák cukrokból tejsavat termelnek (Makarova és mtsai. 2006). Az *Acetobacter* nemzetség képviselői pedig az acetát termelésért felelnek (Yamada és Yukphan 2008).

5.2.2.2 Mikroalga és szintrófikus baktérium közösség mikrobiológiai összetétele

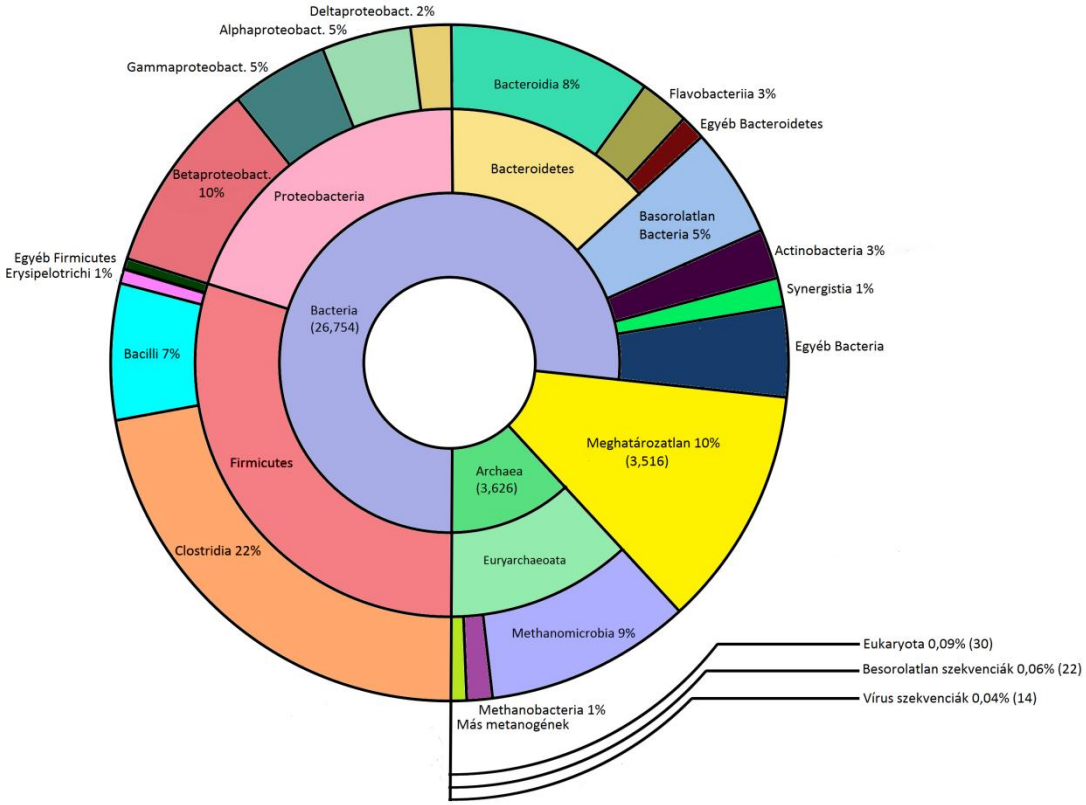
A kevert mikroalga kultúra mellett főként a *Rhizobium* nemzetségbe tartozó fajokat találtam a mikroalga és szintrófikus baktérium keverékben (15. ábra). Ezen fajok képviselői nitrogénfixáló baktériumok, melyek a talajban szimbiotikus kapcsolat kiépítésére képesek növényekkel (Sawada és mtsai. 2003). Korábban különféle mikrobiális kapcsolatokat már megfigyeltek mikroalga és baktériumok között (Keshtacher-Lubson és mtsai. 1995, Watanabe és mtsai. 2005, Nikolaev és mtsai. 2008, Amin és mtsai. 2009).



16. ábra. Kevert mikroalga kultúra és szintrófikus közössége. A koncentrikus körszelvényeken belülről kifelé haladva a közösség domén, törzs osztály és nemzetség szerinti bersorolását tüntettem fel.

5.2.2.3 A biogáz termelő mikroba közösség vizsgálata

A kiindulási időben vett mintában a biogáz üzem szimulációs kísérletéhez hasonló mikrobiális összetételt találtam, annak ellenére, hogy a vizsgált oltóiszap és a szekvenátor típusa sem egyezett (csak az oltóiszap származási helye). A beazonosított fajok listája alapján itt is a Bacteria és az Archaea domén képviselői vannak jelen nagy számban, hasonlóan a SOLiD újgenerációs szekvenátor nyújtotta adatokhoz (5. ábra). Ennek relatív eloszlását a 17. ábra foglalja össze.



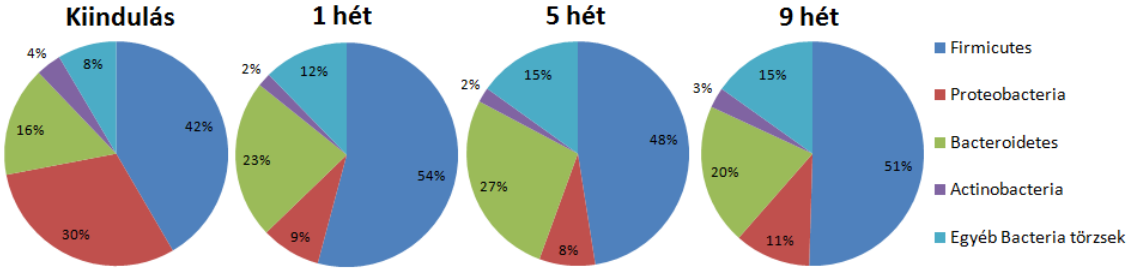
17. ábra. A kiindulási inokulum taxonómiai eloszlása. A koncentrikus körszelvényekben belülről kifelé haladva a közösség domén, törzs és osztály szerinti besorolásait tüntettem fel.

A relatív eloszlás alapján a Bacteria doménben a Firmicutes törzs a leggyakoribb. Ezen törzsön belül a Clostridia és Bacilli osztályok képviselői voltak a legnagyobb számban, melyek –mint ahogy a korábbiakban tárgyaltuk- a lignocellulóz tartalmú szubsztátok bontásában fontos szerepet játszanak. A Bacteroidetes törzs tagjai ugyancsak nagy számban képviseltetik magukat, mely mikrobák szintén jelentős szerepet játszanak a cellulóz tartalmú szubsztrát anaerob fermentációjában. Az Archaea doménben az azonosított nemzetségek nagy része a metanogenezis mindhárom útvonalát hasznosító

Methanosarcinales rendbe tartozik (Methanomicrobia osztály). A fermentor táplálékláncában a változásokra legérzékenyebb elem a metanogének csoportja, így az Archea doménen belüli dominancia változás hátterében a mások által már megfigyelt szezonális, illetve a fermentációs köztestermékek minőségének, mennyiségének változása állhat (Rastogi és mtsai. 2008, Lee és mtsai. 2009, Blume és mtsai. 2010). A SOLiD szekvenáláshoz hasonlóan számos szekvenciát egyetlen ismert mikrobához sem tudtam kötni. A továbbiakban a metagenom vizsgálatok eredményeit részletezem, ennek során a meghatározatlan és az eukarióta szekvenciáktól eltekintek és csak a beazonosított mikrobák relatív abundanciáján, egymáshoz viszonyított arányán alapul az eredmények értékelése a 4.14.3.2 és 4.14.3.3 fejezetekben leírtak alapján. Külön tárgyalom a Bacteria és az Archaea domént.

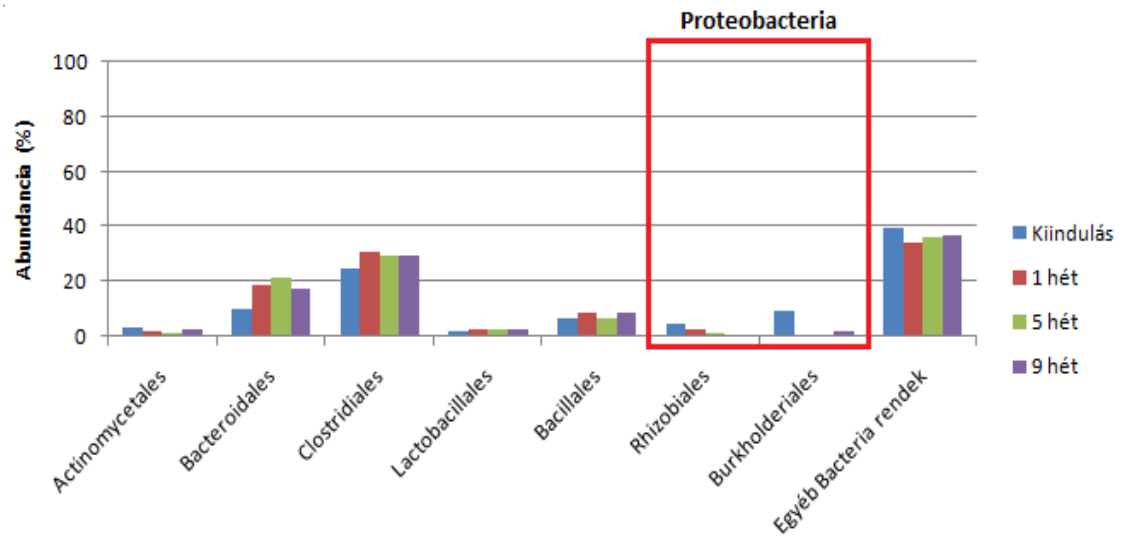
5.2.2.3.1 Kukorica szilázs fermentációjának mikrobiális közösség vizsgálata (Bacteria domén)

A kukorica szilázs fermentációja során a domináns törzsek a kiindulási állapottól a fermentáció végéig megmaradtak, relatív eloszlásukban csak kisebb változások történtek (18. ábra).



18. ábra. A kukorica szilázs fermentáció mikrobiális összetételének alakulása a Bacteria doménen belül törzs szinten.

A változások a Proteobacteria törzset érintik, ennek képviselőit – főként a Rhizobiales és Burkholderiales rendeket - kiszorítják a Firmicutes és a Bacteroides törzsek tagjai (19. ábra).

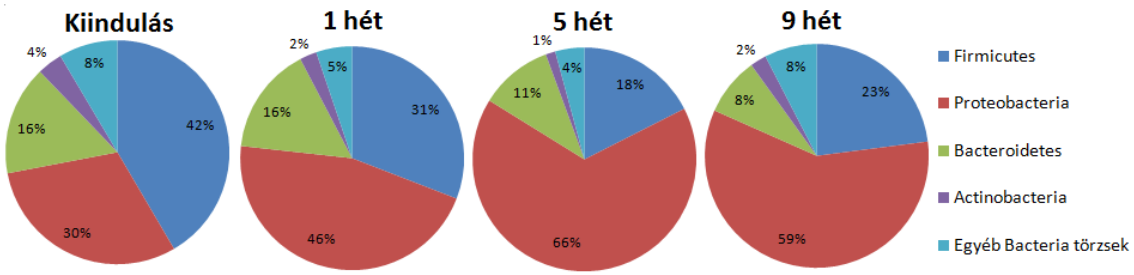


19. ábra. A Bacteria domén rendjeinek alakulása a kukorica szilázs fermentációjában.

A Firmicutes törzsben a *Clostridium* nemzetség van túlnyomó többségben jelen, amit a *Bacillus* követ, míg a Bacteroidetes törzsön belül a *Bacteroides* nemzetség képviselői a leggyakoribbak. A Bacteria doménben a mikrobiális közösség alakulása a fermentáció során nagyban hasonlít a kiindulási állapothoz, ami a SOLiD új generációs szekvenálási technikával kapott eredményekkel jó egyezést mutat.

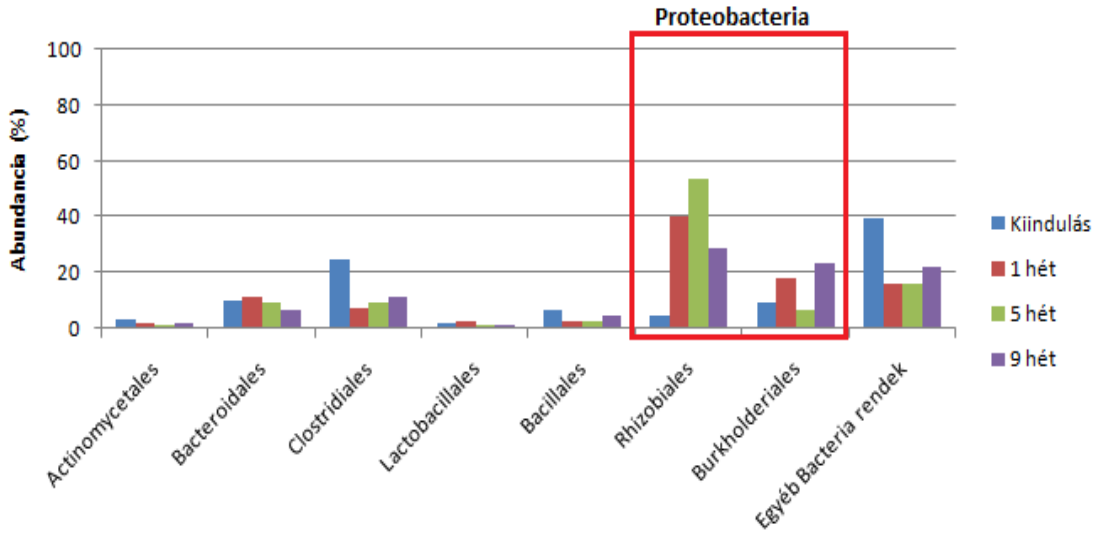
5.2.2.3.2 A kofermentáció mikrobiális közösségének vizsgálata (Bacteria domén)

A kofermentáció során tendenciózus változások történtek az előző fermentációhoz képest (20. ábra).



20. ábra. A Bacteria doménen belüli változások a kofermentáció mikrobiális közösségének törzs szintjén.

A kiindulási időben a fajgazdag Proteobacteria törzs tagjai felett átvették a mikroalga keverékkel bevitt ugyancsak Proteobacteria törzsbe tartozó *Rhizobium* és *Burkholderia* fajok a relatív többséget, majd a fermentáció idejének előrehaladtával perifériára szorították a többi domináns törzs képviselőit is (21. ábra).

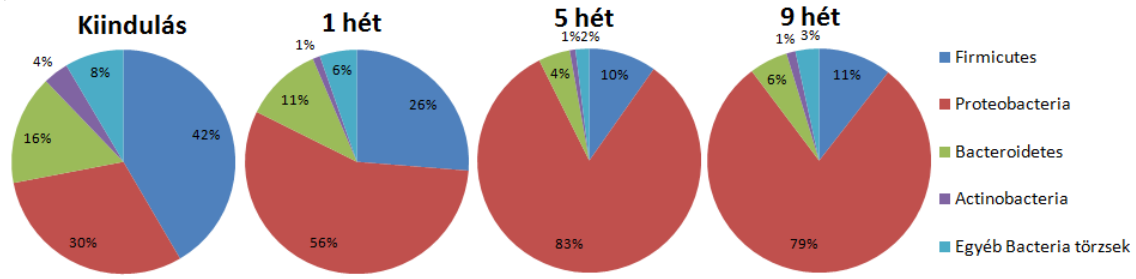


21. ábra. Bacteria doménen belüli változások rend szinten a kofermentáció során.

Az alga fermentációhoz viszonyítva (5.2.2.3.3 fejezet) kevésbé markáns átrendeződés hátterében a fele akkora mennyiségű mikroalga keverék adagolása, illetve a kukorica szilázs és mikroba közösségének kiegyenlítő hatása állhat.

