

Biogáz termelés lignocellulózból gazdag biomasszákból
bioaugmentációval és előkezeléssel

Ph.D. értekezés

Strang Orsolya

Témavezetők:

Prof. Dr. Kovács L. Kornél

Dr. Bagi Zoltán

Biológia Doktori Iskola
Biotechnológiai Tanszék
SZTE TTIK

2020

Szeged

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	8
2	Szakirodalmi áttekintés	11
2.1	Aerob és anaerob energianyerési lehetőségek.....	11
2.2	Történeti áttekintés	12
2.3	Az anaerob fermentáció.....	13
2.3.1	Hidrolízis.....	13
2.3.2	Acidogenezis	16
2.3.3	Acetogenezis	16
2.3.4	Metanogenezis.....	18
2.4	Az anaerob lebontást befolyásoló tényezők	21
2.4.1	Retenciós/tartózkodási idő.....	21
2.4.2	Hőmérséklet.....	21
2.4.3	pH.....	22
2.4.4	Redoxpotenciál (ORP)	23
2.4.5	C/N arány	23
2.4.6	Tápanyagok és nyomelemek	23
2.4.7	Ammónia.....	24
2.4.8	Hidrogén.....	24
2.4.9	Illékony zsírsavak.....	25
2.4.10	Hosszú láncú zsírsavak.....	26
2.5	Lignocellulóz.....	26
2.6	Előkezelés.....	28
2.7	Bioaugmentáció.....	28
2.8	Metagenomika	29
3	Célkitűzés.....	35
4	Anyagok és módszerek.....	36
4.1	Tápoldatok és törzsek.....	36
4.1.1	DSMZ 640 tápoldat (<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>).....	36
4.1.2	DSMZ 61 tápoldat (<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>).....	37
4.1.3	DSMZ 144 tápoldat (<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>).....	37
4.1.4	DSMZ 899 tápoldat (<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>subterraneus</i>)	38
4.1.5	A cellulózbontó mikrobák izolálásához és tenyésztéséhez használt tápoldat	39
4.1.6	DSMZ 520 tápoldat (<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i>):	39
4.1.7	DSMZ 122 tápoldat (<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>):	39
4.1.8	Fiziológias sóoldat:.....	39
4.1.9	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903.....	40

4.1.10	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> DSM 571	40
4.1.11	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>subterraneus</i> DSM 13054	40
4.1.12	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> DSM 2355.....	40
4.1.13	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> DSM 5812	40
4.1.14	<i>Hungateiclostridium thermocellum</i> DSM 1237	40
4.2	A dúsításhoz és biogáz fermentációhoz használt oltóiszapok	40
4.3	Cellulózbontó konzorcium dúsítása és izolálása	40
4.3.1	Első dúsítási lépés	40
4.3.2	Második dúsítási lépés és izolálás	41
4.4	Bioaugmentáció kevert cellulózbontó konzorciumokkal	43
4.5	Kukorica- és napraforgószár fermentációja mezofil és termofil körülmények között	44
4.6	Kukorica- és napraforgószár előkezelésének és bioaugmentációjának összehasonlítása.....	44
4.7	Analitikai módszerek.....	44
4.8	Enzimaktivitás mérés	45
4.9	DNS izolálás.....	46
4.10	Újgenerációs DNS szekvenálás.....	46
4.11	Statisztikai analízis	47
5	Eredmények és értékelésük	48
5.1	Cellulózbontó termofil konzorcium dúsítása.....	48
5.2	Metagenom analízis.....	55
5.2.1	Az Ion Torrent szekvenálás és kiértékelése MG-RAST programcsomaggal (2014).....	56
5.2.2	AD1 és AD2 cellulózbontó konzorciumok stabilitásának ellenőrzése, újraszekvenálása, read-alapon végzett metagenomikai elemzése	60
5.2.3	A szekvenálási adatok genom-alapon végzett kiértékelése.....	66
5.3	Kukorica- és napraforgószár fermentációja mezofil és termofil hőmérsékleten	74
5.4	Bioaugmentáció és előkezelés hatásának összehasonlítása: <i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> 76	
5.5	Bioaugmentáció és előkezelés hatásának összehasonlítása: <i>Hungateiclostridium thermocellum</i>	77
5.6	Az AD1 és AD2 kevert kultúrák bioaugmentációs hatása	79
5.7	Eredmények jelentősége.....	84
5.8	Összefoglalás.....	86
6	Köszönetnyilvánítás	88
7	Irodalomjegyzék.....	89
8	Összefoglaló	106
9	Summary	110

Ábrajegyzék

1. ábra. Az anaerob fermentáció lépései (Kougias & Angelidaki, 2018) nyomán	13
2. ábra. A lignocellulóz szerkezete (Lee et al., 2014).....	27
3. ábra. A dúsítás és izolálás folyamatábrája	43
4. ábra. A dúsítási, izolálási és bioaugmentációs kísérletek folyamatábrája.....	43
5. ábra A-F. VFA koncentrációk (A - ecetsav, B - propionsav, C - izovajsav, D - vajsav, E - izovaleriánsav, F - összes szerves sav) változása az első dúsítási lépés alatt, glükóz (kék oszlop) vagy α -cellulóz (zöld oszlop) szubsztrát esetén. Az értékek három párhuzamos minta átlagai és a hibásávok a sztenderd szórást jelzik.	49
6. ábra. pH változás glükóz (kék, szaggatott vonal) illetve cellulóz (zöld, folytonos vonal) szénforrás esetén. A heti szubsztrát bevitelt fokozatosan 10 g/L-re növeltem a 10. hétig, utána visszacsökkentettem 6 g/L/hétre.	50
7. ábra. β -glükozidáz enzim aktivitás változás a cellulóz adaptáció alatt (♦). Növekvő aktivitást figyelhetünk meg a magasabb szubsztrát felhasználás esetén és az aktivitás csökkenését láthatjuk az alacsonyabb vagy hiányzó szubsztrát terhelés (piros oszlop) alatt.	50
8. ábra. A cellulóz (zöld) és glükóz (kék) fermentáció biogáz hozamai: 304 ± 26 mL, illetve 276 ± 2 mL/g VS ($p > 0,05$)	51
9. ábra A-B. Az ecetsav (A) és propionsav (B) mennyiségének változása a második dúsítási lépésben, adaptált (kék), adaptált+Ca. saccharolyticus (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+Ca. saccharolyticus (lila).	53
10. ábra. pH változás a második dúsítási folyamat során, adaptált (kék), adaptált+Ca. saccharolyticus (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+Ca. saccharolyticus (lila).	54
11. ábra. Biogáz termelés a második dúsítási szakaszban. Az első szakaszból származó dúsított oltóiszap Ca. saccharolyticus nélkül (kék) 463 ± 4 , és Ca. saccharolyticus-szal (sárga) 482 ± 11 , összehasonlítva a nem adaptált iszappal (zöld) 412 ± 25 és a nem adaptált iszap Ca. saccharolyticus-szal kiegészítve (lila) 456 ± 21 mL/g VS. ($p \leq 0,2$)	54
12. ábra. Exoglükánáz enzimaktivitás, adaptált (kék), adaptált+Ca. saccharolyticus (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+Ca. saccharolyticus (lila).	55
13. ábra. β -glükozidáz enzimaktivitás, adaptált (kék), adaptált+Ca. saccharolyticus (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+Ca. saccharolyticus (lila).	55
14. ábra. A legmeghatározóbb törzsek és a hozzájuk köthető DNS szekvenciák abundanciájának %-os értéke AD1-ben és AD2-ben a szekvenálás és kiértékelés alapján.	58
15. ábra. Az AD1 és AD2-t felépítő rendek aránya abundancia %-ban	62
16. ábra. AD1 és AD2 legabundánsabb 5 faja a Kraken kiértékelés alapján.	63
17. ábra. A kapott binek előfordulása az egyes mintákban. Az ábra belsejében látható egy dendrogram (amely a contigok csoportosítását mutatja), a belső körben látható a contigok hossza, GC tartalma, majd kifelé haladva a minták, illetve az automata és manuális binelés eredményei.	69
18. ábra. Napraforgó- és kukoricaszár kumulatív metánkihozatala mezofil és termofil hőmérsékleten. 181 ± 8 , 170 ± 3 , 257 ± 7 , 194 ± 6 , 235 ± 3 , 242 ± 3 mL/g VS (azonos szubsztrátnál $p > 0,05$, eltérő szubsztrát esetén $p < 0,05$).	74
19. ábra. Napraforgó- és kukoricaszár fermentációjának bioaugmentációja és előkezelése R. cellulolyticummal. Kukoricaszár (kék, szaggatott vonal) 294 ± 2 , R. cellulolyticum bioaugmentált kukoricaszár (világoskék) 313 ± 7 , R. cellulolyticum előkezelt kukoricaszár (sötétkék) 321 ± 5 , napraforgószár (zöld, szaggatott vonal) 216 ± 5 , R. cellulolyticum bioaugmentált napraforgószár (zöld) 236 ± 0 , R. cellulolyticum előkezelt napraforgószár (sötétzöld) 242 ± 8 , α -cellulóz (piros, szaggatott vonal)	