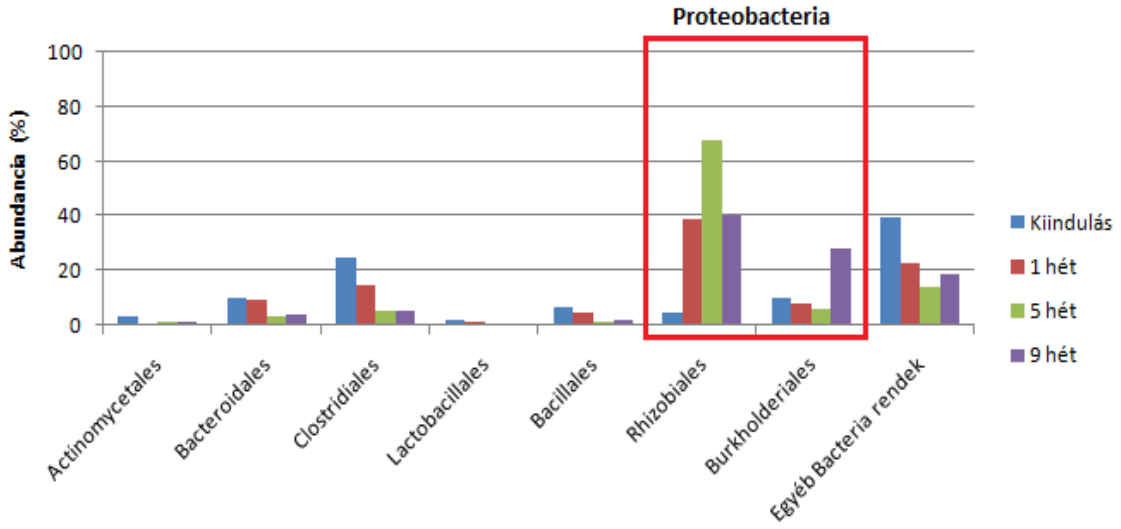
5.2.2.3.3 Mikroalga keverék fermentációjának mikrobiális változásai (Bacteria domén)

A mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja során a fermentor mikroba közösségének összetétele a Bacteria doménen belül jelentősen megváltozott a kiindulási állapothoz képest (22. ábra).



22. ábra. A mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja során bekövetkezett mikrobiális változások törzs szinten a Bacteria doménben.

A kiindulási időben a Proteobacteria törzs egy sok nemzetségből álló összetett közösség. A mikroalgával együtt bevitt *Rhizobium* és *Burkholderia* nemzetségek azonban, melyek szintén a Proteobacteria törzsbe tartoznak a fermentor mikrobiális közösségében hétről hétre átveszik a dominanciát kiszorítva a kiindulási időben együtt élő közösséget (23. ábra).

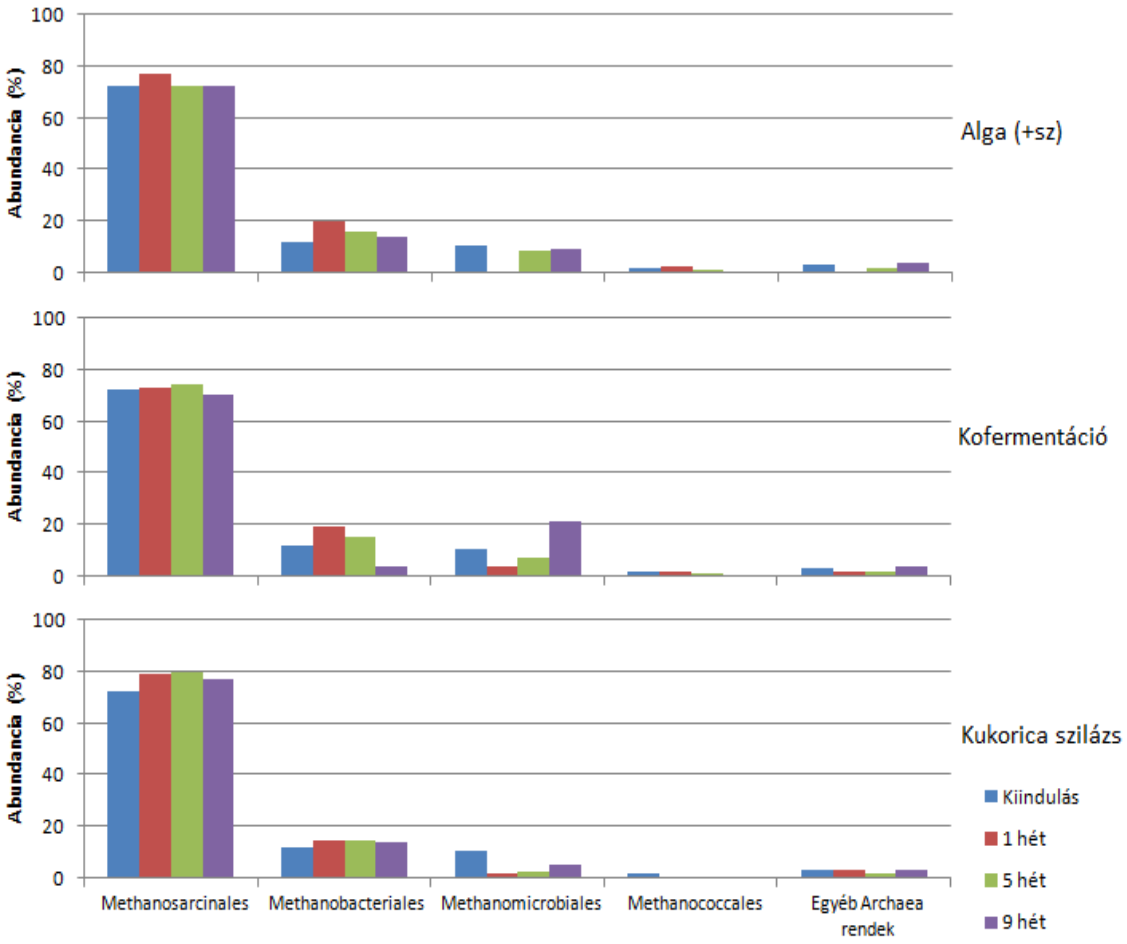


23. ábra. Bacteria doménen belüli rendek alakulása a mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja során.

A *Rhizobium*-okról irodalomból ismert, hogy szabadon élő formában is (nem csak növényekkel való szimbiózisuk során) képesek anaerob módon élni (Daniel és mtsai. 1980, Tjepkema és Evans 1975). A *Burkholderia*-k pedig talajvizekben és földben gyakran fellelhető fajok (Master és Mohn 1998). A napi szubsztrát adagolás miatt relatív számosságuk növekedése nem meglepő, azonban a fermentorban életképességük a DNS szekvenálással nem bizonyítható. A sejtek fermentorba kerülésével nő a relatív abundanciájuk, mely túlhaladja a fermentorban található természetes közösséget, így eltolva az arányokat.

5.2.2.3.4 A különféle fermentációk Archaea doménjének vizsgálata

A kiindulási állapotban az Archaea doménen belül a Methanomicrobia osztályban a Methanosarcinales rend a legelterjedtebb, melynek képviselői közül a mixotróf *Methanosarcina* nemzetség a leggyakoribb. Ez a nemzetség mindhárom fermentáció során végig megmaradt dominánsnak (24. ábra).



24. ábra. Az Archaea domén négy leggyakoribb rendje a három féle fermentáció során.

Korábban, szintén újgenerációs szekvenátor segítségével *mcrA* géneket vizsgálva ugyancsak a Methanosarcinales rendet találták dominánsnak szenyvíztisztítóból izolált ismeretlen alga keverék anaerob fermentációja során. Azonban vizsgálatukban a Methanosarcinales renden belül az acetotróf *Methanosaeta* nemzetséget találták legnagyobb mennyiségben (Ellis és mtsai. 2012). A *Methanosaeta*-k a négy leggyakoribb metanogén archaea csoport között az általam kapott eredményekben is megtalálhatóak, bár a *Methanosarcina*-k relatív mennyisége jóval magasabb. A különféle fermentációk során az Archaea doménben a *Methanosarcina* nemzetség dominanciája érdekes módon a metánképződéshez vezető anyagcsere útvonalak sokféleségét támasztják alá, az ebbe a nemzetségbe tartozó fajok mindhárom metanogén útvonalat képesek használni (Sirohi és mtsai. 2010).

5.2.3 Fotoautotróf módon növesztett *Scenedesmus obliquus* fermentációja

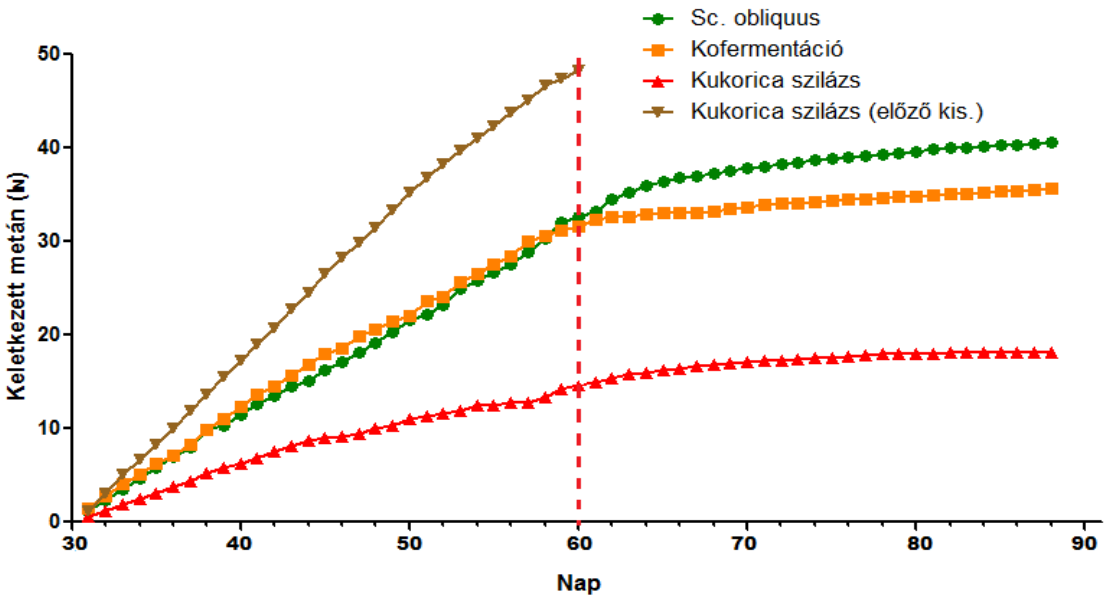
A kísérlet során használt *Scenedesmus obliquus* mikroalga biomasszát speciális, ipari léptékű fotofermentorban fotoautotróf módon BG11 tápoldatban tenyésztette az ELMAT kft. A mikroalga, kukorica szilázs és ezek keverékének adagolása megegyezett az előző kísérlet sorozatban használt adagolási mennyiségekkel (1 és 0,5-0,5g szerves száraz anyag/liter). A fermentációt 5 literes kísérleti fermentorokban végeztem (4.1.1. fejezet). A kísérlet három hónapig tartott, melyből az első hónap volt a felfutási fázis, a második hónap a mikroalga hatásának monitorozása, illetve a harmadik hónapban a szubsztrátok adagolása nélküli működést figyeltem a biometán termelés leállásáig. A cél ebben a kísérletben is a fermentáció stabilitásának és a keletkezett biogáz mennyiségének, minőségének vizsgálata, valamint a fermentációkban részvevő mikroba közösség monitorozása volt.

5.2.3.1 A keletkezett biogáz vizsgálata

A kísérletben keletkezett gáz mennyiségének és minőségének mérése az előző kísérlethez hasonlóan az egy hónapos felfutási fázis után történt, hogy szelektíven a mikroalga hatását követhessük nyomon. Ebben a kísérletben megvizsgáltuk a napi szubsztrát bevitel utáni időszakaszban is a metántermelést, melyet a 25. ábrán a piros szaggatott vonal utáni időskála mutat. Ennek célja az volt, hogy megvizsgáljuk, maradt-e még emészthető, de a betáplálás ideje alatt fel nem dolgozott biomassza a rendszerben, tehát hosszabb tartózkodási idővel növelhető-e a biogáz és biometán kihozatal.

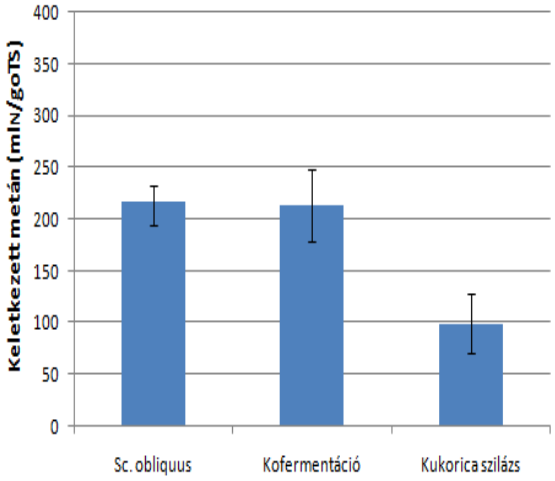
A keletkező gázban a legmagasabb metán tartalmat a *Sc. obliquus* fermentációja során figyeltem meg (55-62% CH_4 tartalom). A mikroalga fajokból keletkező magasabb metán tartalom összefügghet azzal, hogy a fermentor mikrobái számára olyan értékes tápanyagok lehetnek a biomasszájukban, amik a kukorica szilázsban nincsenek meg. A maximális érték jól egyezik a korábban más laboratóriumokban batch fermentációban tapasztalt értékekkel (62%, Mussgnug és mtsai. 2010), bár az átlagos CH_4 tartalom az 5 literes fermentorban kicsit alacsonyabb volt. Az előző kísérletsorozatban használttól eltérő forrásból származó kukorica szilázsból keletkezett metán minősége gyengébb volt (45-53% CH_4 tartalom), míg a kofermentációé a kettő között helyezkedett el (51-56% CH_4 tartalom). A keletkezett gáz mennyiségét tekintve átlagosan a kofermentáció során figyeltem meg a legmagasabb értéket a szubsztrát adagolásának ideje alatt: 1,99 l/nap, a

mikroalgából 1,86 l/nap, míg a kukorica szilázsból csupán 1 liter biogáz termelődött naponta (összes keletkezett metán tartalom: kofermentáció: 31,64 l, kukorica siló: 14,7, mikroalga: 32,64 l).



25. ábra. Keletkezett kumulatív metán mennyisége normál literben. A függőleges szaggatott piros vonal előtt naponta azonos mennyiségű szubsztrátot vittünk be a reaktorokba. A barna egyenes az előző kísérlet kukorica szilázsából keletkezett metán tartalmat mutatja.

A szubsztrát adagolásának időszakában a naponta beadagolt szubsztrátokból keletkezett metán mennyiségét 1g szerves száraz anyagra vonatkoztatva a 26. ábrán tüntettem fel.



26. ábra. Különböző szubsztrátokból keletkezett metán tartalom 1g szerves száraz anyagra vonatkoztatva (Alga+sz: mikroalga keverék és szintrófjai).

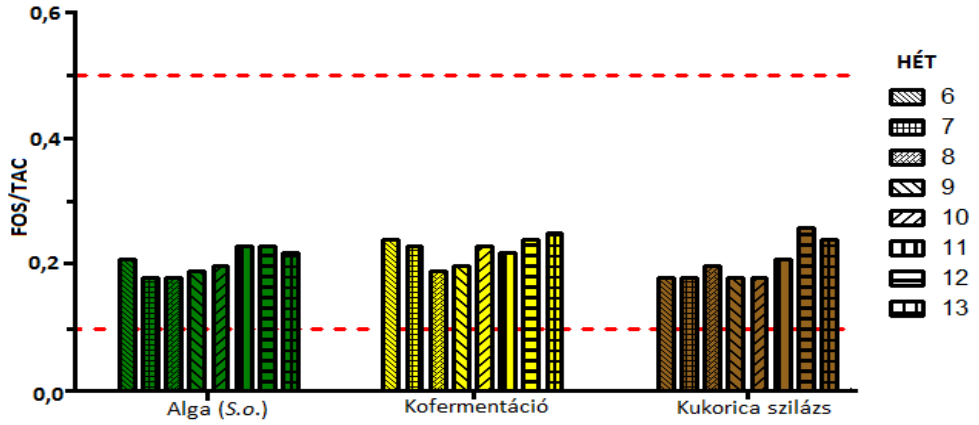
A keletkezett biometán mennyiségét tekintve a szubsztrát beviteli időszakban a kofermentáció bizonyult a legjobbnak, ettől csak kis mértékben tért el a mikroalga

fermentáció. A *Sc. obliquus*-ból keletkező CH_4 mennyisége 17%-al elmarad az előző kísérletben használt mikroalga-baktérium keverékétől, ami magyarázható a keverékben található és a fermentor mikrobái számára könnyebben emészthető *C. reinhardtii* tartalommal, illetve az eltérő tulajdonságokkal rendelkező kiindulási inokulummal. A kukorica szilázsból keletkezett metán mennyisége az előző kontrolloktól azonban jelentősen elmaradt, ami azt mutatja, hogy ugyanazon alapanyag esetén, elvileg ugyanolyan tárolási körülmények között nagyon eltérő biogáz potenciállal rendelkező kukorica szilázst is elő lehet állítani. Bár ebben a kísérletben a kukorica szilázs és a fermentorokba adagolt oltóiszap egyaránt más rendszerből származott, feltüntettem az előző kísérletben használt normál értékeket mutató kukorica szilázs eredményét is. Figyelemre méltó, hogy a kofermentációs kísérletben a mikroalga biomassza nagyrészt kompenzálni tudta a kukorica szilázs gyenge biogáz hozamát.

A biomassza napi beadagolása utáni időszakban a mikroalga biomasszából származó biogáz termelés meghaladja a kofermentációt. Az *Sc. obliquus* biomasszájából további 7,5 l biometán keletkezett, míg a kofermentációból 3,3 l és a kukorica szilázsból 3,9 l. Ennek lehetséges oka a mikroalga biomassza emésztésének hosszabb retenciós ideje a *Sc. obliquus* vastag sejtfala miatt (Mussgnug és mtsai. 2010), illetve a kukorica szilázs gyenge minősége. Ismét fel kell hívni a figyelmet a kukorica szilázs és a mikroalga biomassza előállítási költségének és egyéb előnyei közötti jelentős különbségére ezeknek az eredményeknek a megfelelő értékelése érdekében.

5.2.3.2 Összes szerves sav és pufferkapacitás (FOS/TAC) meghatározása

A fermentáció stabilitásának nyomon követése a három hónapos kísérlet sorozat alatt hetente történt. A fermentáció tizenegyedik hetéig az összes szerves sav mennyisége 3 g/l alattmaradt (~ a biomasszák adagolásának megszüntetése után 5-6 héttel), majd kis mértékben növekedett elérve az említett értéket. A biomassza adagolásáig az összes szerves sav átlagosan 2,5g/l volt, majd növekedett és 11-13. héten 3,1g/l értéket érte el. Az összes szervetlen szén tartalom az előző fermentációhoz képest magasabb volt, értéke 11-13g $CaCO_3$/l-ig mozgott. Az hetente mért FOS/TAC arányokat a 27. ábra foglalja össze.

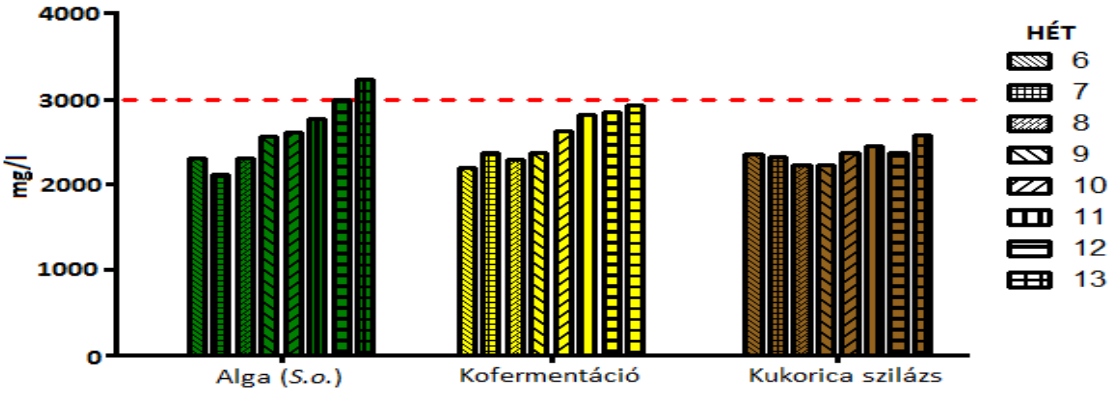


27. ábra. A hetente mért FOS/TAC arányok.

A fermentációk során a biomasszabevitel (1g oTS/l) alacsonynak bizonyult, nem történt túladagolás.

5.2.3.3 NH_4^+ tartalom változásának vizsgálata

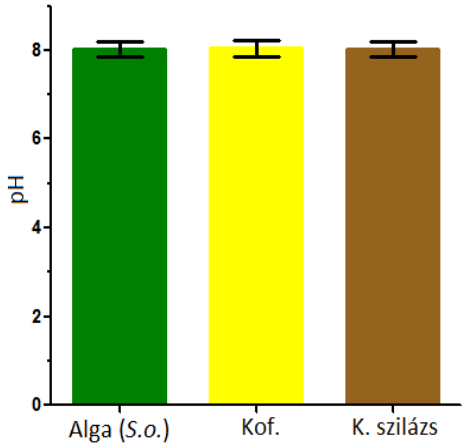
A kukorica szilázs mintában az ammónium mennyisége a kísérlet ideja alatt 3000mg/l alatt maradt. Az előző kísérletben a mikroalga keverék fermentációjának végére az ammónium tartalom megközelítette a határértéket. Ebben a kísérletben is hasonló jelenséget figyeltem meg, itt a harmadik hónap végén már túl is lépte az ajánlott határértéket, bár már az oltóiszap ammónium tartalma is magas volt, így a növekedés mértéke a mikroalga fermentációnál nem jelentős. A kofermentáció esetében pedig az ammónium tartalom a monoszubsztrátként adagolt kukorica szilázs és mikroalga között helyezkedett el, továbbá itt is a fermentáció végén növekedést tapasztaltam (28. ábra).



28. ábra. A hetente monitorozott ammónium tartalom.

Ebben a kísérletben a pH értékek együtt mozogtak, nem történt egyik irányban sem kilengés. A fermentáció végén tapasztaltam kisebb lúgosodást (pH= 8,37 a mikrolaga

fermentációjánál), de egészében ez sem jelenős változás, mely az előző kísérlethez hasonlóan a magas pufferkapacitással függhet össze (11-13g/$CaCO_3$) (29. ábra).

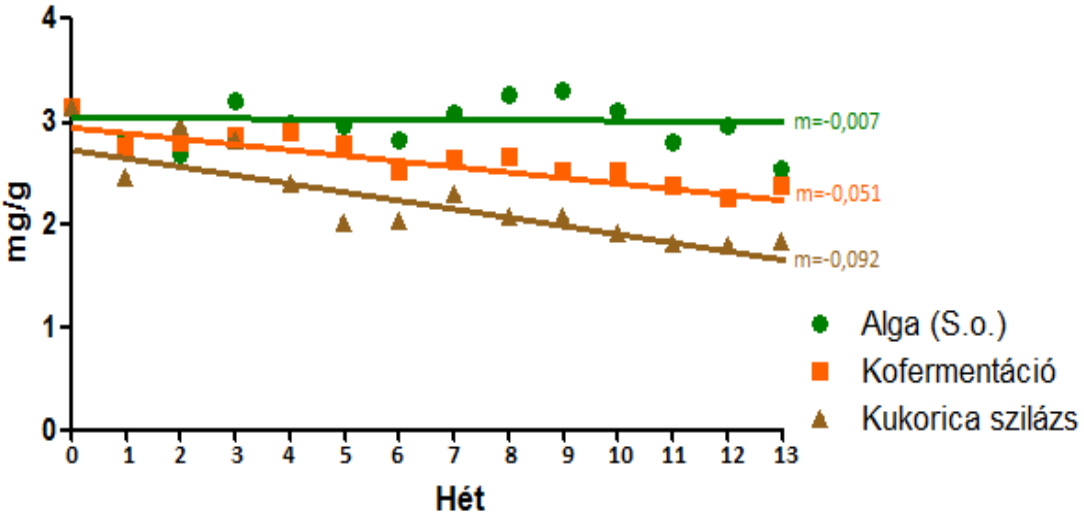


29. ábra. A különböző fermentációk pH értékei.

5.2.3.4 C/N arány vizsgálat eredményei

A fotoautotróf módon tenyésztett *Sc. obliquus* C/N aránya magasabb volt (8,9), mint az előző kísérletben használt mikroalga keveréké (5,3). A fermentáció során a C/N arányok növekedését tapasztaltam. Mindegyik fermentáció során a széntartalom növekedett, mely összefüggésben van a keletkezett biogáz mennyiségével. A szubsztrátok lassú bomlása miatt több szén került a rendszerbe, mint amennyi egységnyi idő alatt képes volt metánná alakulni. A kukorica szilázs esetében figyeltem meg a legnagyobb szén mennyiség növekedést, ahol a biogáz mennyisége is alacsonyabb volt.

A C/N arány növekedése összefüggésben lehet a nitrogén tartalom csökkenésével, a széntartalommal szemben (30. ábra), mely alól - az előző kísérlettel ellentétben - a mikroalga fermentációja kivétel. A *Sc. obliquus* fermentációja során annak vastag sejtfala miatt lassabban bomlott, mint az előző kísérletben használt mikroalga keverék, így a sejtekből a N tartalmú anyagok lassabban szabadultak fel. Ez magyarázhatja, hogy a mikroalga fermentáció során nem nőtt jelentősen az ammónium tartalom, mert fermentációja nagyrészt egyensúlyban volt.



30. ábra. Nitrogén tartalom alakulása a különböző fermentációkban az idő folyamán.

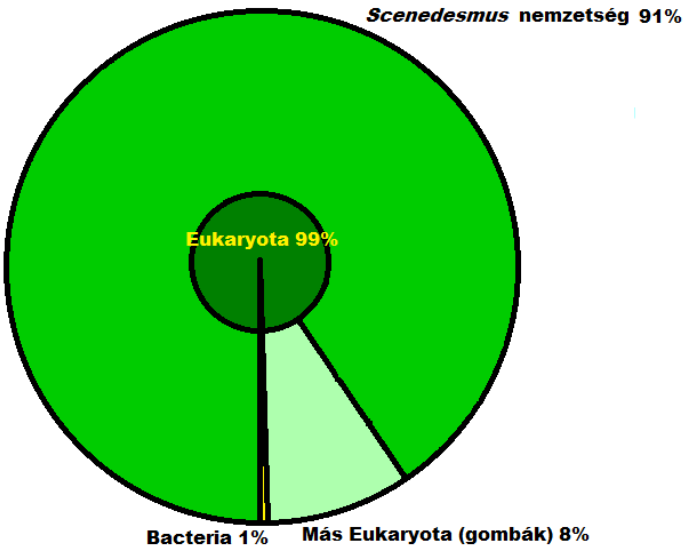
Azokban a fermentációkban, melyekbe kukorica szilázst adagoltam a széntartalom jelentősebb mértékű növekedését tapasztaltam, illetve a N tartalom csökkenését, ami a szubsztrát nem megfelelő bomlásával állhat kapcsolatban.

5.2.4 Metagenomikai vizsgálatok

A mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációjához hasonlóen ebben a kísérletben is megvizsgáltuk a fermentorok mikroba közösségének felépítését. A kísérlet során öt különböző időpontban vettük mintákat (kiindulás, 1, 5, 9, 13 hét), melyek a fermentáció kezdeti, felfutási, legjobban termelő szakaszának, valamint a szubsztrátok adagolása utolsó hetének, illetve a szubsztrátok adagolása nélküli végpontjának felelnek meg. A fermentorból származó mintákat Ion Torrent PGM típusú újgenerációs szekvenátorral szekvenáltuk, a nukleotid leolvasásokat kontig összeszerelés nélkül használtam filogenetikus vizsgálatokra (4.14.3.2 fejezet).

5.2.4.1 Fotoautotróf módon nevelt *Sc. obliquus* kultúra metagenomikai vizsgálata.

A fotoautotróf módon tenyésztett *Scenedesmus obliquus* kultúra összetételét ebben a kísérletben is megvizsgáltam, melynek eredményét a 31. ábra foglalja össze.

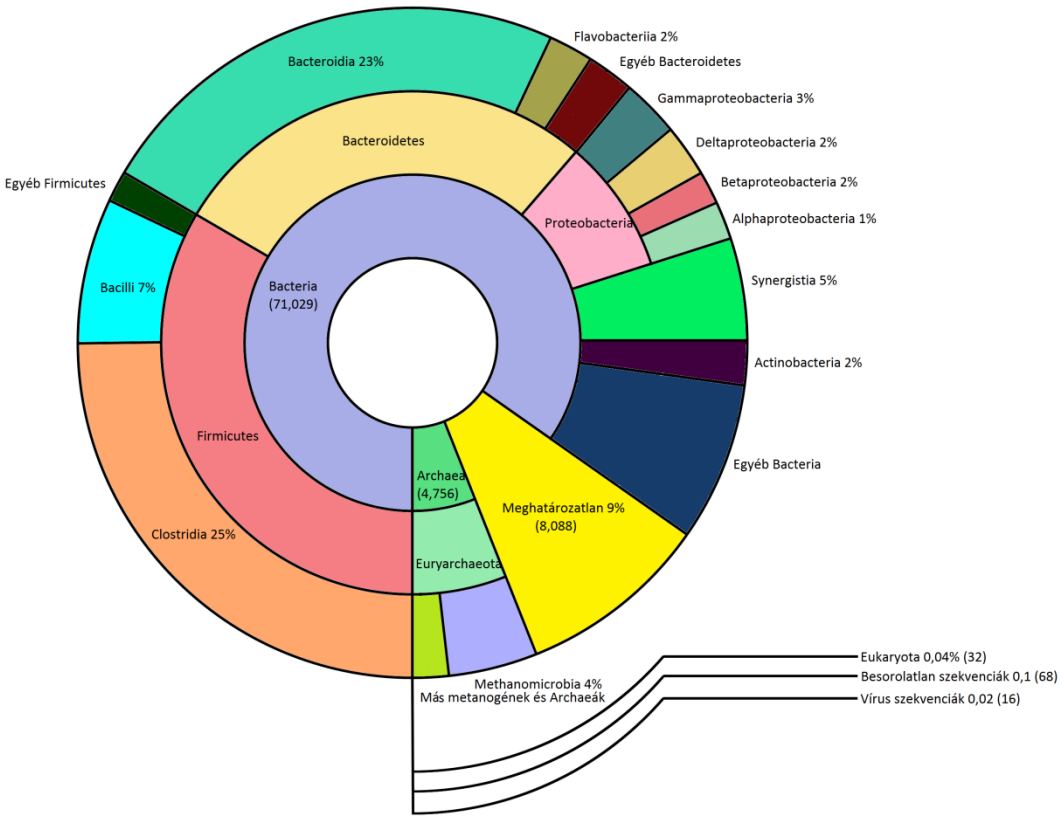


31. ábra. Fotoautotróf módon tenyésztett mikroalga összetétele.

A fotofermentorban tenyésztett alga mellett csak kis mennyiségben találhatunk baktériumokat, illetve gombákat, a kultúra 91% tisztaságban tartalmazott *Sc. obliquus* mikroalgát. Ebben a kísérletsorozatban a kukorica szilázs mikrobiológiáját nem tudtuk meghatározni, ugyanis arról megfelelő mennyiségű és minőségű össz DNS-t nem sikerült izolálni. Feltételezzük, hogy a kukorica siló gyenge gázkihozatali eredménye és mikroba közösségének hiánya mögött a nem megfelelő silózási eljárás állhat.

5.2.4.2 A biogáz termelő mikroba közösség vizsgálata

A kiindulási időben a biogáz üzem szimulációs kísérlethez és a mikroalga keverék és szintrófjainak fermetációjának kezdetén megfigyelt mikrobiális közösséghez hasonló összetételt találtam. A Bacteria és Archaea domén képviselői vannak jelen nagy számban. Ennek relatív eloszlását a 32. ábra foglalja össze.



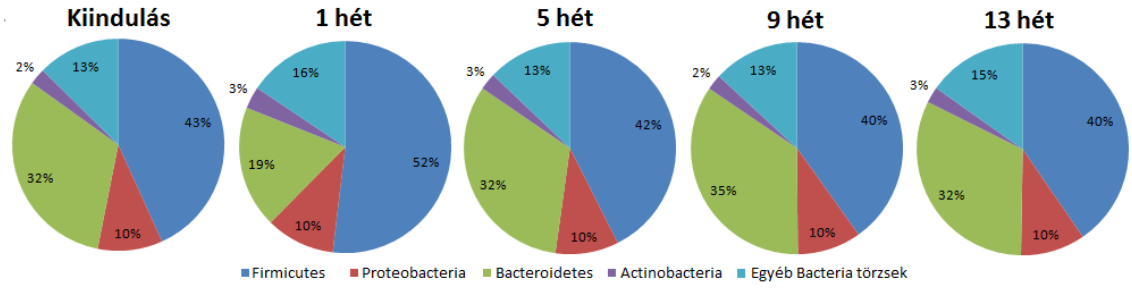
32. ábra. A kiindulási inokulim taxonómiai eloszlása. A koncentrikus körszelvényekben belülről kifelé haladva a közösség domén, törzs és osztály szerinti besorolásait tüntettem fel.