368±17 mL/g VS ($p>0,05$ a bioaugmentáció és előkezelés között, $p<0,05$ a csak biomasszát tartalmazó és kezelt fermentorok esetén).....	77
20. ábra. Napraforgó- és kukoricaszár fermentációjának bioaugmentációja és előkezelése <i>H. thermocellum</i> -mal. Kukoricaszár (kék, szaggatott vonal) 317±21, <i>H. thermocellum</i> bioaugmentált kukoricaszár (kék) 342±14, <i>H. thermocellum</i> előkezelt kukoricaszár (sötétkék) 354±18, napraforgószár (zöld, szaggatott vonal) 206±19, <i>H. thermocellum</i> bioaugmentált napraforgószár (zöld) 260±25, <i>H. thermocellum</i> előkezelt napraforgószár (sötétzöld) 250±26, α -cellulóz (piros, szaggatott vonal) 375±10 mL/g VS. A két lépcsős görbéért az oltóiszap tehető felelőssé. A benne található mikrobáknak több időre volt szükségük, hogy alkalmazkodjanak a körülményekhez ($p>0,05$ a bioaugmentáció és előkezelés között, $p<0,05$ a csak biomasszát tartalmazó és kezelt fermentorok esetén).	78
21. ábra. AD1 (kék) 167±6 és AD2 (lila) 164±17 augmentációs hatása a biogáz fermentációra a kontroll kukoricaszárhoz (piros) 134±11 mL/g VS hasonlítva. Számos esetben a hibasávok (standard szórás) kisebbek, mint a szimbólumok (három párhuzamos minta középértéke). ($p<0,05$).....	80
22. ábra: AD1 és AD2 bioaugmentációs hatásai. A kék oszlopok jelzik az AD1 kumulatív metánhozamait, a lila oszlopok az AD2-höz tartozó értékek, a piros oszlopok pedig az adott szubsztrátból bioaugmentáció nélkül keletkező értékek ($p<0,05$).....	81
23. ábra. AD1 (kék) 172±9, AD2 (sötétlila) 171±8, <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> (lila négyzet, szaggatott vonal) 134±2, <i>Caldanaerobacter subterraneus</i> (zöld) 153±7, <i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> (magenta) 152±17, <i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> (narancssárga háromszög) 140±6 és a keverékük (kék, szaggatott vonal) 154±10 hatása a nem augmentált kukoricaszárhoz (piros, szaggatott vonal) 138±37 mL/g VS hasonlítva. A szimbólumok három párhuzamos minta átlag értékét ábrázolják és a hibasávok a standard szórást jelzik; $p<0,05$ kivéve a <i>T. thermosaccharolyticum</i> és <i>R. cellulolyticum</i> esetén.	83
1. táblázat. Felhasznált törzsek és tápoldatok.....	36
2. táblázat. A fermentációkhoz használt oltóiszap paraméterei a második dúsítási lépés kezdete előtt. VOA - illékony szerves sav koncentráció, TAC - pufferkapacitás, TS - szárazanyag tartalom, VS - szerves széntartalom.....	52
3. táblázat. Az első szekvenálás után kapott contigok és readok száma és átlagos mérete	56
4. táblázat. Az AD1 és AD2 közösség legnagyobb mennyiségben jelenlevő tagjai közötti hasonlóságok és különbségek, szürkével jelöltem azokat a fajokat, amelyek jelen vannak az egyik konzorciumban, a másiktól viszont hiányoznak.	57
5. táblázat. A második szekvenálás után kapott contigok és readok száma és átlagos mérete.....	61
6. táblázat. Genom alapú és read alapú vizsgálatok erősségei és gyengeségei	66
7. táblázat. A sikeresen összeillesztett binek	67
8. táblázat. Az egyes binekben előforduló cellulóz és hemicellulóz bontásra utaló szénhidrát bontó enzimek, GH - glikozid hidroláz, CE - szénhidrát észteráz (sárga: hemicelluláz aktivitás, zöld: celluláz és hemicelluláz aktivitás).....	71
9. táblázat. Napraforgó- és kukoricaszár kémiai összetétele: a (Monlau et al., 2012) b (Monlau et al., 2015), c (Sawatdeenarunat et al., 2015), d (Croce et al., , 2016), e - % nedves tömeg, f - % VS, g - % TS, h - Klason lignin, i - savdetergens lignin	74
10. táblázat. 19. ábra-20. ábra- metánhozam értékei (zárójelben az α -cellulózból keletkezett metánhozamhoz viszonyított százalékos értékek vannak).	79
11. táblázat. Termofil lignocellulóz-bontó kevert kultúrák és a publikált bioaugmentációs képességük.	82
12. táblázat. Kukorica és napraforgó termesztése során keletkező hulladék mennyisége, metán potenciálja és energia tartalma 2012-2016 között Magyarországon, Európában és a világon (FAOSTAT).....	85

Rövidítések jegyzéke

AD - Anaerobic decomposition - anaerob lebontás

ADP - Adenozin-difoszfát

ATP - Adenozin-trifoszfát

CAZy - Carbohydrate-active enzyme - szénhidrát szintetizáló vagy bontó enzim

CBM - Carbohydrate-binding module – szénhidrát kötő modul

CE - Carbohydrate esterase - szénhidrát észteráz

CTAB - Cetil-trimetil-ammónium-bromid

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

EC - Enzyme commission number - enzim azonosító szám

GH - Glycoside hydrolase - Glikozid hidroláz

GWh - Gigawatt-hour - gigawattóra (10^9 wattóra)

HPLC - High performance liquid chromatography - nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

kWh - kilowatt-hour - kilowattóra (10^3 wattóra)

MJ - Megajoule - (10^6 J)

ORP - Oxidation reduction potential - redox potenciál

pNPC - 4-nitrofenil- β -D-cellobiozid

pNPG - 4-nitrofenil- β -D-glükopiranozid

SAO - Syntrophic acetate-oxidizing - szintrófikus acetát oxidálók

TAC - Total anorganic carbon - pufferkapacitás

TCD - Thermal conductivity detector - hővezetőképességi detektor

TS - Total solids - szárazanyag tartalom

TWh - Terawatt-hour - terawattóra (10^{12} wattóra)

v/v% - tömegszázalék

VFA - Volatile fatty acid - illékony zsírsav

VOA - Volatile organic acid - illékony szerves sav

VS - Volatile solids - szerves szárazanyag tartalom

1 Bevezetés

Az életszínvonalunk erősen függ az energiától, az energiaválságnak komoly hatása van a globális gazdaságra is. Az első krízis az 1970-es években volt, az 1973-as olajválság hatására a kőolaj hordónkénti ára rövid idő alatt négyszeresére emelkedett, 3 \$-ról 12 \$-ra. 1979-ben következett a második olajválság. 2008-ban érte el az olaj a mindenkori legmagasabb hordónkénti árát (147 \$). Az utóbbi években, az energiaéhség világszerte gyorsan növekedett a növekvő népesség és jómód eredményeként. 1990 és 2016 között több mint kétszeresére emelkedett a világ energia fogyasztása, 10 901,84 TWh-ról 23 106,86 TWh-ra (IEA – International Energy Agency World Energy Balances 2018 - (<https://webstore.iea.org/world-energy-balances-2018>,”)). A világ teljes energiaigényének nagy részét (több mint 84%) a fosszilis energiahordozókból elégítjük ki, ilyen a szén, kőolaj és földgáz. Ezeknek korlátozottak a kitermelhető készleteik és káros hatással vannak a környezetre, mivel felhasználásuk során üvegházhatású gázokat és légszennyező anyagokat (például szén-dioxid, kén-dioxid, nitrogén-oxidok, policiklikus aromás szénhidrogének, higany, finom szemcséjű szálló por) juttatunk a légkörbe (Perera, 2018; Sawatdeenarunat et al., 2015).

Megoldást jelenthet az atomenergia és megújuló energiahordozók használata. 2016-ban az EU-ban az atomerőművek által termelt elektromos áram körülbelül a teljes termelés 26%-át tette ki. A nukleáris energia az az energia, amelyet a részecskék atommagjai tartalmaznak, ezt két különböző fizikai folyamattal lehet felszabadítani: maghasadással és magfúzióval. A maghasadás exoterm folyamat, a nehéz atommagok hasítása során felszabaduló hőt hasznosíthatjuk áramtermelésre, amit az 1950-es évek óta használunk. Az eljárás nyersanyagként főként az urán ^{235}U izotópját alkalmazza. A magfúzió az a folyamat, ahol két könnyű atommag egyesül és létrehoz egy közös magot, ezáltal szintén nagy mennyiségű hőenergia szabadul fel. Ilyen folyamat játszódik le a Napban is. A nukleáris energia az üvegházhatás szempontjából „tisztá” energia és fontos alapot jelenthet az energiabiztonság számára. Azonban a véletlenszerűen bekövetkező nukleáris katasztrófák (Csernobil, Fukushima) a technológia alkalmazásának gyenge pontjai és a radioaktív nukleáris hulladék hosszútávú tárolási módszere nem megnyugtatóan megoldott (Jin & Kim, 2018). A megújuló energiahordozók (geotermikus energia, vízenergia, napenergia, szélenergia és biomassza) végső forrása a Nap. Alkalmas technológiákkal ezeket a természeti erőforrásokat elektromos árammá, hővé és üzemanyaggá lehet alakítani. A megújuló energiahordozók a jelenlegi globális energiaszükséglet háromezerszereséről lennének képesek gondoskodni. A megújuló energiából származó elektromos áramtermelés 2010 és 2035 között várhatóan a 2,7-szeresére nő. A

bioüzemanyag fogyasztás az előrejelzések szerint több mint háromszorosára emelkedik ugyanezen idő alatt. A hőhasznosítás várhatóan majdnem a duplájára emelkedik (Ellabban et al., 2014). A számok biztatónak tűnnek, bár a lehetőségek kicsiny töredékének kihasználását jelentik. A vízenergia jelenleg a technológiailag legfejlettebb, gazdasági szempontból legjobban megvalósítható típusa a tiszta energiának – ahol a földrajzi adottságok erre alkalmasak. A világ teoretikus vízenergia tartalékát 39 000 TWh/év becsülik, amelyből 16 000 TWh-t lehetne ténylegesen kihasználni. A szélenergia hasznosítása az utóbbi években egyre gazdaságosabbá vált. A világ szélenergia forrása hatalmas, a teoretikus értékét 2 000 000 TWh/év-re becsülik, amely egyenlőtlenül oszlik el. Európa elméleti szélenergia kapacitását 150 000 TWh/év-re becsülik, amely főként az északi országokban, például Dániában és Norvégiában található (Liu, 2015).

A közvetlenül hasznosítható napenergia mennyiségét egy adott helyen két fontos tényező határozza meg. Az egyik a napfény beesési szöge, a másik a légköri szóródás. A napenergia közvetlen átalakításának három fő típusa van a fotovoltai, fototermális és a biológiai fotoszintézis. A geotermikus energia általános kifejezés a földkéregben lévő hőenergiára, amelynek több megjelenési formája van, mint a meleg víz, gőz, kőzetnyomás, meleg száraz kőzet és láva. Becslések szerint a hasznosítható geotermikus energia világszinten 5 milliárd tonna szénnel egyenértékű (33 000 TWh). A biomassza alapú energia főleg mezőgazdasági, erdészeti, lakossági és ipari hulladékból, illetve energia növényekből és energia erdőkből származik. A biomasszát főként hő- és energiatermelésre, valamint bioüzemanyagok előállítására használjuk. A világ teoretikus biomassza energia potenciálja éves szinten 37,6-51,2 milliárd tonna szénnel egyenértékű, ebből a tényleges potenciál 6,8-17 milliárd tonna szénnel egyenértékű (45 000-113 000 TWh) (Liu, 2015).

Világszerte majdnem minden ország érdekelt az új, tiszta és megújuló energia utánpótlás keresésében. Az elmúlt évtizedekben a kutatási törekvések főként a biodízelre és bioetanolra összpontosítottak, a biogáz kevesebb figyelmet kapott. Az első generációs bioüzemanyagok élelmiszernövényekből készülnek, mint például a kukorica, cukornád, pálmaolaj, és lehetséges alternatívának tűntek a világ benzin és dízel függőségének enyhítésére. Azonban, közvetve az élelmiszer árak növekedését okozták és így hozzájárultak a globális élelmiszerválsághoz. Az első generációs biomassza termelés további hátránya a termeléssel összefüggő biodiverzitás csökkenés és természetkárosítás, amelyet az újabb területek mezőgazdasági termelésbe történő bevonása eredményez. Ezért a második generációs bioüzemanyagok előállítása, ahol lehetőleg az egész biomasszát átalakítjuk, elengedhetetlen a