Az előző kísérletekhez hasonlóan a Bacteria doménben a Firmicutes törzs relatív mennyisége volt a legnagyobb, illetve ezen a törzsön belül a Clostridia osztály képviselői voltak a leggyakoribbak. Nagy számban képviseltetik magukat továbbá a Bacteroidetes és a Proteobacteria törzsek is. Az Archaea doménben a mixotróf Methanosarcinales rend domináns (Methanomicrobia osztály), bár az arheák relatív mennyisége kevesebb az előző kísérletekben megfigyeltekhez viszonyítva (~9-11%). Hasonló Archaea mennyiséget figyeltek meg mások is jól működő biogáz reaktorukban, melyből arra következtettek, hogy a metanogének aktivitása magasabb, mint a Bacteria domén képviselőié (Hanreich és mtsai. 2013, Li és mtsai. 2013). Ezeket a következtetéseket metatranszkriptomikai eredmények is alátámasztották (Zakrewski és mtsai. 2012). Az Archaeák relatív mennyiségét befolyásolhatja továbbá a fermentációs köztitermékek minősége és mennyisége is (Lee és mtsai. 2008, Blume és mtsai. 2010). Az előző vizsgálatokhoz hasonlóan számos szekvenciát találtam, melyeket egyetlen ismert mikrobához sem tudtam kötni. A továbbiakban a metagenom eredményeket

részletezem (külön a Bacteria és Archaea doméneket), melyek az azonosított mikrobák relatív számosságán alapulnak (4.14.3.2 és 4.14.3.3 fejezetek).

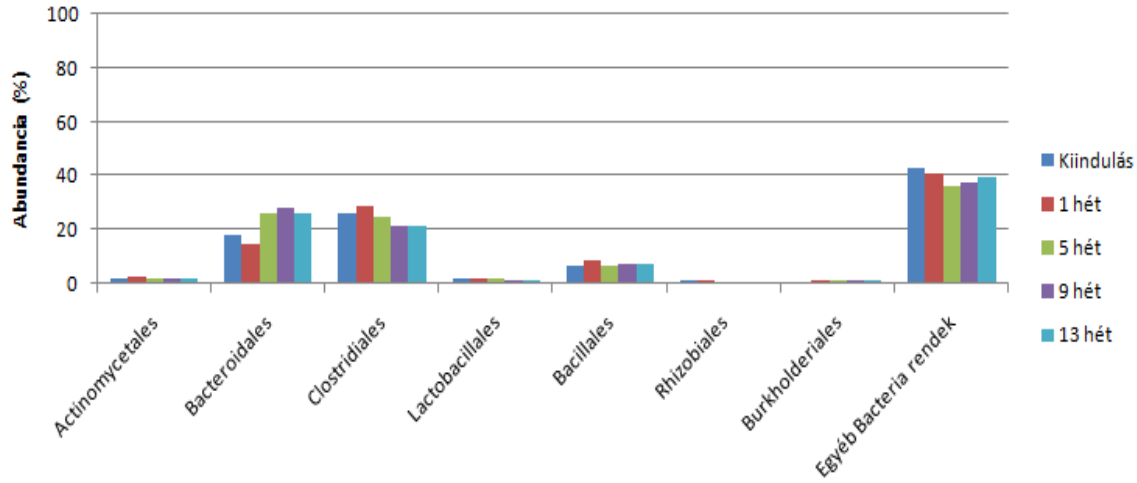
5.2.4.2.1 Kukorica szilázs fermentációjának mikrobiális közösség vizsgálata (Bacteria domén)

A kukorica szilázs fermentációjában szerepet játszó meghatározó törzsek a fermentáció kiindulási időpontjától a végéig megmaradtak a kukorica szilázs gyenge minőségétől függetlenül (33. ábra).



33. ábra. A kukorica szilázs fermentáció mikrobiális összetételének alakulása a Bacteria doménen belül törzs szinten.

A fermentáció során a Firmicutes és Bacteroidetes törzsek tagjai dominálnak, ezek illetve a többi törzs tagjainak gyakoriságukban csupán kisebb változások történnek (34. ábra).



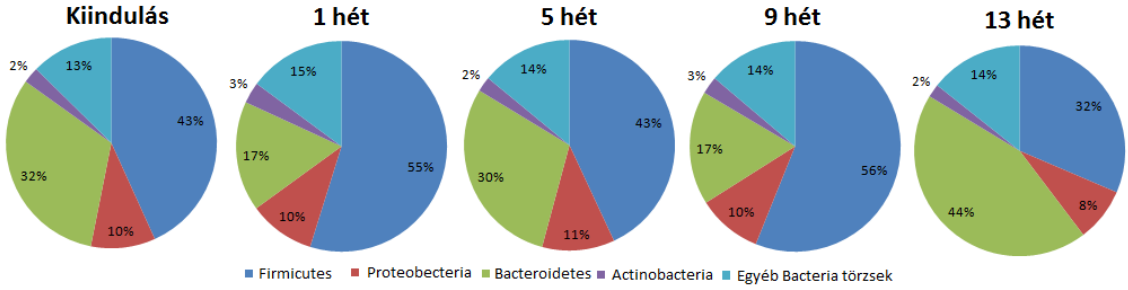
34. ábra. A Bacteria domén rendjeinek alakulása a kukorica szilázs fermentációjában.

A *Clostridium* nemzetség dominanciáját figyeltem meg a Firmicutes törzsön belül, míg a Bacteroidetes törzsben a *Bacteroides* nemzetség tagjai voltak relatív többségben. A

silókukorica fermentációja során azonosított mikroba közösség felépítése és annak időbeli alakulása nagyban hasonlít az előző kísérletsorozatokban megfigyelthez, bár biometán hozamban ennek hatása nem érvényesül feltehetően a kukorica szilázs gyenge minősége miatt (5.2.2.3.1 fejezet).

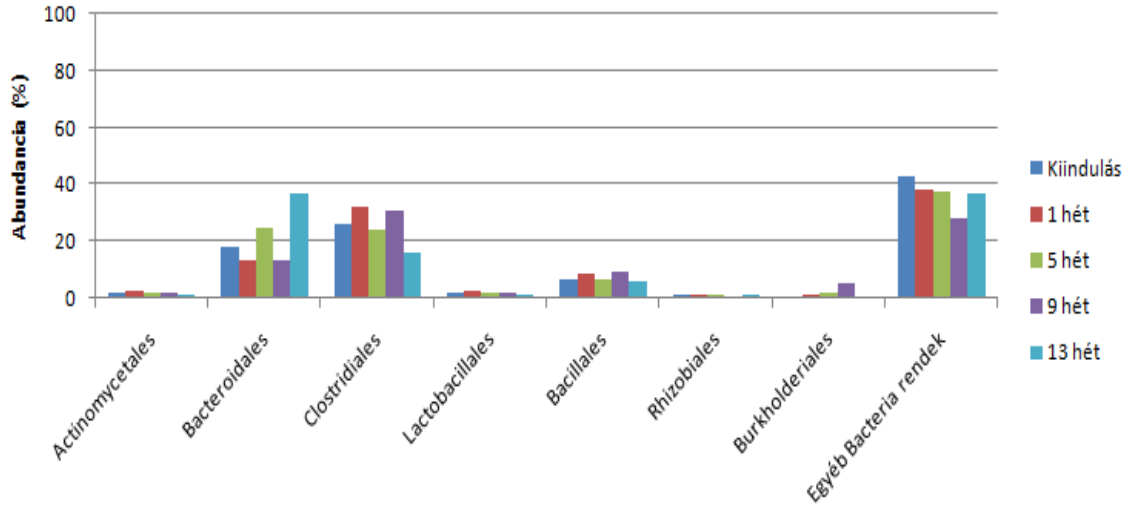
5.2.4.2.2 A kofermentáció mikrobiális közösségének vizsgálata (Bacteria domén)

A *Sc. obliquus* és a kukorica szilázs kofermentációja során is megfigyeltünk a mikrobiális közösségben változásokat, azonban a mikroalga-baktérium keverékkel végzett kofermentációtól eltérő eredményeket kaptunk (35. ábra).



35. ábra. A Bacteria doménen belüli változások a kofermentáció mikrobiális közösségének törzs szintjén.

Az előző kísérlettel ellentétben a Proteobacteria (Burkholderiales, Rhizobiales törzsek), illetve más a mikroalgával együtt bevitt prokatióta sem halmozódott fel (36. ábra).



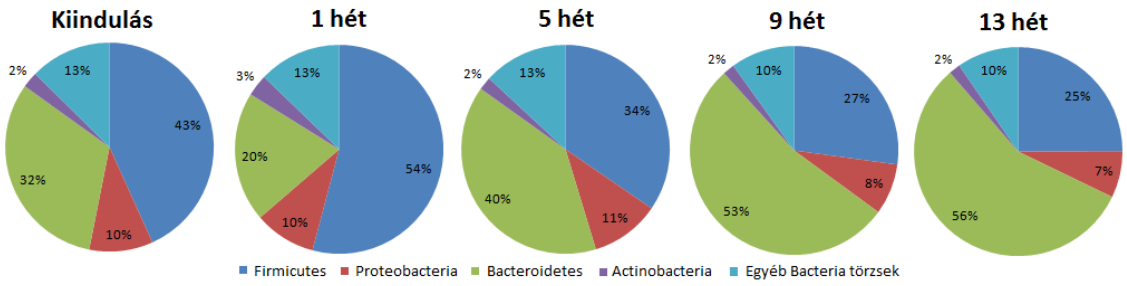
36. ábra. Bacteria doménen belüli változások rend szinten a kofermentáció során.

Az *Sc. obliquus*-al történt kofermentáció során a szubsztrát adagolásának időtartama alatt (1, 5, 9. hét) a Clostridiales rend domináns maradt. A szubsztrát adagolásának

megszüntetése után a fermentáció végén a Bacteroidales rend került többségbe, bár ebben a szakaszban csak egy mérési pontunk van (35. ábra). A Clostridiales rend képviselői hatékony cellulózbontó extracelluláris enzimekkel (celluloszómákkal) rendelkeznek (Schwarz 2001), így a szubsztrátok adagolásának időszakában a cellulolitikus aktivitás feltehetően magasabb lehetett a kukorica siló hozzáadása következtében, aminek eredményeként a mikroalga biomasszát a fermentor mikroba közössége hatékonyabban hasznosíthatta. Ez a hatás összefüggésben lehet Yen és Brune megfigyelésével miszerint kofermentációban a megnövekedett celluláz aktivitás miatt az algában található értékes tápanyagok is gyorsabban szabadulhatnak fel, ami végső soron növelheti a biogáz hozamot (Yen és Brune 2007). A szubsztát adagolásának megszünésével a Clostridiales rend visszaszorul, melynek következtében a cellulolitikus aktivitás is feltehetően lecsökken. Ezeket a hatásokat megfigyelhetjük a biometán termelésben is, ugyanis a szubsztrát adagolás időszakában a mikroalga biomassza kompenzálni tudta a kukorica siló gyenge gázhozamát, illetve a szubsztrátok adagolásának megszünésével a fermentáció végén már nagyrészt csak a lassabban bomló *Sc obliquus* biomassza maradhatott hátra, melyet a visszaszorult Clostridiales rend képviselői már nem tudtak hatékonyan bontani, így a biometán termelődése is visszaesik.

5.2.4.2.3 Sc. obliquus biomassza fermentációjának mikrobiális vizsgálatai (Bacteria domén)

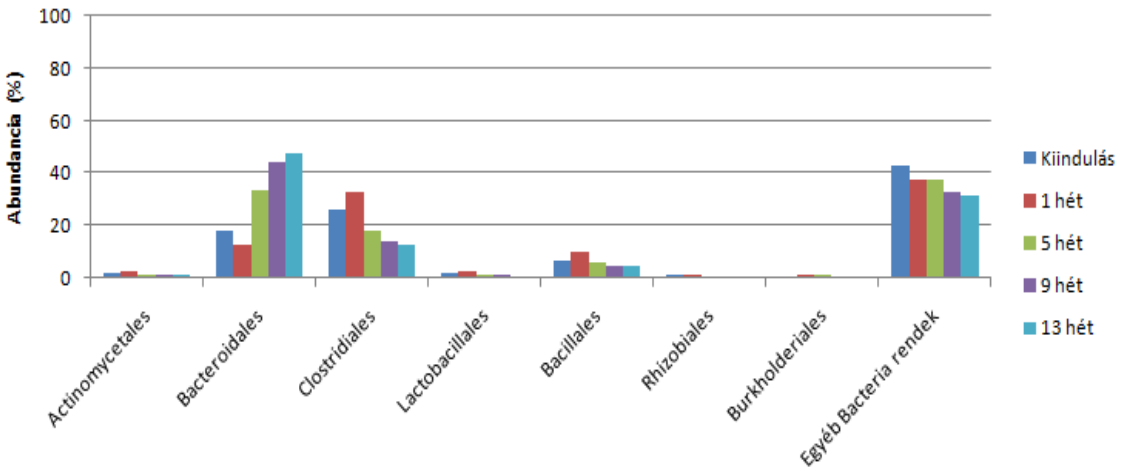
Az *Sc. obliquus* fermentációja során a fermentor mikroba közössége a Bacteria doménen belül megváltozik a kiindulási állapothoz képest (37. ábra).



37. ábra. *Sc. obliquus* biomassza fermentációja során bekövetkezett mikrobiális változások törzs szinten a Bacteria doménben.

Ebben a kísérletsorozatban a mikroalga biomassza szubsztát sokkal kevesebb szintróf baktériumot tartalmazott (1%), így jobban követhettük nyomon a mikroalga biomassza

bontásában résztvevő mikroba közösséget. A fermentáció előrehaladtával a Bacteroidetes törzsön belül a Bacteroidales rend dominanciáját figyeltem meg, mely kiszorítja a fermentációs közösségből a Clostridiales rend képviselőit (38. ábra).



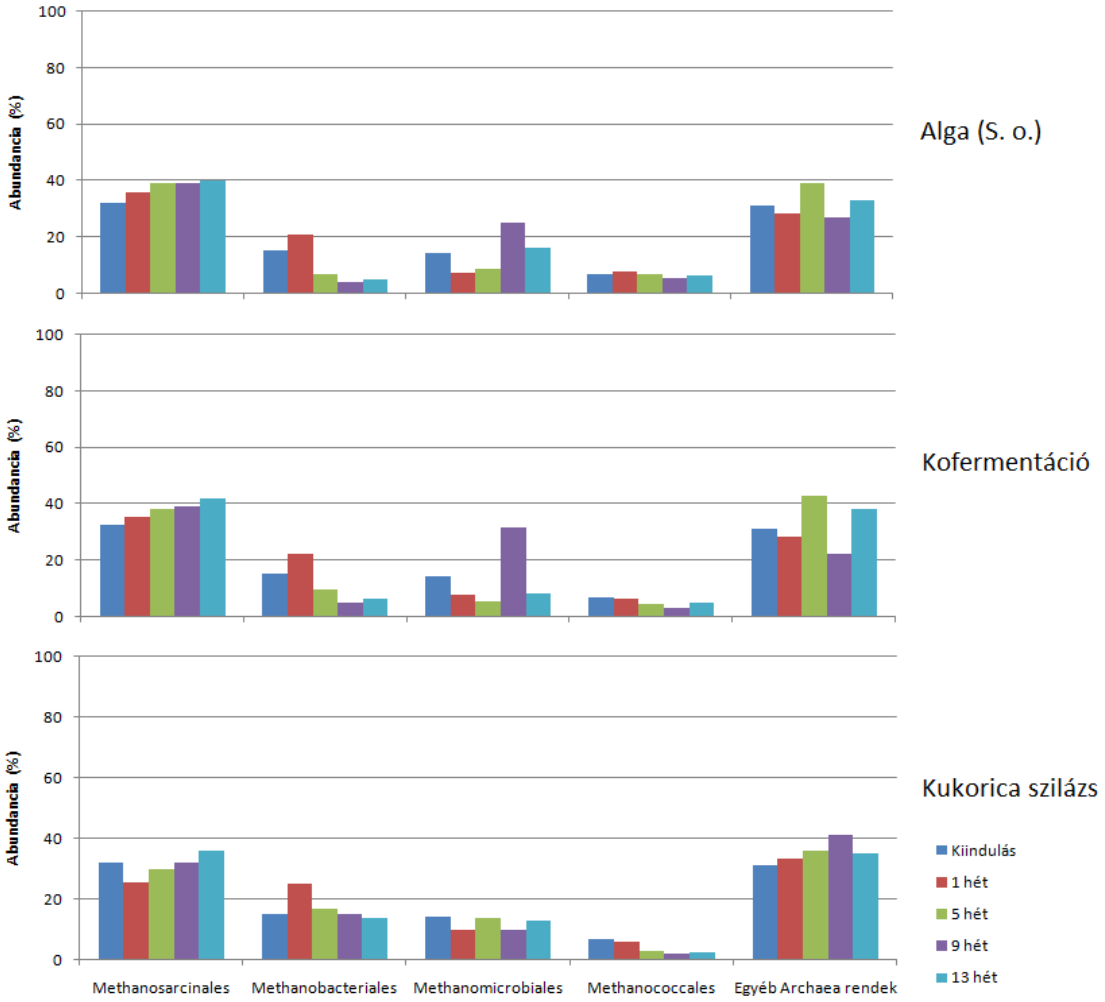
38. ábra. A Bacteria doménen belüli rendek alakulása a mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációja során.