fenntartható, megújuló energia részarányának növeléséhez (Guo et al., 2010). Az utóbbi időben a lignocellulóz tartalmú biomassza, főleg a mezőgazdasági hulladékok és melléktermékek, egyre több figyelmet kapnak energia és különféle termékek előállítására. Eltérően az első generációs bioüzemanyagok nyersanyagától (cukor, keményítő, olaj), a lignocellulóz tartalmú biomassza nem versenyez közvetlenül az élelmiszer vagy takarmány előállítással. Ráadásul magas biomassza hozam érhető el még alacsony energia, víz, műtrágya és rovarirtó szer ráfordítással is, amely szintén ideálissá teszi ezeket az alapanyagokat a bioenergia termelésre (Sawatdeenarunat et al., 2015). A szakirodalomban előforduló értékek tág határok között mozognak a keletkező biomassza mennyiségét illetően; ezek az eltérések a különböző számítási módokból erednek. A különböző szakirodalmi források alapján globálisan körülbelül 70-100 gigatonna szenet alakítanak át évente a fotoszintetizáló élőlények szerves anyagokká (Field et al., 1998; Lebuhn et al., 2014). Más becslések alapján globálisan évi 50-200 gigatonna száraz biomassza keletkezik, ennek nagyjából tizedét tudjuk hasznosítani (Kuhad & Singh, 1993; Saini et al., 2015). A lignocellulóz tartalmú biomassza elsődlegesen cellulózból, hemicellulózból és ligninből áll, és ezek együttesen egy nagyon komplex szerkezetet hoznak létre. A lignocellulóz hidrolízise gyakran válik a sebességhatározó lépéssé a hasznosítása során (Sawatdeenarunat et al., 2015).

A biogáz, amely a megújuló nyersanyagok anaerob lebontása során keletkezik, az egyik nagyon ígéretes alternatívája lehet a fosszilis eredetű energiahordozóknak. A növényi anyagból előállított metánban lévő energia a fotoszintézis során megkötött és mikroorganizmusok által biogázzá átalakított napenergia. Az így keletkező metán ezért szén-dioxid neutrálisnak tekinthető. A biogáz főként metánból (55–70%) és szén-dioxidból (30–45%) áll (Tsavkelova et al., 2012). Az anaerob fermentáció folyamán, egy komplex, baktériumokat, gombákat és metanogén archeákat tartalmazó mikrobiális közösség a szerves anyagokat több egymást követő lépésben biogázzá alakítja. Ezeket részletesen a 2. fejezet tárgyalja.

A biológiai úton termelődő és a légkörbe jutó metán negatívan hat a környezetre mivel üvegházhatása (infravörös abszorpciókoefficiense) 23-28-szorosa a szén-dioxidénak (Huang et al., 2013). De ha kontrollált, zárt körülmények között állítjuk elő akkor kiváló energiahordozó. A biogázból tisztított biometán betáplálható a földgázhálózatba, sűrítve vagy cseppfolyósítva pedig üzemanyagként hasznosítható (Holmes & Smith, 2016) minden olyan területen, ahol ma fosszilis földgázt használunk.

2 Szakirodalmi áttekintés

2.1 Aerob és anaerob energianyerési lehetőségek

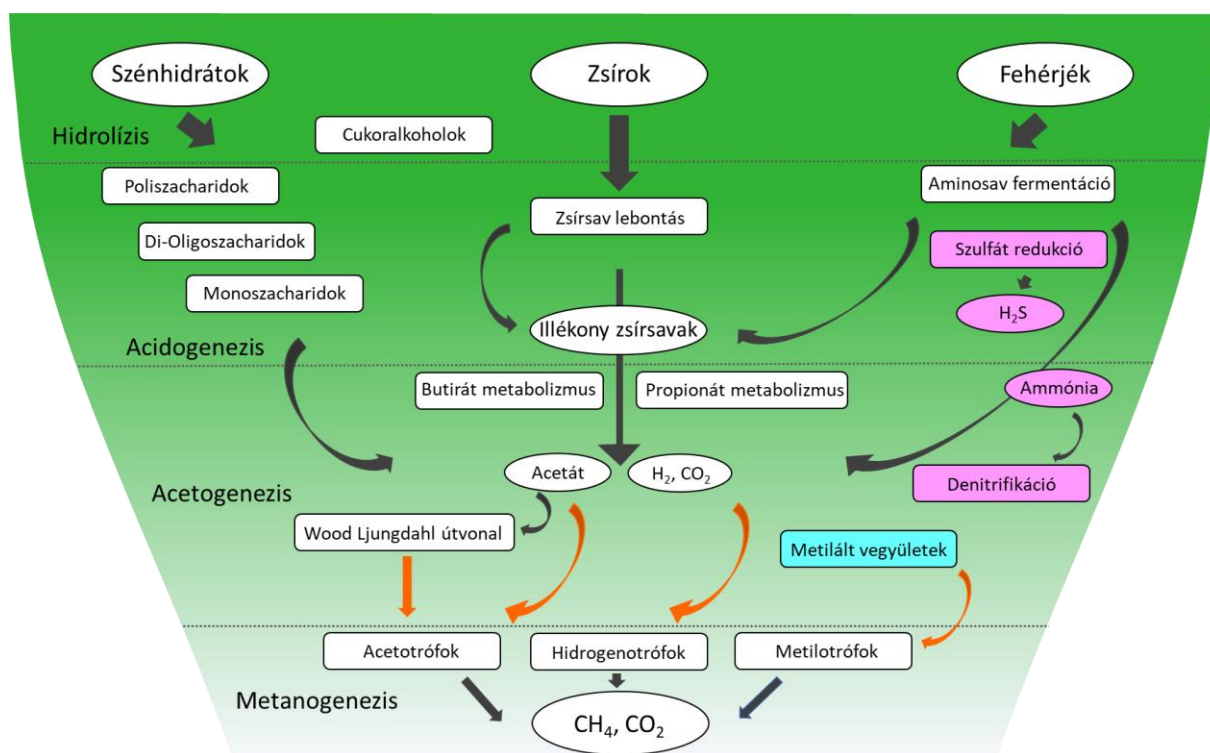
Aerob légzés során az oxigén a végső elektronakceptor. Oxigén hiányában vagy fermentáció, vagy úgynevezett anaerob légzés történik. A fermentáció során főleg különböző szerves vegyületek szolgálnak elektronakceptorként. A lebontási folyamat termékei elsősorban különböző savak és alkoholok, valamint hidrogén és szén-dioxid. Az anaerob légzés folyamatában az elektronakceptorok elsősorban szerves vegyületek. Ilyen lehet szulfát (SO_4^{2-}), vas (Fe^{3+}), mangán (Mn^{4+}), nitrát (NO_3^-) és szén-dioxid (CO_2). Néhány elektronakceptor sokkal előnyösebb a többinél, mert nagyobb energiatermelést tesz lehetővé, a következő sorrendben: $\text{O}_2 > \text{NO}_3^- > \text{Mn}^{4+} > \text{Fe}^{3+} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_2$, ahol az oxigén adja a legtöbb energiát és a szén-dioxid a legkevesebbet. Mindez azt jelenti, hogy az anaerob biogáz reaktorban a mikroorganizmusok kevesebb energiához jutnak és így viszonylag kevés biomasszát képeznek. Ezzel szemben az aerob komposztban élő mikroorganizmusok, amelyek elektronakceptorként az O_2 -t használják, a szubsztrát molekulákat képesek teljesen eloxidálni és a bennük levő kémiai energiát felszabadítani (Schnürer & Jarvis, 2018). Jellemzően az anaerobok sejthozama 0,02-0,2 g sejt/g szubsztrát, ellentétben az aerob mikroorganizmusokkal, amelyeknek sokkal nagyobb a hozama (0,4-0,7 g sejt/g szubsztrát). Az anaerobok a részlegesen lebontott szubsztrát molekulában maradó energiát redukált termékek formájában konzerválják, mint a metán, etanol, hidrogén és illékony zsírsavak (Angelidaki et al., 2011). A jelen lévő elektronakceptorok számát és koncentrációjukat a szubsztrát eredete és összetétele határozza meg. Ez azt jelenti, hogy a metanogének versenyhátrányba kerülhetnek, ami a metántermelés csökkenéséhez vezethet. Például a szulfátot (SO_4^{2-}) a szulfát redukáló baktériumok használják fel és kénhidrogént (H_2S) állítanak elő. Ha nagy mennyiségű szulfát kerül a biogáz fermentorba, a biogáznak magas lesz a kénhidrogén tartalma, ami korrozív és a gázmotort tönkreteszi (Schnürer & Jarvis, 2018). A hexózok metánná és szén-dioxiddá alakítása csak az energia 15%-át szabadítja fel. Ez a gyenge hatásfokú energianyerés a mikroorganizmusokat összefogásra, nagyon hatékony együttműködésre készíti. A szintrófia két különböző mikroba együttműködése olyan szubsztrát lebontásában, és energetikai hasznosításában, amelyet önmagukban nem képesek degradálni. Ez egy nagymértékben mutualista társulás, termodinamikailag egymástól függő életstílus, ahol a partnerek egymás túlélését segítik. A fajok közötti elektrontranszfer és az elektronhordozók koncentrációja a rendszerben kritikus a kooperatív metabolikus aktivitás fenntartása szempontjából (Leng et al., 2018).

2.2 Történeti áttekintés

A biogáz létezéséről régóta tud az emberiség. A biogázzal kapcsolatos első utalás Pliniustól származik, aki titokzatos lángokra utal, amelyek a mocsárban és egyéb felszín alatti helyeken jelennek meg. Azokban az időkben ezeket a megfigyeléseket nem tudták értelmezni (van Brakel, 1980). Anekdotikus bizonyítékok arra utalnak, hogy Asszíriában az i.e. 10. században a fürdők vizének melegítésre használták a biogázt (Bond & Templeton, 2011). Az első kísérletet a biogáz jellemzésére az olasz fizikus és kémikus Alessandro Volta tette 1777-ben, aki kimutatta, hogy az éghető gáz a Maggiore-tó iszapjából származott. Cruikshank 1801-ben bizonyította, hogy a gáz nem tartalmaz oxigént, végül Dalton 1804-ben megállapította a metán helyes képletét (van Brakel, 1980). Az első, aki bebizonyította, hogy a metán mikrobiológiai folyamatból származik, Béchamp volt 1868-ban (Barker, 1956). Röviddel utána, megállapították, hogy szerves savak képződnek köztiterméként. A huszadik század kezdetén, pontosabban 1906-ban, Omelianski és a holland mikrobiológus Söhngen kimutatta, hogy metántermelő baktériumok közvetlenül hasznosítani tudják a cellulóz fermentáció termékeit (pl. formiát, acetát, hidrogén és szén-dioxid). Söhngen 1910-es, dúsított kultúrákkal végzett kísérletei a hidrogenotróf metanogenezis sztöchiometrikus egyenletének kikövetkeztetésével zárultak (Barker, 1956). 1933-ban Buswell és Boruff megalkotta az elméleti metán potenciál számításának egyenletét (Buswell & Boruff, 1933). Az első metántermelő mikroorganizmusokat 1936-ban izolálták, amelyek a *Methanobacillus omelianskii*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkerii* és *Methanococcus vannielli* voltak (Barker, 1956). 1860-ban bevezették a szennyvízülepítő akna használatát a szennyvíz stabilizálása érdekében. 1890-ben egy Donald Cameron által tervezett szennyvízülepítő aknából a termelődött biogázt összegyűjtötték és utcai világításhoz használták Exeter városában, Angliában (Hobson et al., 1974). Az első biogáz üzemet egy lepratelepen építették 1859-ben Mumbaiban (Bombay), Indiában (Meynell, 1978). Kínában a biogáz kereskedelmi használata Guorui Luonak tulajdonítható, aki 1921-ben egy 8 m³ biogáz tartályt épített, amelyet háztartási hulladékkal tápláltak, hogy energiával lássa el a házat főzéshez és világításhoz (He, 2010). Ugyanebben az időszakban kezdődött a biogáz ipari hasznosítása a nyugati világban. Az első szennyvíztisztító telep 1920-ban, Németországban táplált biogázt a gázhálózatba (Bond & Templeton, 2011). A biogáz ipar fellendülése az 1970-es években történt, a magas olajár arra ösztönözte a kutatókat, hogy új, alternatív energiahordozókat találjanak. A kilencvenes évektől a klímaváltozás és a megújuló energia fontossága globálisan is előtérbe került (Kougias & Angelidaki, 2018).

2.3 Az anaerob fermentáció

Az anaerob lebontás egy összetett biológiai folyamat, ami szigorúan anaerob körülményeket igényel (redox potenciál (ORP) < -200 mV) (Appels et al., 2008). A biogáz képződés folyamatát négy szakaszra oszthatjuk: hidrolízis, acidogenezis, acetogenezis és metanogenezis (1. ábra). Az egyes lebontási lépéseket különböző mikroorganizmus csoportok végzik, amelyek részben szintrofikus kapcsolatban állnak és eltérő környezeti igényekkel rendelkeznek (Angelidaki, et al., 1993). A továbbiakban az egyes szakaszokról rendelkezésre álló fontosabb ismereteket részletesebben mutatom be.



1. ábra. Az anaerob fermentáció lépései (Kougias & Angelidaki, 2018) nyomán

2.3.1 Hidrolízis

Az anaerob lebontás során általában az első lépést, a hidrolízist tekintik az egyik sebességhatározó lépésnek. Hidrolízis alatt a nem oldható szerves anyagok és nagy molekulatömegű vegyületek (zsírok, poliszacharidok, fehérjék és nukleinsavak) vízben oldható szerves vegyületekre bomlanak (Appels et al., 2008) hidrolitikus mikroorganizmusok extracelluláris enzimjei segítségével. A katalizált kémiai reakcióban a kovalens kötések felhasadnak egy vízmolekula beépülése közben (Chandra et al., 2012). A fehérjék, zsírok és szénhidrát polimerek aminosavakká, hosszú láncú zsírsavakká és cukrokká hidrolizálódnak (Li et al., 2011). A résztvevő baktériumok obligát vagy fakultatív anaerobok (Merlin Christy et al., 2014). A fakultatív anaerob mikroorganizmusok felhasználják a vízben oldott oxigént, így