Az *Sc. obliquus* fermentációja során visszaszoruló Clostridiales rend tagjai relatív számosságuk visszaesése miatt nem tudják olyan hatékonyan emészteni a mikroalga biomasszát, mint a kofermentáció esetében. Ez hatással van a biogáz termelő mikrobiális tápláléklánc további lépéseire, így végső soron a biogáz hozam is alacsonyabb. Bár a Bacteroidales rend egyes tagjai, melyeket korábban biogáz reaktorokban azonosítottak rendelkeznek cellulózbontó tulajdonsággal (Betian és mtsai. 1977, Bjursel és mtsai. 2006, Wirth és mtsai. 2012), ezt a rendet inkább a másodlagos fermentációban említik jelentősebb szereplőként (Delbès és mtsai. 2001, Hanreich és mtsai. 2013). A biomassza adagolásának megszűnése utáni időszakban termelődött biometán mennyiség hátterében pedig az alga további lassú emésztése állhat, amiben elsősorban a Clostridiales rend képviselői vesznek részt.

5.2.4.2.4 A különféle fermentációk Archaea doménjének vizsgálata

A mikroalga keverék és szintrófjainak fermentációjához hasonlóan az *Sc. obliquus* biomassza fermentációja során az Archaea doménen belül a Methanomicrobia osztályban a Methanosarcinales rend volt domináns, melynek képviselői közül a

mixotróf *Methanosarcina* nemzetség a leggyakoribb. A *Methanosarcina*-k mindhárom fermentáció során végig megmaradnak dominánsnak (39. ábra).



39. ábra. Az Archaea domén négy leggyakoribb rendje a három féle fermentáció során.

Az Archaea-k relatív számossága ebben a kísérletsorozatban alacsonyabb volt, mint az előzőben, bár itt a doménen belüli diverzitás volt magasabb. Azonban a metán termelésért felelős Archaea-k nagyrészt a 39. ábrán feltüntetett négy rendbe tartoztak (Methanosarcinales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanococcales).

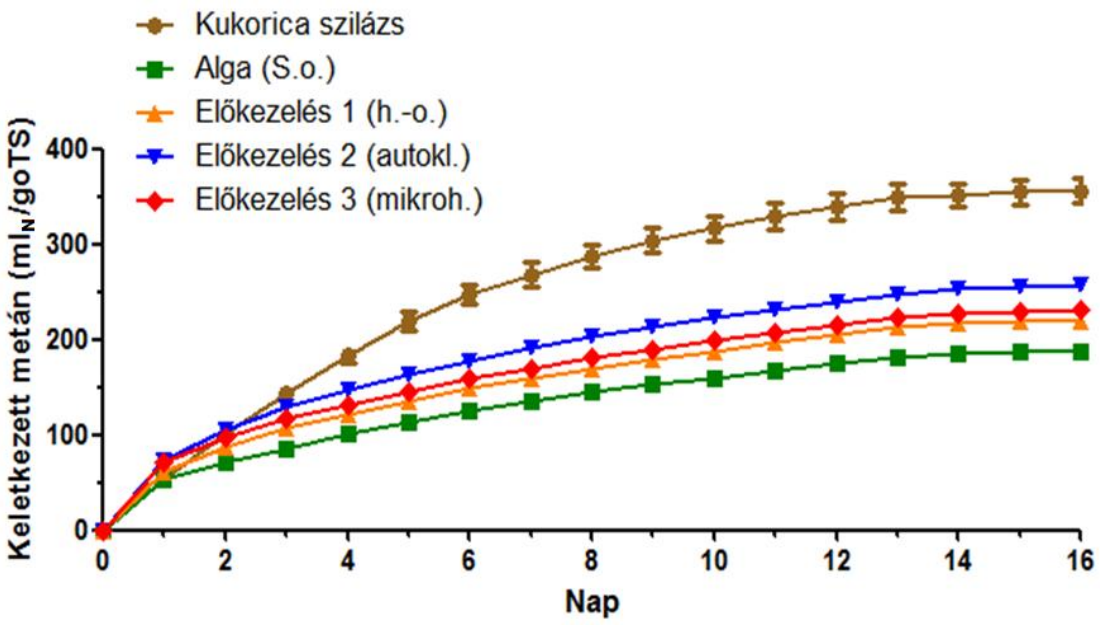
5.2.5 *Scenedesmus obliquus* előkezelésének hatása az anaerob fermentációra

A *Scenedesmus obliquus* vastag, szénhidrát alapú hemicellulózban gazdag sejtfallal rendelkezik, mely rendkívül ellenálló (Takeda 1991, Takeda 1996). Ennek megfelelően az anaerob fermentáció során nehezebben, lassabban bontható (lásd előző kísérlet sorozat), mint egy olyan mikroalga, mely fehérje alapú sejtfallal rendelkezik

(*Chlamydomonas reinhardtii*) (Miller és mtsai. 1972, Golueke és mtsai. 1956, Mussgnug és mtsai. 2010). Nem meglepő tehát, hogy a *Sc. obliquus*-ból keletkező biogáz mennyisége elmarad a jó minőségű kukorica szilázshoz képest (és a *C. reinhardtii*-tól is). Mivel az említett mikroalga tartalmaz minden olyan anyagot, mely egy fermentorban élő mikroba közösség számára hasznos pl. vitaminokat, zsírsavakat, lipideket (Becker 1994, Sigh és mtsai. 2011), különféle előkezeléseknek vetettem alá a *Sc. obliquus* mikroalgát annak érdekében, hogy magasabb gáztermelést, illetve esetlegesen magasabb metán tartalmat érjek el.

Az irodalomban számos előkezelési módszert tárgyalnak mikroalgákra különféle célból. Többek között a hőkezelés (Passos és mtsai. 2013), a szonikálás (Jeon és mtsai. 2013) és a mikrohullámmal történő kezelés (Passos és mtsai. 2013) bizonyult eredményesnek a sejt feltárás szempontjából. Ezek közül a hőkezelést és a mikrohullámú kezelést alkalmaztam. A különféle kezelések hatékonyságát a biogáz termelésre batch típusú fermentációban 150ml térfogatban vizsgáltam a VDI alapján (VDI Richtlinien 2006).

A kísérletekben két féle hőkezelést, illetve mikrohullámú kezelést végeztem. Az első előkezelés többszörös (10-szer ismételt) fagyasztás - felolvasztás módszert foglal magában (folyékony nitrogén, forró vízben olvasztás). A második előkezelés során 2 óráig autoklávoztam a mikroalgát, míg a harmadik kezelés mikrohullámmal történt a 4.15. fejezetben leírtak alapján. Mindegyik minifermentorba 3g szerves száraz anyag/l mennyiségben adagoltam a szubsztrátokat (VDI 4630 1X, VDI Richtlinien 2006). A kezeletlen mikroalga nagyjából fele annyi metánt termelt ebben a kísérletben, mint a kukorica szilázs (2. táblázat), illetve a különböző előkezelések közül az autoklávozás bizonyult a legjobbnak, bár a hatékonyság nem kiemelkedő, ennek eredményeit a 40. ábra foglalja össze.



40. ábra. A *Sc. obliquus* különböző előkezeléseinek hatékonysága. (Előkezelés 1: fagyasztás-felolvasztás, Előkezelés 2: autoklávozás, Előkezelés 3: mikrohullámú kezelés).

A kezelések hatékonysága nem volt 100%-os, mindegyik esetben mikroszkóppal végzett vizsgálat során találtam épen maradt sejteket. Az autokláv és a mikrohullámú kezelés bizonyult a mikroszkópos képek alapján a leghatékonyabbnak, itt körülbelül a mikroalgák háromnegyede táródott fel. A mikrohullámú és az autoklávval történt kezelések eredményeképp az első napon a keletkezett gázmennyiség meghaladta a kukorica szilázsét, ez a kezelés hatékonyágát mutatja, ugyanis a fermentorban élő mikrobák így könnyebben, gyorsabban hozzáférhettek a számukra fontos tápanyagokhoz. Azonban ez a hatás körülbelül egy napig tart a batch fermentáció során, ugyanis a fermentációtípusnak megfelelően nem történik újboli biomassza bevitel, így a gyorsan emészthető értékes tápanyagok nem pótlódnak, ezért az egészben maradt mikroalgák sejtfalának lassú bontására kényszerül a fermentor mikroba közössége. Ez a hatás megfigyelhető a fermentorokban keletkezett gáz metán tartalmában is. Az autoklávozott és mikrohullámú kezelésen átesett mikroalgából az első napokon jobb minőségű gáz keletkezik, mint a kezeletlen algából (kezeletlen: 61-62% CH_4 tartalom, kezelt: 65-66% CH_4 tartalom). A fermentáció végén megvizsgáltam a fermentációs paramétereket is. Az eredmények azt mutatták, hogy a kiindulási időpontban mért paraméterek nem változtak, a minifermentorok stabilan működtek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A biogáz termelő mikroorganizmusok metagenomikai elemzése egy teljesen újszerű megközelítés, amely lehetővé teszi az egész mikroba közösség saját környezetükben történő megfigyelését, ez egyaránt fontos gyakorlati és alapkutatási szempontból. Dolgozatomban először az Applied Bisoystems SOLiD újgenerációs szekvenátorát alkalmaztam a biogáz fermentorban élő mikroba közösség összetételének vizsgálatára. Ezt a szekvenátort korábban ilyen jellegű munkákra nem használták. Más rendszerekben azonban már alkalmaztak korábban újgenerációs szekvenátorokat (Roche 454 GS FLX és Titanium) biogáz termelő közösségek vizsgálatára. Az eredmények összhangban vannak az általam kapott eredményekkel (Schlüter és mtsai. 2008, Krause és mtsai. 2008, Kröber és mtsai. 2009, Jeanicke és mtsai 2011, Hanreich és mtsai. 2013). A SOLiD és a 454 szekvenátorok számos technikai aspektusban különböznek. A SOLiD egy ligálás alapú rövid leolvasásokat készítő, nagy áteresztőképességű szekvenátor, mely minden nukleotidot kétszer olvas le, szemben a 454-gyel, melynek kihozatala és működésének elve is eltérő. A SOLiD és a 454 adatok mégis jól korrelálnak egymással annak ellenére, hogy a vizsgált minták eredete sem volt azonos, bár a kísérleti összeállítást a lehetőségekhez mérten igyekeztem az irodalmi adatok szerint megismételni (kukorica szilázzsal és hígtrágyával táplált mezofil biogáz fermentor). Az újgenerációs szekvenátorok használatával kapott eredmények megbízhatóak és reprodukálhatóak. Az általam használt újgenerációs szekvenátor adatai szerint a Bacteroides és a Firmicutes törzsek tagjai játszanak fontos szerepet a növényi biomassza hidrolízisében és a másodlagos fermentációban. Számos *Clostridium* fajt azonosítottam, melyek közül sokan egyaránt rendelkeznek hidrogéntermelő és cellulolitikus tulajdonsággal, így jelenlétük valószínűsíthetően jelentős a biomassza hatékony bontásában. Az Archaea doménben a Methanomicrobiales rendet találtam leggyakoribbnak, melynek tagjai hidrogenotróf metanogének. A renden belül a *Methanoculleus marisnigri* bizonyult a leggyakoribb fajnak, ezt a törzset a korábbi vizsgálatok is nagy gyakorisággal mutatták ki (Schlüter és mtsai. 2008, Krause és mtsai. 2008, Kröber és mtsai. 2009, Jeanicke és mtsai 2011).

A nem metagenomikai módszerrel nyert ismeretek számos általunk is megfigyelt jelenséget jeleztek korábban is. Szennyvíz iszappal működő reaktorokban az acetotróf, míg a különböző hulladékokkal működő reaktorokban a hidrogenotróf metanogéneket

találták többségben (Sundberg és mtsai. 2013). Ezt a megfigyelést erősítették meg egy termofil kísérleti reaktorban, melyet magas cellulóz tartalmú szubsztráttal tápláltak: a termofil *Methanotermobacter* nemzetség tagjai voltak dominánsak, míg a Bacteria doménben a Firmicutes törzs emelkedett ki (Li és mtsai. 2013). Többek között a reaktor térterhelése is befolyásolja a metanogén közösség felépítését: a térterhelés növelésével és a reaktor savasodásával párhuzamosan a kukorica szilázzsal táplált mezofil fermentorban a hidrogenotrófok dominanciáját figyelték meg (Blume és mtsai. 2010).

Napjaink modern biogáz üzemei 80%-ban kukorica szilázst használnak szubsztrátként (Shildermann 2012). A biogáz gyáraknak jelentős költséget jelent a kukorica szilázs biztosítása, így az iparágnak szüksége van alternatív biomassza forrásokra. Az alternatívák megválasztásánál fontos szempont a hatékonyság megtartása. Egyre nagyobb az érdeklődés a napenergiát hasznosító mikroorganizmusok biomasszájának energetikai hasznosítására. Az algák területegységre vonatkoztatva jelentős biomassza hozamot biztosítanak folyamatosan és az élelmiszertermelésre alkalmatlan helyeken is tenyészthetők (Schmid-Staiger 2009). Előnyös tulajdonsága a mikroalgák anaerob fermentációjának, hogy a biomasszájukból keletkező biogáz általában magasabb metán tartalommal rendelkezik (~60-75%), mint a növényi biomasszából nyerhető gáz (De Schamphelarie és mtsai. 2009). A mikroalga biomasszát közvetlenül és közvetve is felhaználhatjuk biogáz gyártására.

A közvetett felhasználást modellező kísérletünkben használt mikroalga keverék és szintrófjainak biogáz alapanyagként való használata egy másik kísérlet sorozathoz kapcsolódik, mely során hasonló alga és mikroba keveréket használnak fel biohidrogén termelésre. A biohidrogén termeltetés után a mikroalga biomassza visszamarad, ez alkalmas lehet biogáz előállításra. A kísérlet során monoszubsztrátként és kofermentációban fele-fele arányban adagolt mikrobiális biomassza keverék és kukorica szilázs fermentációjának eredményei alapján a mikroba keverékből keletkezett biogáz minősége igen jónak bizonyult (58-61% CH_4 tartalom), bár biomasszájából kevesebb metán keletkezik 1g száraz szerves anyagra vonatkoztatva, mint a kukorica szilázsból. A fermentáció stabilan működött a két hónapos kísérlet során, azonban a kísérlet végén a mikroalga fermentációjánál az ammónium tartalom növekedését tapasztaltam a fermentációs folyadékban. Ennek lehetséges oka a mikroalga alacsony C/N aránya (5,3:1). Magasabb C/N aránnyal rendelkező kukorica szilázzsal való kofermentáció során a kumulatív biometán mennyisége közel megegyezik a monoszubsztrátként adagolt kukorica szilázséval, illetve az ammónium tartalom növekedése kevésbé

tapasztalható. A metagenom eredmények alapján a mikroalga keverék és szintrófjainak hatására már az első héten jelentős változások történnek a fermentorok mikrobiális közösségében. A mikroalga keverékkel együtt bevitt *Rhizobium* illetve *Burkholderia* nemzetségek nagy mennyisége a fermentor kiindulási időpontjában jelen lévő közösséget megváltoztatja. A kofermentációban kompenzálódik a *Rhizobium* és *Burkholderia* túlsúly, míg a kukorica szilázs fermentációja során lényegében megmaradnak a cellulóz tartalmú alapanyag bontásában jelentős szerepet játszó mikroba csoportok, csak a Proteobacteria törzs képviselői szorulnak vissza a Firmicutes és Bacteroides törzsek tagjaival szemben. A Bacteria doménben megfigyelt változások nem okoztak átrendeződést az Archaea doménben. A Methanomicrobia osztályon belül a Methanosarcinales rend bizonyult a leggyakoribbnak, melynek képvielői közül a mixotróf *Methanosarcina* nemzetség volt domináns szubsztrát összetétel változásától függetlenül. További kísérleteket igényelt annak megállapítása, hogy az össz-DNS alapján végzett metagenomikai következtetések a mikroba közösség funkcionális állapotát mennyire hűen tükrözik.

A fotoautotróf módon növesztett *Sc. obliquus* fermentációja során a reaktorok térterhelése megegyezett a keverék mikroalga adagolási mennyiségeivel, hogy a két kísérlet sorozat eredményei minél jobban összehasonlíthatóak legyenek. A keletkezett biogáz összetétele nagyban hasonlított az előző kísérletben tapasztaltakhoz, bár mennyiségben kissé elmaradt a könnyebben fermentálható mikroalgát is tartalmazó (*C. reinhardtii*) keveréktől. A kísérlet három hónapos ideje alatt, melyből az utolsó hónap biomassza beadagolás nélkül folyt a fermentációs paraméterek stabilak maradtak. A *Sc. obliquus* C/N aránya jobbnak bizonyult, mint az előző kísérletben használt keveréké, ezért a N tartalom nem változott fermentációja során, az ammónium tartalom sem nőtt jelentősen, csak a fermentáció végén szaporodott fel, de nem kritikus mértékben. Bár a kukorica szilázsnál és a kofermentációnál az arány a szén irányába tolódott el, a gyenge minőségű szilázs nem megfelelő bomlása magyarázhatja egyrészt a fermentáció alacsonyabb gázhozamát, másrészt a mikroalga fermentációhoz viszonyított alacsonyabb ammónium tartalmat a fermentációs folyadékban. Az *Sc. obliquus* vastag sejtfala miatt a fermentorban lassabban bomlott, így csak a biomassza adagolásának megszűnése után lépte túl a kofermentációból keletkezett kukorica szilázs metán hozamokat. Ebben a kísérletben is a kofermentáció a biometán mennyiség szempontjából az adagolási időszakban jobbnak bizonyult. A metagenom adatok alapján a fotoautotróf körülmények között tenyésztett *Sc. obliquus* mikroalga mellett

csak kis mennyiségben találtunk szintróf baktériumokat. Így a mikroalga keverék és szintróf baktériumainak fermentációs kísérletsorozatával ellentétben nem kerültek többségbe olyan mikroorganizmusok, melyeket a mikroalga biomasszával együtt vittünk be a rendszerbe. Ennek köszönhetően nyomon tudtuk követni, hogy az általunk adagolt szubsztrátok fermentációjában mely mikroba csoportok játszanak fontos szerepet. Az *Sc. obliquus* mikroalga anaerob bomlása során a Bacteriales rend kiszorítja a Clostridiales rend képviselőit, ezzel ellentétben a mikroalga és kukorica szilázs fele-fele arányú kofermentációjában a szubsztrát adagolásának időszakában a kezdetektől relatív többségben lévő Clostridiales rend megmarad dominánsnak, és csak a fermentáció végén a szubsztrátok adagolásának megszűntetése után kerülnek kisebbségbe. Ez összefügghet a szubsztrátokból keletkezett biometán hozam eredményekkel. A kukorica szilázs fermentációja során a Clostridiales rend végig megmarad dominánsnak, az előző kísérletsorozathoz hasonlóan. Az Archaea domén képviselőinek relatív mennyisége már a kiindulási inokulumban is alacsonyabb volt (5%), mint amit az előző kísérletsorozatokban tapasztaltunk (9-12%), mely a különböző szubsztrát tulajdonságok mellett további magyarázatot adhat az eltérő gázhozamokra. A fermentáció teljes ideje alatt az Archaea doménben a Methanosarcinales renden belül a *Methanosarcina* fajok dominanciáját figyeltük meg. Tehát az általunk végzett fermentáció ideje alatt a szubsztrátok fajtája, minősége nem befolyásolta jelentősen a metanogén közösség felépítését. Lényeges megjegyezni, hogy az összemérhető biogáz illetve metán hozamok egyértelműen azt mutatják, hogy a mikroalga gazdaságosabban termelhető és használható biomassza forrás, mint az etalonnak számító kukorica szilázs. A területegységre vetített magasabb biomassza hozam mellett figyelembe kell itt venni, hogy az algák folyamatosan tenyészthetők és betakaríthatók gyakorlatilag egész éven át és sokkal igénytelenebbek (gyomírtó, műtrágya, öntözés nem szükséges), mint a termesztett energianövények.

A *Sc. obliquus* vastag, hemicellulóz tartalmú sejtfallal rendelkezik, mely rendkívül ellenálló (Takeda 1991, Takeda 1996). Ezért a biogáz fermentor mikrobái csak lassan képesek bontani ezt a biomasszát. Az irodalomban többféle előkezelési technológiát javasolnak a mikroalgák feltárására. Az előkezelések közül esetünkben az autoklávozás volt a leghatásosabb, melyet a mikrohullámú kezelés követett. A feltárt mikroalgák sejttartalmát a fermentor mikroba közössége gyorsan és hatékonyan volt képes felhasználni, így az első napokban a fermentációból keletkező gáz mennyisége és metán tartalma emelkedik – meghaladja a kukorica szilázsét -, bár a hatás nem tart

sokáig, mert miután a mikroba közösség felhasználta a könnyen hozzáférhető anyagokat az egészben maradt sejtek fermentációjára szorulnak. Az előkezelések hatékonysága batch fermentációban mérsékelt, ugyanis az egységnyi mikroalga tömegre vonatkoztatott C/N arány és szervesanyag tartalom nem változik, csak a fermentorban élő mikrobák számára tesszük könnyebben hozzáférhetővé az értékes tápanyagokat. Ahhoz, hogy pontosan meghatározzuk az előkezelés eredményességét folyamatos üzemű fermentáció, illetve még hatékonyabb feltárási módszer alkalmazására van szükség.

Összességében a mikroalga fermentációval kapcsolatban elmondható, hogy a mikroalga anaerob bomlásának hatékonysága függ azok betáplálási módjától, a mikroalga típusától, a fermentációban részt vevő mikroba közösségtől, pH-tól, hőmérséklettől, és a retenciós időtől. Alacsony C/N aránnyal rendelkező mikroalgát kofermentációban érdemes fermentálni, melynek egyik előnye a szén/nitrogén arány egyensúlya, illetve a másik előny a celluláz aktivitás növekedése. Ezt a hatást meggyorsíthatjuk előkezeléssel.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúttal szeretném megköszönni a munkámhoz nyújtott segítséget, támogatást és sok ötletet, bíztató szót Prof. Dr. Kovács L. Kornélnak, és Dr. Maróti Gergelynek. Szeretném megköszönni a munkámhoz nyújtott segítségét az SZTE Biotechnológiai Tanszékén illetve az MTA SZBK Biofizikai Intézetében dolgozó minden munkatársnak, különösen Dr. Bagi Zoltánnak, aki sokat segített a fermentációk kivitelezésében, tervezésében, továbbá Kovács Etelkának, aki a biogáz üzem szimulációs kísérletben segédkezett. Ugyancsak szeretném megköszönni munkámhoz nyújtott értékes segítségüket két közvetlen munkatársamnak Lakatos Gergelynek, akivel a mikroalga és szintrófikus közösségének fermentációs kísérletsorozatot végeztük, illetve Böjti Tamásnak, ő az alga fermentációk során nyújtott segítséget.

Szeretném köszönetemet kifejezni az ELMAT kft.-nek, a kísérletekhez biztosított jelentős mennyiségű fotoautotróf módon tenyésztett *Sc. obliquus* mikroalga biomassza előállításáért.

Szeretném megköszönni az SZTE Mérnöki Karán Prof. Dr. Keszthelyi-Szabó Gábornak, és Beszédes Sándornak a mikroalga mikrohullámú kezelés kivitelezésének lehetőségét és az ebben való közreműködésüket.

Az SZTE Biotechnológiai Tanszék vezetője, Dr. Rákhely Gábor tette lehetővé a tanszéken folyó munkát, amiért köszönetemet fejezem ki.

Szeretnék köszönetet nyilvánítani a munka támogatóinak:

EU támogatás: HUSRB/1002/214/041 IPA és HURO/1001/193/2.2.2.

Hazai: GOP-1.1.2.-07/1-2003/8-0007,TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005, BarossALGOLABH, OMFB-00356/2010 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012.

8. Irodalomjegyzék

Ács N, Kovács E, Wirth R, Bagi Z, Strang O, Herbel Zs, Rákhely G, Kovács LK. Changes in the Archaea microbial community when the biogas fermenters are fed with protein-rich substrates *Biores Technol* 2013, 131:121-127.

Abram F, Enright AM, O'Reilly J, Botting CH, Collins G, O'Flaherty V. A metaproteomic approach gives functional insights into anaerobic digestion. *J Appl Microbiol* 2011, 110:1550-1560.

Alexander, M. Biodegradation of organic chemicals. *Env Sci Technol* 1985, 19:106-111.

Altschul SFl, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997, 25:3389-3402.

Amin SA, Green DH, Hort MC, Küpper FC, Sunda WG, Carrano JC. Photolysis of ion – siderophore chelates promotes bacteria – algal mutualism, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:17071-17076.

Amon T, Gruber W, Hoffstede U, Jäger P, Jäkel K, Kaiser F, Keymer U, Linke B, Berettig- Bruns U, Niebaum A, Öchsner H, Reinhold G, Schwab M, Telschow D, Weiland P, Welsch W, Wesolowski S. Gasausbeute in landwirtschaftichen biogasanlagen. KTBL, 2010 ISBN: 978-3-941583-49-9.

Anderson IJ, Sieprawska-Lupa M, Lapidus A, Nolan M, Copeland M, Del- Rio TG, Tice H, Dalin E, Barry K, Saunders E, Han C, Brettin T, Detter JC, Bruce D, Mikhailova N, Pitluck S, Hauser L, Land M, Lucas S, Richardson P, Whitman WB, Kyrpides NC. Complete genome sequence of *Methanoculleus marisnigri* Romesser et al. 1981 type strain JR1. *Standards in Genomic Sciences* 2009, 1:189-196.

Bagi Z, Ács N, Bálint B, Horváth L, Dobó K, Perei RK, Rákhely G, Kovács KL. Biotechnological intensification of biogas production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, 76:473-482.

Bai A. A biogáz. Budapest: Száz magyar falu könyvesháza Kht., 2007.

Bai A. A biomassza energetikai hasznosításának jelene és tendenciái hazánkban. DE-ATCAVK Nemzetközi Konferencia. Debrecen, 2003, 124-125.

Bai A, Lakner Z, Marosvölgyi B, Nábrádi A. A biomassza felhasználása. Budapest: Szaktudás Kiadó Ház, 2002.

Banks CJ, Zhang Y, Jiang Y, Heaven S. Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations. *Biores Technol* 2012, 104:127-135.

Barret M, Gagnon N, Kalmokoff MK, Topp E, Varastegui Y, Brooks SPJ, Matias F, Neufeld JD, Talbot G, Identification of Methanoculleus spp. as active methanogens during anoxic incubations of swine manure storage tank samples. *App Environ Microbiol* 2013, 79:424-433.

Becker EW. The production of microalgae a source of biomass. *Biomass Util* 1983.67: 205.

Becker EW. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. 1994. *Cambridge University Press, Cambridge, New York.*

Bergmann I, Nettmann E, Mundt K, Klocke M. Determination of Archaea abundance in a mesophilic biogas pant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *J Microbiol* 2010, 56:440-444.

Betian HG, Linehan BA, Bryant MP, Holdeman LV. Isolation of *Bacteroides sp*. from human feces. *Appl Environ Microbiol* 1977, 33:1009-1010.

Bálint, B, Bagi Z, Tóth A, Rákhely G, Perei K, Kovács LK. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69:404-410.

Bauer C, Korthals M, Gronauer A, Lebuhn M, Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Wat Sci Technol* 2008, 58:1433-1439.

Bayer EA, Bealich J-P, Shoham Y, Lamed R, The cellulosomes: Multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *J Ann Microbiol* 2004: 58:521-554.

Beneman, JR. Hydrogen production by microalgae. *J Applied Physiol*, 2000, 12:291-300.

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008, 456:53–59.

Bjursel MK, Martens EC, Gordon JI. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *J Biol Chem* 2006, 281:36269-36279.

Binot R, Martin D, NynsEJ, Naveau H. Digestionanaerobic d'alguescultiveesdans les eaux de refroidissement industrielles. 1978, In: Proc. Heliosynthese aquaculture Semin, Martigues, France, Sept 20, 1977.

Blume F, Bergmann I, Nettmann E, Schelle H, Rehde G, Munkdt K, Klocke M. Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *J Appl Microbiol* 2010, 109:441-450.

Brady A, Salzberg SL, Metagenomic phylogenetic classification with interpolated Markov models. *Nat Methods* 2009, 6:673–676.

Brambilla E, Djao ODN, Daligault H, Lapidus A, Lucas S, Hammon N, Nolan M, Tice H, Cheng J-F, Han C, Tapia R, Goodvin L, Putluck S, Liolios K, Ivanova N, Mavromatis K, Mikhailova M, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang Y-J, Jeffries CD, Rohde M, Spring S, Sikorski J, Göker M, Woyke T, *et al*. Complete genome sequence of *Methanoplanus petrolearius* type strain (SEBR 4847T). *SIGS* 2010, 3:203-211.

Bräuer SL, Cabillo-Quiroz H, Ward RJ, Yavitt JB, Zinder SH. *Methanoregula boonei* gen. nov. sp., an acidophilic methanogen isolated from an acidic peat bog. *IJSEM* 2010, 61:45-52.

Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae – A review of technologies of biofuels and co–products. *Renewable and Sustainable Enegy Rev* 2010, 14:557-577.

Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch Microbiol* 1967, 59:20-31.

Cabillo-Quiroz H, Yavitt JB, Zinder SH. *Methanosphaerula palustris* gen nov sp nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. *IJSEM* 2009, 59:928-935.

Cayol, JL, Fardeau ML, Garcia JL, Ollivier B. Evidence of interspecies hydrogen transfer from glycerol insaline enviroments. *Extremophiles* 2002, 6:131-134.

Chachkhiani M, Dabert P, Abzianidze T, Partskhaladze G, Tsiklauri L, Dudauro T, Gordon J-J, 16S rDNA characterization of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Biores Technol* 2004, 93:227-232.

Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Biores Technol.* 2008, 99: 4044–4064.

Chouari R, Le Paslier D, Dauga C, Daegelen P, Weissenbach J, Sghir A. Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Environ Microbiol* 2005, 7:1104-1115.

Cirne DG, Lehtomäki A, Björnsson L, Blackall LL, Hydrolysis and microbial community analysis in two-stage anaerobic digestion of energy corps. *J Appl Microbiol* 2007, 103:516-527.

CLC Bio Genomics Workbench
http://www.clcbio.com/index.php?id = 1297(2013)

Colberg PJ, Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oliganols, and monoaromatic lignin derivatives. *In.: Biology of Anaerobic Organisms, Ed.: Zhender AJB, New York: John Wiley and Sons, 1988*.

Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 2007, 35:D169-172.

Collins G, Woods A, McHugh S, Carton MW, O'Flaherty V. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiol Ecol* 2003, 46:159-170.

Conrad, R, Bonjour F, Aragno M. Aerobic and anaerobic microbial consumption of hydrogen in geothermal springwater. *FEMS Microbiol Lett* 1985, 29:201-205.

Debarati P, Frank WA, Arick T, Bridges SM, Burgess SC, Yoginder SD, Lawrence ML.Genome sequence of the solvent-producing bacterium *Clostridium carboxidivorans* strain P7. *J Bacteriol* 2010, 192:5554-5555.

Daniel RM, Smith M, Phillip AD, Ratcliffe HD, Drozd JW, Buel AT. Anaerobic growth and denitrification by *Rhizobium japonicum* and other *Rihzobia*. *J Gen Microbiol* 1980, 120:517-521.