biztosítva az obligát anaerob mikroorganizmusok számára szükséges alacsony redoxpotenciált (Gerardi, 2003). Anaerob hidrolitikus baktériumok a *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres*, *Spirochaetes* és *Thermotogae* törzsekben találhatóak. Az anaerob lebontó rendszerben a kísérletes munkám szempontjából kiemelkedően fontos lignocellulóz tartalmú biomasszát bontó baktériumok többnyire a *Firmicutes* és *Bacteroidetes* törzsekbe tartoznak. A cukor monomerek közötti kötéseket hidrolizáló enzimek kiterjedt családját glikozid hidrolázok (GH) gyűjtőnéven szokás emlegetni, amelyek csoportjait 1-3 jegyű számokkal jelöli a Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) adatbázis ("www.cazy.org,"), ezen belül a cellulóz és hemicellulóz hidrolízisét celluláz és hemicelluláz enzimek katalizálják. Az anaerob cellulolitikus baktériumok egy része a hatékonyabb lebontás érdekében hozzátapad a szubsztrátjához az ún. celluloszómával, amely egy nagy multienzim komplex. Celluloszómát főként a *Clostridiales* rendbe tartozó anaerob baktériumok (például *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans*) és *Ruminococcus* fajok, valamint a *Neocallimastix*, *Piromyces* és *Orpinomyces* nemzetségbe tartozó anaerob gombák használnak (Shrestha et al., 2017). A cellulózbontó enzimek az enzimaktivitásuk alapján három csoportba sorolhatók: endoglükánázok vagy 1,4- β -D-glükán-4-glükánohidrolázok (EC 3.2.1.4), exoglükánázok, beleértve az 1,4- β -D-glükán glükánohidrolázokat (cellodextrinázoknak is nevezik őket) (EC 3.2.1.74) és 1,4- β -D-glükán cellobiohidrolázokat (cellobiohidrolázok) (EC 3.2.1.91) és β -glükozidázok vagy β -glükozid glükohidrolázok (EC 3.2.1.21). Az endoglükánázok a cellulóz poliszacharid lánc belső, amorf régióit hasítják random módon, különböző hosszúságú oligoszacharidokat és következésképp új láncvégeket hoznak létre. Az exoglükánázok a cellulóz lánc redukáló vagy nem redukáló végéről hasítanak le glükózt, vagy cellobiózt. A β -glükozidázok az oldható cellodextrineket és cellobiózt hidrolizálják glükózzá. A cellulóz oldhatatlan, bontásnak ellenálló természete kihívást jelent a celluláz rendszerek számára. A legtöbb celluloszóma általános tulajdonsága, hogy moduláris a szerkezete, amely gyakran tartalmaz katalitikus és szénhidrát kötő modulokat (carbohydrate-binding modules - CBMs). A CBM megvalósítja a kapcsolódást a cellulóz felszínhez, hogy a katalitikus domént közel hozza a szubsztráthoz. A CBM-k jelenléte különösen fontos az exoglükánázok megfelelő működéséhez. A celluláz rendszerek magasabb együttes enzimaktivitást mutatnak, mint az enzimek egyéni aktivitásának összege, ezt a jelenséget szinergizmusnak nevezzük. A szinergizmus négy formája ismert: endo-exo szinergia az endoglükánázok és exoglükánázok között, exo-exo szinergia a cellulóz lánc redukáló és nem redukáló végéről hasító exoglükánázok között, szinergia az exoglükánázok és β -glükozidázok között, amelyek eltávolítják a cellobiózt (és cellodextrineket) az első két enzim végtermékét, és az

intramolekuláris szinergia a katalitikus és szénhidrát kötő domén között (Lynd et al., 2002). Az endoglükánázok az 5-9, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 és 128 GH családba vannak besorolva. Az exoglükánázok az 5-7 és 48 GH családban, β -glükozidázok az 1, 3, 4, 5, 17, 30 és 116 GH családban fordulnak elő (Juturu & Wu, 2014). Yan és mtsai. (2013) egy biogáz reaktorból származó metagenom könyvtárban kerestek (hemi)celluláz géneket. Összesen 21 egyedi GH gént azonosítottak. Az egyik GH5 a *C. thermocellum* génjéhez hasonlított, a négy GH10 közül az egyik a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*hoz mutatott nagyfokú hasonlóságot, míg a GH11 gének esetén *C. cellulolyticum*mal és *C. thermocellum*mal találtak hasonlóságot. Számos publikáció igazolja, hogy a *C. cellulolyticum* és *C. thermocellum* mellett a *Caldicellulosiruptor* nemzetségbe tartozó fajok is részt vesznek a biogáz termelő mikrobiális közösség felépítésében (Pap et al., 2015; Schlüter et al., 2008; Wirth et al., 2012). A cellulolitikus *Caldicellulosiruptor* fajokra egyedi celluláz rendszer jellemző: kiválasztanak szabad enzimeket és multimoduláris extracelluláris enzimeket is termelnek, habár az utóbbiak mérete elmarad a celluloszómákétól, tartalmaznak katalitikus és nem katalitikus domént is. A katalitikus és nem katalitikus domének elrendeződése befolyásolja a funkciót. Például a CelA celluláz háromfajta doménből épül fel: GH9–(CBM3)*n*–GH48, a CBM3 modulok száma befolyásolja az enzim termotabilitását és cellulózbontó képességét is. A legtöbb *Caldicellulosiruptor* faj rendelkezik egy specifikus genomi régióval (Glucan Degradation Locus - GDL), amely szintén fontos szerepet játszik a cellulóz lebontásban, a GH-kat kódoló gének száma ebben a régióban tükrözi a cellulolitikus képességet (Lee et al., 2020). Wei és mtsai. (2015) biogáz fermentorok leggyakrabban előforduló cellulolitikus baktériumait vizsgálták. Eredményeik alapján a domináns cellulolitikus baktérium a *Clostridium straminosolvens*-hez mutatott nagyfokú hasonlóságot. Mások a *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum*, *Clostridium stercorarium* és *Bacteroides cellulosolvens* cellulózbontó baktériumokat találták nagy gyakorisággal a különböző biogáz reaktorokban (Burrell et al., 2004; Goberna et al., 2009; Krause et al., 2008; Liu et al., 2009; O’Sullivan et al., 2007; Ueno et al., 2001a). Zhang és mtsai. (2018) indítványozták a III *Clostridium* csoport újraosztályozását négy új nemzetségbe, ezek neve a *Hungateiclostridium* gen. nov., *Thermoclostridium* gen. nov., *Ruminiclostridium* gen. nov. és *Pseudoclostridium* gen. nov., melyek a szintén új *Hungateiclostridiaceae* családba tartoznak. Ezzel a fentebb említett *Clostridium* fajok nevei a következőkre változtak: *Hungateiclostridium straminisolvens*, *Hungateiclostridium thermocellum*, *Thermoclostridium stercorarium* subsp. *stercorarium* és *Ruminiclostridium cellulolyticum*, ami a nomenklatura bonyolultságát tovább fokozta.

2.3.2 Acidogenezis

A hidrolitikus és acidogén mikroorganizmusok körülbelül tízszer gyorsabban szaporodnak, mint a metanogének. Általában az acidogenezis a leggyorsabb reakció a szerves anyagok fermentációja során. A hidrolízis során keletkezett oligoszacharidokat, hosszú láncú zsírsavakat, peptideket és aminosavakat különböző fakultatív és obligát anaerob mikroorganizmusok szubsztrátként használják, a fermentációs lépés termékei hosszabb-rövidebb szénláncú szerves savak, alkoholok, hidrogén és szén-dioxid (Merlin Christy et al., 2014), emellett ammónia, kénhidrogén és egyéb melléktermékek is keletkeznek (Appels et al., 2008). A biogáz fermentorokban gyakran azonosított nemzetségek (törzsi besorolásukat zárójelben tüntettem fel) a *Clostridium* és *Bacillus* (*Firmicutes*), *Bacteroides* és *Proteiniphilum* (*Bacteroidetes*), *Desulfovibrio* és *Geobacter* (*Proteobacteria*), *Chloroflexus* (*Chloroflexi*), illetve *Mycobacterium* (*Actinobacteria*) (Leng et al., 2018). A vegyületek szerves savakká alakulása a rendszer pH csökkenéséhez vezet, ez kedvez az acidogén és acetogén baktériumoknak. A glükóz metabolizmusa során keletkező fő köztitermék piroszőlősav, amely az Embden–Meyerhof-Parnas (EMP) útvonalon képződik. A piroszőlősav további átalakítása 1-4 szénatomszámú vegyületek, mint az illékony zsírsavak, például ecetsav, propionsav, vajsav, egyéb szerves savak (hangyasav és tejsav), alkoholok, ketonok és aldehidek termeléséhez vezet. Az aminosavak szintén energia és szénforrásként szolgálhatnak a fermentatív baktériumok számára. Rövid láncú illékony zsírsavak (2-5 szénatom számú) jönnek létre az alifás aminosavak reduktív deaminálása, aminosavak fermentációja, vagy aminosav párok közötti oxidációs-redukciós reakció során, melyet Stickland-reakciónak neveznek. A laktát, etanol, propionát, butirát és hosszabb láncú zsírsavak felhalmozódása felelős a hidrogén-koncentráció emelkedéséért (Merlin Christy et al., 2014). A köztitermék hidrogéntartalma befolyásolja az átalakulások menetét. Minél magasabb a hidrogén parciális nyomása, annál kevesebb redukált vegyület (pl. ecetsav) keletkezik (Chandra et al., 2012). Az acidogén szakaszban termelődött illékony zsírsavak koncentrációja és aránya fontos az anaerob lebontó rendszer összteljesítményét illetően, mivel a metánképzésben az ecetsav és a vajsav az előnyben részesített vegyület (Hwang et al., 2001).