Delbès C, Moletta R, Godon J-J, Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digestor ecosystem. *FEMS Lett* 2001, 35:19-26.

Delbès C, Moletta R, Godon J-J. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction–single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol* 2000, 2:506-515.

Demian AL, Newcomb M, David Wu JH. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, 69:124-154.

De Morais MG, Costa JAV. Carbondioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina sp*. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett* 2007, 29:1349–1352.

Deppenmeier U, Müller V, Gottschalk G. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch Microbiol* 1996, 165:149-163.

Deppenmeier U, The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002, 71:223-283.

Deppenmeier U, Müller V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic Archaea conserve energy. *Results and Problems in Cell Differentiation* 2008, 45:123-152.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevil D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16 S rRNA gene database and workbench compatible with ARB**.** *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:5069-5072.

De Schamphelaire L, Verstraete W, Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system. *Biotechnol Bioeng* 2009, 103:296-304.

Drake H, Küsel K, Matthies C. Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002, 81:203-213.

Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJM, Stewart CS, Flimt HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii* and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov. comb. nov. *IJSEM* 2002, 52:2141-2146.

Duport C, Zigha A, Ronsenfeld E, Schmitt P. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol* 2006, 188:6640-6651.

Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* 2008, 190:2597–2606.

Ellis JT, Tramp C, Sims RC, Miller CD. Characterization of a methanogenic community within an algal fed anaerobic digester. *ISRN Microbiol*. 2012, doi:10.5402/2012/753892.

Entcheva P, Liebl W, Johann A, Hartsch T, Streit WR. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67:89-99.

Ercel C, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. Genome of rice Cluster I archaea – the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science* 2006, 313:370-372.

Ferry JG. Formate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Rev* 1990, 87:377-382.

Ferry JG. Enzymology of the fermentation of acatate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *Biofactors* 1997, 6:25-35.

Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 2010, 38 Database issue: D211–D222.

Fischer R, Thauer RK. Ferredoxin-dependent methane formation from acetate in cell extracts of *Methanosarcina barkeri* (strain MS). *FEBS Lett* 1990, 269:368-372.

Fouchard S, Hemscheimer A, Caruana A, Pruvost J, Legrand J, Happe T, Peltier G, Cournac L. Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Appl Environ Microbiol* 2005, 10:6199-6205.

Franke-Whittle IH, Goberna M, Pfister V, Insam H. Design and development of ANAEROCHIP microarray for investigation of methanogenic communities. *J Microbiol Meth* 2009, 79:279-288.

Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, Endrizzi MG, McDolnald P, FritzHugh W, Calvo S, Engels R, Smirnov S, Atnoor D, Brown A, Allen N, Naylor J, Sthange-Thomann N, DeArrellano K, *et al*. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res* 2002, 12:532-542.

Gerardi, MH. The Microbiology of Anaerobic Digesters. USA: Wiley-Interscience, 2003

Glaser P, Rusniak C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zauine M, Couvé E, Lalioui L, Poyort C, Trieu-Cout P, Kunst F. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* 2002, 45:1499-1513.

Gold DN, Martin JJV. Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *J Bacteriol* 2007, 189:6787-6795.

Golueke CG, Oswald WJ, Gotaas HB. Anaerobic digestion of algae**.** *Appl Microbiol* 1956, 5:47-55.

Gorman DS, Levine RP. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965, 54:1665–1669.

Griffin ME, McMahon KD, Mackie RI, Raskin L. Methanogenic population dynamics during startup of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnol Bioeng* 1998, 57:342-355.

Goto T, Yamashita A, Hirakava H, Matsutani M, Todo K, Ohsima K, Toh H, Miyamato K, Kuhara S, Hattori M, Shimizu T, Akimoto S. Complete genome sequence of *Finegoldia magna*, an opportunistic pathogen. *DNA Res* 2008, 15:39-47.

Guedon E, Desvaux M, Petitdemange H. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68:53-58.

Guerra NP, Fajardo P, Fuciños C, Amado RI, Alonso E, Torrado A, Pastrana L. Modelling the biphasic growth and product formation by *Enterococcus faecium* CECT 410 in realkalized fed-batch fermentations in whey. *J Biomed Biotechnol* 2010.doi:10.1155/2010/290286.

Han K, Lim HC, Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng* 1992, 15:663-671.

Handelsman J, Metagenomics: application of genomics to uncultutred microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 4:669-685.

Hanreich A, Schimpf U, Zakrewski M, Schlüter A, Benndorf D, Heyer R, Rapp E, Pühler A, Reichl U, Klocke M. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation**.** *Syst Appl Microbiol* 2013, 330-338.

Herbel Zs, Rákhely G, Bagi Z, Ivanova G, Ács N, Kovács E, Kovács KL. Exploitation of the extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in hydrogen and biogas production from biomasses. *Environ Technol* 2010, 31:1017-1024.

Hernández EPS, Córdoba LT. Anaerobicdigestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. *Resources, Conservation and Recycling* 1993, 9: 127-132.

Hiss RH, Norris DE, Dietrich CH, Whitcomb RF, West DF, Bosio CF, Kambhampati S, Piesman J, Antolin MF, Black WC. Molecular taxonomy using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of microbial ribosomal DNS genes. *Ins Molec Biol* 1994, 3:171-183.

Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y, Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Appl Environ Microbiol* 2006, 2:1623-1630.

Hoskins J, Alborn JrWE, Arnold J, Blaszczak LC, Burgett S, DeHoff SB, Strem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass JS, Khoja H, Kraft AR, Lagace RE, LeBlanc DJ, *et al*. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 2001, 183:5709-5717.

Huse SM, Huber JA, Morisson HG, Sogin ML, Welch DM. Acurrancy and quality of massively paralell DNA sequencing. *Genome Biol* 2007, 8:R143.

Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster CS, MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 2007, 17:377–386.

Hwang K, Shin SG, Kim J, Hwang S. Methanogenic profiles by denaturing gradient gel electrophoresis using order specific primers in anaerobic sludge digestion. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, 80:269-276.

Jaenicke S, Ander C, Bekel T, Bisdorf R, Dröge M, Gartemann K-H, Jünemann S, Kaiser O, Krause L, Tille F, Zakrzewski F, PühlerA, Schlüter A, Goesmann A. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoSOne* 2011, 6**:**e14519.

Jeon B-H, Choi J-A, Kim H-C, Hwang J-H, Abou-Shanab RA, Dempsey BA, Regam JM, Kim JR. Ultrasonic digestion of algal biomass and consequent improvement of bioaccessibility/bioavailability in microbial fermentation. *Biotechnol Biofuels* 2013, 6:37.

Jones DT, Woods DR. Acetone-butanol fermentation revisited.*Microbiol Mol Biol Rev* 1986, 50:484-524.

Junier P, Junier T, Podell S, Sims DR, Detter JC, Lykidis A, Han JC, Wigginton NS, Gaasterland T, Bernier-Latmani R. The genome of the gram-positive metal-and sulfate-reducing bacterium *Desulfitomaculum reducens* strain MI-1. *Environ Microbiol* 2010, 12:2738-2754.

Kampmann K, Ratering S, Baumann R, Schmidt M, Zerr W, Schnell S, Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Syst Appl Microbiol* 2012, 35:404-413.

Karakashev D, Batstone JD, Angelidaki I , Influence of environmental conditions in an aerobic biogas reactors. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:331-338.

Karakashev D, Batstone DJ, Trably E, Angelidaki I. Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:5138 -5141.

Kaji M, Taniguchi Y, Matsushita O, Katayama S, Miyata S, Morita S, Okabe A. The *hydA* gene encoding the H_2 evolving hydrogenase of *Clostridium perfingens*: molecular characterization and expression of the gene. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 181:329-336.

Keenan JD. Bioconversion of solar energy to methane. *Energy* 1977, 2:365.

Klipper-Balz R, Schleifer HK. *Streptococcus suis sp. nov., nom. rev. IJSEM* 1987, 37:160-162.

Keshtacher-Lubson E, Hadar Y, Chen Y. Oligotrophic bacteria enhance algal growth under iron – deficient conditions. *Amer Soc Microbiol* 1995, 61:2439-2411.

Kirby B, Le Roes M, Meyers P. *Kribella karoonensis* sp. nov. and *Kribella swartbargensis* sp. nov., isolated from soil from the Western Cape, South Africa. *IJSEM* 2006, 56:1097-1101.

Kessler PS, Blank C, Leigh JA. The *nif* gene operon of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol* 1998, 180:1504-1511.

Kovács E, Wirth R, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL, Biogas production from protein-rich biomass: fed- batch anaerobic fermentation of casein and pig blood and associated changes in microbial community composition. *PlosOne* 2013, 8(10), e77265

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

Kovács KL, Ács N, Kovács E, Wirth R, Rákhely G, Strang O, Herbel Zs, Bagi Z. Improvement of biogas production by bioaugmentation. *BioMed Res. Internat*. 2013 http://dx.doi.org/10.1155/2013/482653.

Krause L, Diaz NN, Edwards RA, Gartemann K-H, Krömeke H, Neuwger H, Pühler A, Runte KJ, Schlüter A, Stoye J, et al. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol* 2008, 136:91-101.

Kröber M, Bekel T, Diaz NN, GoesmannA, Sebastian J**.** Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clonelibrary 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Biotechnol* 2009**,** 142:38-49.

Lakaniemi A-M, Hulatt CJ, Thomas DN, TuovinenOH, Puhakka JA. Biogenic hydrogen and methane production from*Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnol Biofuels* 2011, 4:34.

Lakatos G, et al, Enhanced photo-fermentative hydrogen evolution by *Chlamydomonas reinhardtii* in various algal-bacterial mixed cultures. (Közlés alatt)

Larson H, Price A, Honour P, Boriello S. *Clostridium difficile* and the etology of pseudomembranous colitis. *The Lancet* 1978, 311:1063-1066.

Laurinavichene TV, Federov A, Ghirardi M, Seibert M, Tsyankov AA. Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Int J Hydrogen Energy* 2006, 31:659-667.

Lawson PA, Song Y, Chengxu L, Denise RM, Vaisanen ML, Collins MD, Finegold SM. *Anaerotruncus colihominis* gen. nov. sp. nov. from human feces. *IJSEM* 2004, 54:413-417.

Lazarev VN, Levitskii SA, Basovskii YI, Chukin MM, Akopian TA, Vereshchagin VV, Kostrjukova ES, Kovaleva GY, Kazanov MD, Malko DB, Vitreschak AG, Sernova NV, Gelfand MS, Demina IA, Serebryakova MA, Galyamina MA, Vtyurin NN, Rogov SI, Alexeev DG, Ladygina VG, Govorun VN. Complete genome and proteome of *Acoleplasma laidlawii*. *J Bacteriol* 2011, 193:4943-4953.

Leamon JH, A massively parallel PicoTiterPlate based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis* 2003, 24:3769–3777.

Leclerc M, Delbès C, Moletta R, Godon J-J. Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiol Ecol* 2001, 34:213-220.

Lee C, Kim J, Hwang K, O'Flaherty V, Hwang S. Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treaing different wastewaters. *Water Res* 2009, 43:157-165.

Li A, Chu Y, Wang X, Ren L, Yu J, Liu X, Yan J, Zhang L, Wu S, Li S. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid state biogas biogas reactor. *Biotechnol Biofuels* 2013, 6:3.

Liu W-T, Chan O-C, Fang HHP. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Wat Res* 2002, 36:3203-3210.

Liu Y, Yu P, Song X, Qu J: Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *Int J Hydrogen Energy* 2008, 33:2927-2933.

Liu Y, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann NY Acad Sci* 2008, 1125:171–189.

Liu FH, Wang SB, Zhang JS, Zhang J, Yan X, Zhou HK, Zhao GP, Zhou ZH. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *J Appl Microbiol* 2009, 106:952-966.

Lynd L, Weimer P, van Zyl W, Pretorius I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, 66:506-577.

Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 2002, 148:3521-3530.

M5nr non redundant protein database.

http:/ / blog.metagenomics.anl.gov/ howto/ m5nr-%E2%80%94-the-m5-non-redundant-protein-database/ (2013)

Madigan MT, Martinko JM. Brock biology of microorganisms (11. th. ed.) Person Education Inc. Upper Saddle River, NJ, 2006.

Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sarokin A, Mirkin, Koonin E, Pavlov A, Pavlove N, Karamychev V, Polouchine N, Shokhova V, Grigoriev I, Lon Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:15611-15616.

Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* 2008, 20:133-141.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005, 437:376–380.

Master ER, Mohn WW. Psychrotolerant bacteria isolated from Arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low tempuratures. *App Environ Microbiol*1998, 64:4823-4829.

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

McHugh S, Carton M, Mahony T, O'Flaherty V. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 219:297-304.

McInerney MJ, Briant MP, Hespell RB, Casterton JW. *Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp. nov.*, an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 1981, 41:1029-1039.

McInerney MJ, Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: Biology of Anaerobic Organisms. Ed.: Zhender AJB, New York: John Wiley and Sons, 1988.

McMahon KD, Stroot PG, Mackie RI, Raskin L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions – II: Microbial population dynamics. *Water Res* 2001, 35:1817-1827.

Melis A, Happe T. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol* 2001, 127:740-748.

Menon NK, Chatelus CY, Dervartanian M, Wendt JC, Shanmugam KT, Peck HD, Przybyla AE. Cloning and mutational analysis of the *hub* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *J Bacteriol* 1994, 176:4416-4423.

Metzker ML**.** Sequencing technologies – the next generation. *Nature Rev* 2009, 11:31-44.

Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:386.

Meyer F, Overbeek R, Rodriquez A. FIGfams: yet another set of protein families. *Nucleic Acids Res* 2009, 37:6643-6654.

Miller DH, Lamport DTA. Hydroxyproline heterooligosaccharides in Chlamydomonas. *Science* 1972, 176:918-920.

Miller DN, Byrant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65:4715-4724.

Minas K, McEwan NR, Newbold CJ, Scott KP. Optimization of high throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiol Lett* 2011, 325:162-169.

Mnif S, Zayen A, Karray F, Bru-Adan V, Loukil S, Godon J-J, Chamkha M, Sayadi S, Microbial population changes in anaerobic membrane bioreactor treating landfill leachate monitored by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rDNA gene fragments. *Int Biodet Biodeg* 2012, 73:50-59.

Montero B, García-Morales JL, Solera SR. Analysis of methagenomic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: use of fluorescent *in situ* hybridization. *Waste Management* 2009, 29:1144-1151.

Murray DW, Khan WA, van den Berg L. *Clostridium saccharolyticurn sp*. nov., a saccharolytic species from sewage sludge. *IJSEM* 1982, 32:132-135.

Mussgnug JH, Klassen V, SchlüterA, Kruse O. Microalgae as a substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol* 2010, 150:51-56.

Mutolik S, Vinodkumar CS, Swamy S, Manjappa S. Depolymerization of bagasse by *Ruminococcus albus* in the production of eco-friendly fuel. *Res Biotechnol* 2011, 2:1-6.

Müller V. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69:6345-6353.

Nettmann E, Bergmann I, Pramschüfer S, Mundt K, Plagsties V, Hermann C, Klocke M.Polyphasic analysis of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76:2540-2548.

Nielsen HB, Angelidaki I. Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. *Biores Technol* 2008, 99: 7995-7800.

Nikolaev YA, Plakunov YK, Voronina NA, Nemtseva NV, Platnikov AO, Gogoleva OA, Murav´eva ME, Ovechkina GV. Effect of bacterial sattelites on *Chlamydomonas reinhardtii* in an algo-bacterial community. *Microbiology* 2008, 77:78-83.

Nokaga H, Keresztes G, Shinoda Y, Ikenaga Y, Abe M, Naito K, Inatomi K, Kensuke F, Inui M, Yukawa H. Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195 *J Bacteriol* 2006, 188:2262-2274.

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

Ohara H, Yahata M. α-lactic acid production by *Bacillus sp*. in anaerobic and aerobic culture. *J Ferm Bioeng* 1996, 81:272-274.

Olsson J, Shadiimam MA, Nehrenheim E, Thorin E. Co-digestion of cultivated microalgae and sewage sludge from municipal waste water treatment. *International*

Conference on Applied Energy. ICAE 2013 Jul. 1-4. 2013, Pretoria, South Africa, Paper ID: ICAE2013-518.

Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Diaz N, Chuang H-Y, Cohoon M, de Crécy-Lagard V, Disz T, Edwards R, Fonstein M, Frank ED, Gerdes S, Glass EM, Goesmann A, et. al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* 2005, 33:5691-5702.

Parkin GF, Owen WF. Fundamental of anaerobic-digestion ofwastewater sludge. *J Environ Eng* 1986, 112:867–920.

Passos F, García J, Ferrer I, Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Biores Technol* 2013, 138:79-86.

Passos F, Solé M, García J, Ferrel I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment. *Appl Energy* 2013, 108:168-175.

Pelhate J. Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia Vet. Lat.* 1977, 7:1-16.

Pelletier E, Kreimeyer A, Bocs S, Rouy Z, Gyapay G, Chouari R, Rivière D, Ganesan A, Daegelen P, Sghir A, Cohen GN, Médigue C, Weissenbach J, La Paslier D. *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*: genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *J Bacteriol* 2008, 190:2572-2579.

Pierche E, Xie G, Baradote RD, Saunders E, Hann SC, Detter JC, Richardson P, Brettin TS, Das A, Ljungdahl LG, Ragsdale SW. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environ Microbiol* 2008, 10:2550-2573.

Pop M, Salzberg SL. Bioinformatics challanges of new sequencing technology. *Trends in Genetics*. 2008, 24:142-149.

Price CM. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Reviews* 1993, 7:124-134.

Pukal R, Lapidus A, Nolan M, Copeland A, Glavina Del Rio T, Lucas S, Chen F, Tice H, Cheng J-F, Chertov O, Bruce D, Goodwin L, Kuske C, Brettin T, Detter JC, Han C,

Pitluck S, *et al*. Complete genome sequence of *Slackia heliotrinireducens* type strain (RHS 1). *SIGS* 2009, 1:234-241.

Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood- Ljungdahl pathway of CO_2 fixation. *Rev Biochim Biophys Acta*2008, 1784:1873-1898.

Ramick TL, Fleming HP, McFeeters RF. Anaerobic and aerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in different glucose media. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62:304-307.

Raskin L, Zheng D, Griffin ME, Stroot PG, Misra P. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie von Leeuwenhoek* 1995, 68:297-308.

Rastogi G, Ranade DR, Yeole TY, Patole MS, Houche YS. Investigation of methanogen population structure in biogas reactor by molecular characterization of methyl-coenzyme M reducrase A (*mcrA)* genes. *BioresTechnol* 2008, 99:5317-5326.

Regueiro L, Veiga P, Figueroa M, Alonso-Gutierrez J, Stams AJM, Lema JM, Carballa M. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiol Res* 2012, 167:581-589.

Richmond A. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Sciences Ltd. Oxford, 2004.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Staier RY, Generic assessments, strain hystories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 1979, 111:1-61.

Rodolfi L, Zitteli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. Microalgaeforoil: strainselection, induction of lipidsynthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2009, 102:100-112.

Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011, 475:348-352.

Rother M, Oelgeschläger E. Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* 2008, 190:257-269.

Sabathé F, Bélaïch A, Soucaille P. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett* 2002, 217:15-22.

Sakamato M, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides distasionis Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasionis* gen. nov. comb. nov. *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides mardae* comb. nov. *IJSEM* 2006, 56:1599-1605.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.

Samson, R, Le Duy, A. Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnol Bioeng* 1982., 24:1919.

Sawada H, Kuykendall LD, Young JM. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J GenAppl Microbiol* 2003, 49: 155–79.

Schadt EE, Turner S, KasarksisA. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* 2010, 19:227-240.

Schell MA, Karmrabűntzon M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen M-C, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract.*Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:14422-14427.

Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, 61:262-280.

Schloss PD, Westcott SL, Riabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lewsniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Shal JW, Stres B, Thalinger GG, van Horn DJ, Weber CF**.** Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-spported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75:7534-7541.

Schlüter A, Bekel T, Diaz NN, Dondrup M, Eichenlaub R, Gartemann KH, Krahn I, Krause L, Krömeke H, Kruse O, Mussgnug JH, et al. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analyzed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* 2008**,** 136:77-90.

Schmid-Staiger U, Algae biorefinery – Concept. *National German Workshop on Biorefineries, 15 September 2009, Worms.*

Schmidt, JE, Ahring BK. Effects of hydrogen and formate on the degradation of propionateand butyrate in the rmophilic granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59:2546-2551.

Schulz H, Eder B. Biogázgyártás. Budapest: Cser Kiadó, 2005

Schwarz WH. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, 56:634-649.

Seedorf H, Fricke WF, Veith B, Brüggemann H, Liesegang H, Strittmatter A, Miethke M, Buckel W, Hinderberger J, Li F, Hagemeier C, Thauer RK, Gottschalk G. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:2128-2133.

Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, OhashiA, Harada H. Fluorescencein situ hybridizationusing 16 S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol* 1999**,** 65:1280-1288.

Sharma, YC, SinghB, Upadhyay SN. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel* 2008, 87:2355-2373.

Shin H-S, Yaun J-H, Kim S-H. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy* 2004, 29:1355-1363.

Sialve B, Bernet N, Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol Adv* 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.03.001

Singh A, Nigam PS, Murphy JD. Renewable fuel from algae: An answer to debatable land based fuels. *Biores Technol* 2011, 102:10-16.

Sirohi SK, Pandey N, Singh B, Puniya AK. Rumen methanogens: a review. *Indian J Microbiol* 2010:253-262.

Sildermann N. Maisfeld wird multikulti. *Erneuerbare Energien* 2012, 22:78-81.

Southam G, Kalmakoff ML, Jamell KF, Koval SF, Beveridge TJ. Isolation, characterization and cellular insertion of the flagella from two strains of the archaebacterium *Methanospirillum hungatei*. *J Bacteriol* 1990, 172:3221-3228.

Srivatsan A, Han Y, Peng J, Tehranchi AK, Gibbs R, Wang JD, et al. High-precision, whole-genome sequencing of laboratory strains facilitates genetic studies. *PLoS Gen* 2008, 4:e1000139.

Stainer RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G, Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev.* 1971, 35:171-205.

Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores Technol* 2002, 83:1–11.

Sundberg C, Al-Soud WA, Larsson M, Alm E, Yekta SS, Svenson BH, Sørensen SJ, Karlsson A. 454 pyrosequencing analysis of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol* 2013, 85:612-626.

Supaphol S, Jenkins SN, Intomo P, Waite IS, O'Donnell AG, Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Biores Technol* 2011, 102:4021-4027.

Takeda H. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *J Phycol* 1991, 27:224-232.

Takeda H. Cell wall sugars of some Scenedesmus species. *Phytochemistry* 1996, 42:673-675.

Tang K-H, Yue H, Blankenship RE. Energy metabolism of *Heliobacterium modesticaldum* during phototrophic and chemotrophic growth. *BMC Microbiol* 2010, 10:150-164.

Thauer RK, Hedderich R, Fischer R. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO_2 and H_2. Edited by Ferry JG, Chapman and Hall, New York, London; 1993 pp209-252.

Thauer R, Kaster A, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic Archaea: ecological relevant differences in energy conservation. *Nature Rev Microbiol* 2008, 6:579-589.

Thiele, JH, Zeikus JG. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. *Apl Environ Microbiol* 1988, 54:20-29.

Tjepkema J, Evans HJ. Nitrogen fixation by free-living rizobium in a defined liquid medium. *Biochem Biophys Res Commun*1975, 65:625-628.

Tsygankov AA, Kosourov SN, Tolstygina IV, Ghirardi ML, Seibert M. Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic condition. *Int J Hydrogen Energy* 2006, 31:1574-1584.

Uziel M, Oswald WJ, Golueke CG. Solar energyfixation and conversion with algal-bacterial system. 1974, U.S. National Science FoundationRep. No. NSF-RA-N-74-195, NSF, Washington, D.C.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald FG, Chater FK, van Sinderen D.Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*2007, 71:495-548.

VDI-Richtlinien. VDI 4630. Vergarung organischer stoffe, substrat charakterisierung, probenahme, stoffdatenerhebung, gärversuche. *Verein Deutscher Ingenieure*, 2006. Berlin: Beuth Verlag GmbH. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x

Voelkerding KV. Dames SA, Durchi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinic Chem* 2009, 55:641-658.

Warren RAJ. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50:183-212.

Watanabe K, Takihana N, Aoyagi H, Hanada S, Watanabe Y, Ohmura N, Saiki H, Tanaka H. Symbiotic association in *Chlorella* culture. *FEMS Microbiol Ecol* 2005, 51:187-196.

Wei C, Kunio O, Shoichi S. Intergeneric protoplast fusion between *Fusobacterium varium* and *Enterococcus faecium* for enhancing dehydrodivanillin degradation. *Appl Environ Microbiol* 1987, 53:542-548.

Weiss A, Jérôme V, Freitag R, Mayer HK. Diversity of the resident microbiota in thermophilic municipal biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, 81:163-173.

Winter J. Anaeriobic waste stabilization. *Biotechnol Adv* 1984, 2:75-99.

Wirth R, Kovács E, Maroti G, Bagi Z, Rakhely G, Kovacs KL. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing *Biotech Biofuels* 2012, 5:1-16.

Wolin MJ. Interspecies hydrogen transfer between H_2-producing and methane-producing species. Symposium on microbial production and utilization of gases. Akademie der Wissenschaffen, Göttingen, 1975, 141-150.

Wu M, Ren Q, Durkin AS, Daugherty SC, Brinkac LM, Dobson RJ, Madupu R, Sullivan SA, Kolonay JF, Nelson WC, Tallon LJ, Jones KM, Ulrich LE, Gonzalez JM, Zhullin IB, Robb FT, Eissen JA. Life in hot carbon monoxide: The complete genome sequence of *Carboxydothermus hydrogenoformans*. *PloS Genet* 2005, 1:563-574.

Wuyts J, Peer Y, Winkelmans T, De Wachter R. The European database on small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:183-185.

Xu Y, Murray BE, Weinstock GM. A cluster of genes involved in polysaccharide biosynthesis from *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun* 1998, 9:4313-4323.

Yadvika S, SreekrishnanTR, KohliS, RanaV. Enhancement of biogasproductionfrom solidsubstratesusingdifferent techniques - a review. *BioresTechnol* 2004, 95:1-10.

YamadaY, Yukphan P. Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 2008, 125:15-24.

Ye Q, Roh Y, Caroll SL, Blair B, Zhou J, Zhang CL, Fields MW. Alkaline anaerobic respiration: isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70:5595-5602.

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

Yokoyama H, Moriya M, Ohmori H, Waki M, Ogimo A, Tanaka Y. Community analysis of hydrogen producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, 77:213-222.

Zakrzewski M, Goesmann A, Jeanicke S, Jünemann S, Eikmeyer F, Szczepanowski R, Abu Al-Soid W, Sørensen S, Pühler A, Schlüter A, Profiling of the methabolically active community from a production –scale biogas plant by means of high troughput metatranscriptome sequencing. *J Biotechnol* 2012, 158:248-258.

Zeikus JG. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol Rev* 1977, 41:514-541.

Zhang L, Happe T, Melis A. Biochemical and morphological characterization of sulfure-deprived and H_2- producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* 2002, 21:552-561.

Zhao Y, Boone DR, Mah RA, Boone JE, Xun L. Isolation and characterization of *Methanocorpusculum labreanum* sp. Nov. from LaBrea tar pits. *IJSEM* 1989, 39:10-13.

Zhu C, Zhang J, Tang Y, ZhengakiX, Song R. Diversity of methanogenic archaea in biogas reactor fed with swine faeces as the mono-substrate by *mcrA* analysis. *Microbiol Res* 2011, 166:27-35.

Ziganshin AM, Schmidt T, Scholwin F, II'inskaja ON, Harms H, Kleinsteuber S. Bacteria and archaea involved in anaerobic digestion of distillers grains with solubles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, 89:2039-2052.

Zinder SH, Physiological ecology of methanogens. In: Methanogenesis Ed.: Ferry JG, Chapman and Hall Microbiology Series, 1993.

Zverlov VV, Kellermann J, Schwarz WH. Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics* 2005, 5:3646-3653.

9. Summary of Thesis

Understanding the details of biogas production includes learning about the microorganisms involved in the process and knowledge about their roles allows the development of more efficient and stable systems. Metagenomics –analysis of the total genetic material of the microbial community- is a novel opportunity to expand our knowledge of microbiology of such complex communities. Application of metagenomic methods can lead to the development of more efficient, more economical biogas producing microbial communities.

The majority of modern biogas plants operate with corn silage as a substrate. In the biogas plant simulation experiments the parameters were set to mimic the industrial biogas plants. Applied Biosystems SOLiD next generation sequencer was used for metagenomic investigations, this technique has not been used for similar microbial community studies before. The microbial system in the biogas fermenter was well organized and the various strains seemed to depend on each other. The results established that the members of Firmicutes and Bacteroidetes phyla play important role in the breakdown of cellulosic biomass and secondary fermentation process. Within the Firmicutes phylum the representatives of the *Clostridia* genus are abundant, many of these bacteria possess celullolytic and hydrogen producing capability. Their role in the efficient utilization of cellulose containing biomass is likely significant. In the Archaea domain the Methanomicrobiales order was dominant within this taxonomic group the hydrogenotrophic *Methanoculleus marisnigri* was outstanding in profusion. The results of these studies correlated well with previous metagenom studies carried out by 454 type next generation sequencers using a distinct DNA sequencing technology. Thus of the various next generation sequencing approaches for the investigation of such complex microbial communities was validated and the results appeared reliable and reproducible.

The price of corn silage is constantly increasing and an additional disadvantage is that energetic biomass production competes with food and fed production for the same agricultural land. Alternative biomass sources grown on marginal lands or areas not suitable for agricultural activities, such as photosynthetic microorganisms, offer available alternative for biogas generation. Therefore there is a growing interest in various algae species worldwide, especially in so-called microalgae species.

The use of mixed microalgal-bacterial biomass for biogas production was examined that the spontaneously formed microalga-bacteria mixture developed under non-sterile culture conditions had low C/N (carbon/nitrogen) ratio, which led to a biogas yield lower than that of corn silage although the biogas from microalgae consistently produced higher methane content. The system worked steadily for two mounts, but in microalgae fermentations a non-detriemental ammonium accumulation was observed in time. Cofermentation of microalga mixture and corn silage showed a balanced operation. The metagenomic results revealed that the syntrophic bacteria introduced together with the non-sterile alga biomass displaced or masked the bacterial community of the anaerobic reactors. In the Archaea domain the Methanosarcinales order dominated the utilization of the algal biomass.

*Scenedesmus obliquu*s was cultivated under photoautotrophic conditions. This microalga had higher C/N ratio than the microalgae mixture used in the previous set of experiments. Significant increase of ammonium content was not observed during the fermentation of this biomass. The amount of generated biogas is similar to that of the algae mixture, and the gas composition was similar as well. The semi-continuous steady biogas reactors lasted at least for three months. Because of the *Sc. obliquus* thick cell wall the biogas generating microbes require additional time to digest this biomass. Although there was no biomass input during the last month, a significant amount of biogas was still produced by the alga-fed reactors. Therefore longer retention time is needed for efficient biogas production from microalgae than the conventionally applied retention times based on maize silage fermentation. The methane concentration in the biogas was also high in cofermentation like in the previous set of experiments. These results may be related either to the relative majority of Clostridiales order in cofermentation or to the more balanced C/N ratio of the cofermentation biomass. In the Archaea domain, the Methanosarcinales order dominance was observed, which supported the diversity of metabolic pathways in the process.

Sc. obliquus has a thick and hemicellulose-rich cell wall. Several pretreatment strategies have been tested for cell wall disruption. Repeated heat-thaw treatments, autoclaving and microwave indiced cell wall destruction were tested in our experiments. Autoclaving and the microwave treatment turned out as most effective pretreatment methods although unbroken cells were observed after both treatments under microscope. The disrupted microalgae cell contents were utilized quickly and effectively by the microbial community of the biogas digester, both the biogas quality

and quantity exceed the maize silage control. The effect did not last long as after consuming the easily accessible substances had to degrade the cell wall materials.

According to the data presented the metagenomic approach in the assessment of the biogas producing microbial community have been validated and was proven reproducible. Microalgal biomass was a promising candidate to replace corn silage in the biogas industry, but the alga strain cultivated its pretreatment technology strongly influence the efficiency. The most preferred application seems to be cofermentation with plant biomass.