2.3.3 Acetogenezis

Míg az acetát, formát, hidrogén, szén-dioxid és metil vegyületeket közvetlenül fel tudják használni a metanogének, addig az acidogeneziséből származó többi vegyületet, mint a butirát, propionát, laktát és etanol, acetogének egy csoportja továbbalakítja acetáttá, formáttá,

hidrogénné és szén-dioxiddá. Ilyenek a mezofil *Syntrophobacter*, *Pelotomaculum*, *Smithella*, *Syntrophus*, *Syntrophomonas* és *Syntrophothermus* nemzetségek egyes tagjai. Az első három genus általában a propionát lebontásban vesz részt, míg a többi általában a vajsav és egyéb zsírsavak oxidációjáért felel (Leng et al., 2018). Az acetogén baktériumok szigorúan anaerobok, pH optimumuk 6 körül van. Lassan szaporodnak, érzékenyek a környezeti változásokra. A növekvő hidrogén-koncentráció az elektronakceptorok (laktát, etanol, propionát, butirát, és hosszabb láncú zsírsavak) felhalmozódásához vezet, ezeket a vegyületeket az acetotróf metanogének közvetlenül nem tudják felhasználni. Az obligát acetogén baktériumok (pl. *Syntrophomonas wolfeii*, *Syntrophobacter wolinii*) bontják tovább ezeket a vegyületeket, ezt a folyamatot nevezzük acetogenezisnek. Ez az átalakítás fontos a sikeres biogáz termelés érdekében (Merlin Christy et al., 2014). Az acetát azonban könnyen felhalmozódhat a rendszerben, az egész mikrobaközösség kiegyensúlyozott működése ilyenkor felborul. A kényes egyensúly fenntartásban fontos szerepet játszanak a szintrofikus acetát oxidálók (SAO), például *Clostridium utunense*, *Syntrophaceticus schinkii* mezofil vagy a *Thermoacetogenium phaeum*, *Pseudothermotoga lettingae* termofil törzsek. A redukzív acetogenezisnek is nevezett Wood-Ljungdahl-útvonal kulcsenzime a formiltetrahidrofolát szintáz (FTHFS). Az enzim fontos tulajdonsága, hogy a reakciót visszafelé is tudja katalizálni, ilyenkor az acetátot oxidálja hidrogénné és széndioxiddá. Az átalakulás irányát nagy mértékben szabályozza a hidrogén parciális nyomása (Westerholm et al., 2016). A SAO termodinamikailag kedvezőtlen normál körülmények között. A SAO baktériumok ezért szoros kapcsolatot alakítanak ki a H₂ fogyasztó metanogénekkal, amelyek alacsonyan tartják a hidrogén parciális nyomását és a formát és acetát koncentrációt. Például, a propionát oxidációja energetikailag kedvezőtlen, mert a reakció standard Gibbs-féle szabadenergia változása pozitív. A propionát csak akkor oxidálódhat, ha szintrofikus kapcsolat alakul ki a propionát oxidáló baktériumok és hidrogént fogyasztó metanogének között, így a teljes reakció termodinamikailag megvalósítható. Ha a szintrofikus acetogenezis alacsony szinten fut, a Gibbs-féle szabadenergia változása -15 és -20 kJ/mol körül mozog. Ez a legkisebb mennyisége a metabolikusan átalakítható energiának, ami ahhoz kell, hogy egy ion transzportálódjon a citoplazma membránon keresztül. Ez gyengébb hajtóerő, mint ami az ADP-ből ATP szintézishez szükséges (40–70 kJ/mol). Ezért a szintrofikus baktériumok a szubsztrát metabolizmust közvetlenül összekapcsolják az ATP szintézissel klasszikus foszforil-transzferáz reakciókkal, és az alacsony növekedési sebességgel és hozammal jól alkalmazkodtak az energetikailag kedvezőtlen életmódhoz. Amikor a hidrogén parciális nyomása egyensúlyi körülmények között mérve $1\text{--}20 \times 10^{-5}$ atm között van, a propionát felhasználás termodinamikailag kedvezővé válik. A propionát felhalmozódása az anaerob

lebontó rendszer savasodását és a lebontási teljesítmény leromlását okozza. Először acetáttá, hidrogénné és szén-dioxiddá alakul, majd metán keletkezik ezekből a termékekből, ami a teljes metántermelés 6-35%-át adja. Ezért, a propionát lebontása kritikus, a szintrofikus propionát oxidáló baktériumok fontos szerepet játszanak a metabolikus hálózatban. Ha a hidrogén felhalmozódik és jelentős hidrogén parciális nyomás alakul ki, akkor az ecetsav termelő baktériumok aktivitása lecsökken és az ecetsavtermelés abbamarad, tehát az acetotróf metanogének számára nem keletkezik szubsztrát. A hidrogenotróf metanogének azonban felhasználják a H_2 -t a CH_4 képzéshez és így alakulhat ki egyensúly a közösségben (Leng et al., 2018). A H_2 termelők és fogyasztók közötti szintrofikus kapcsolatot fajok közötti hidrogén transzfernek is nevezik. Az acetogén baktériumok és metanogének obligát szintrofikus közösségének számos egyedi tulajdonsága van: (I) közösen lebontják a zsírsavakat, hogy szaporodni tudjanak, míg egyedül sem a metanogének, sem az acetogének nem képesek bontani ezeket a vegyületeket, (II) az acetogén és hidrogén fogyasztó mikrobák közötti fizikai távolság befolyásolja a specifikus növekedési rátát, (III) a közösségek olyan körülmények között növekednek, amelyek közel vannak a termodinamikai egyensúlyhoz és (IV) a közösségek olyan biokémiai mechanizmusokat fejlesztettek ki, amivel meg tudják osztani a kémiai energiát (Angelidaki et al., 2011).

2.3.4 Metanogenezis

A CH_4 anoxikus körülmények között képződik (Merlin Christy et al., 2014). A metanogének tartalmaznak egy redox koenzimet (F_{420}), amely lehetővé teszi, hogy zöldeskéken fluoreszkáljanak, ha 350-420 nm hullámhosszú fénnel világítják meg őket (Schnürer & Jarvis, 2018). A metanogén mikroorganizmusok az *Archea* doménbe, ezen belül az *Euryarchaeota* törzsbe tartoznak. Hét filogenetikai rendjét azonosították eddig: *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* és *Methanomassiliicoccales* (Lang et al. 2015). Az archeákat számos tulajdonság megkülönbözteti a baktériumoktól (*Bacteria* domén), például a sejtmembránt felépítő lipidekben található éter kötések, a muraminsav hiánya a sejtfalban vagy a jellegzetes riboszómális RNS (Boone et al., 1993). A metanogének sejtmorfológia alapján nagyon különbözőek, lehetnek szabályos és szabálytalan kokkoid sejtek (*Methanococcales*, *Methanomicrobiales*) rövid pálcák (*Methanobacteriales*, *Methanopyrales*) és hosszú filamentumok (*Methanosaetacea*). A metanogének végzik az anaerob lebontás utolsó lépését, amikor az ecetsav és/vagy $CO_2 + H_2$ formát, alkoholok és metilált C1 vegyületek CH_4 és CO_2 vegyületekké alakulnak. Gyakori élőhely ezen archeák számára az oxigénmentes tengeri és

édesvízi üledék, kérődzők és egyes rovarok emésztőszervrendszere, anaerob fermentorok, hőforrások és elöntött területek. A metanogéneknek egyedi metabolizmusuk van, amelyben számos különleges enzim és koenzim vesz részt. A legérdekesebb jellemző, hogy egy metanogén sem képes a szubsztrátszintű foszforilálásból származó energiát hasznosítani, és az ATP kemiozmotikus mechanizmus szerint, transzmembrán elektrokémiai membránpotenciál grádiens mentén képződik. Néhány metanogén rend, mint pl. a *Methanosarcinales* (kivéve a *Methanosaetaceae* család) és a *Methanomicrobiales* változatos a felhasznált szénforrás tekintetében, míg a többi rend (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* és *Methanocellales*) sokkal specializáltabb. A *Methanopyrales* rendbe tartozik egy szigorúan hipertermofil faj, *Methanopyrus kandleri*, amely képes 110 °C-on is szaporodni. Néhány pszikrofil, mint például a *Methanosarcina lacustris* és *Methanogenium frigidum* szintén ismert. A legtöbb metanogén optimálisan pH 7 körül szaporodik. Néhány faj, mint a *Methanosarcina baltica* és *Methanothermococcus okinawensis* savtűrő (4-4,5 pH esetén is megfigyelhető szaporodás) és a *Methanosalsum zhilinae* és *Methanothermococcus thermolithotrophicus* fajok alkalotoleránsak (pH 9,8-10 esetén még képesek szaporodni).

A metánképződés három útvonala ismert: acetotróf metanogenezis, ahol az ecetsav hasad metánra és szén-dioxidra, hidrogenotróf metanogenezis, ahol a szén-dioxid redukálódik hidrogénnel metánná, és a metilotróf metanogenezis, ahol metilált C1 vegyületek (metanol, metilamin, metilmerkaptopropionát, dimetilszulfid, stb.) alakulnak át metánná (Angelidaki et al., 2011). A metanogének a szén-dioxidot használják végső elektronakceptoroként a metántermeléshez (Chandra et al., 2012). A hidrogénen kívül a legtöbb hidrogenotróf a hangyasavat is tudja használni elektrondonorként. A hidrogenotróf metanogenezis folyamatában a szén-dioxid speciális koenzimek segítségével (metanofurán, tetrahidrometanoptein, koenzim M) lépésről lépésre metánná redukálódik formilon, metilénen és metilen keresztül. A folyamat kulcsenzime a metil-koenzim M reduktáz, amely a metil-koenzim M-et metánná redukálja, miáltal az oxidált koenzim M egy heterodiszulfid komplexet képez a koenzim B-vel. A metanogenezis másik típusában, az acetotróf metanogenezisben, az ecetsav közvetlenül metánná alakul. Az ecetsav karboxilcsoportja szén-dioxiddá oxidálódik, a metilcsoport metánná redukálódik. Az ecetsav lebontás két fő útvonala ismert, amelyek csak az első lépésben különböznek. Az acetotróf metanogének egy csoportja, a *Methanosarcinaceae*, az acetát-kináz foszfortranszacetiláz rendszert használja az ecetsav acetyl-koenzim A-vá alakításához. A másik csoport, a *Methanosaetaceae*, az adenzin monofoszfát képző acetyl-koenzim A szintázt használja a reakcióhoz. A hidrogenotróf metanogének (*Methanospirillum*

hungatei, *Methanoculleus receptaculi*) gyorsabban nőnek, mint az acetotróf metanogének (*Methanosarcina thermophila*). A hidrogenotróf metanogének maximális megkettőződési ideje körülbelül hat óra szemben a lassan növő acetotróf metanogénekkal, ami 2,6 nap. A metanogének általában nagyon érzékenyek a környezeti változásokra. A hidrogenotrófok ellenállóbbak a környezeti változással szemben, mint az acetotrófok (Merlin Christy et al., 2014).

Eddigi ismereteink alapján a *Methanosarcinales* az egyetlen rend, ahol szigorúan csak acetotróf metanogének fordulnak elő: a *Methanosaetaceae* család tagjai csak ecetsavat tudnak metabolizálni. A *Methanosarcinaceae* család tagjai sokkal változatosabb szubsztrátokkal is tudnak boldogulni (szén-monoxid, szén-dioxid és metilált C1 vegyületek). A *Methanosaetaceae*-k pH és ammónia érzékenyek és alacsony ecetsav koncentráció mellett szeretnek növekedni, míg a *Methanosarcinaceae* olyan környezetben érzi jól magát, ahol magas az ammónia és szerves sav tartalom. A hidrogén elektrondonorként való használata a szén-dioxid redukálásához (hidrogenotróf aktivitás) széles körben elterjedt a metanogének között (Angelidaki et al., 2011). A 2.3.3 fejezetben ismertett okokból és módon a biogáz termelő közösség igyekszik a hidrogén parciális nyomását alacsony szinten tartani. Ezért a H₂ általában limitáló szubsztrát a hidrogenotróf metanogének számára. Ezt támasztja alá, hogy a természetes biogáz termelő konzorciumhoz adott hidrogén termelő baktériumok fokozzák a biogáz hozamot (Bagi et al., 2007). A *Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanoregula*, *Methanosphaerula*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* és *Methanothermobacter* az anaerob fermentorokban leggyakrabban megfigyelt hidrogenotróf metanogén nemzetségek. Mivel az anaerob lebontási folyamatok energiaszegény környezetben történnek, ahol a szubsztrátok koncentrációja viszonylag alacsony értéken marad, a metabolikus folyamatok a termodinamikai egyensúlyhoz nagyon közel játszódnak, minimum energiavesztéssel. Ezért egy csekély változás a szubsztrát/termék koncentrációban vagy környezeti feltételekben megváltoztathatja a folyamat irányát (Leng et al., 2018).

Összefoglalva, az anaerob lebontásban működő, nagyon összetett mikroba közösségről ma rendelkezésre álló ismereteinkből néhány fontos általános következtetést lehet levonni. Az első és második mikroba csoport (hidrolizálók és acidogének), valamint a harmadik és negyedik csoport (acetogének, metanogének) szorosan kapcsolódnak egymáshoz a nagy és sokszínű mikroba közösségen belül. Ezért a folyamatot két szakaszban is meg lehet valósítani. Ugyanakkor tudatában kell lenni annak, hogy a rendszer kiegyensúlyozott működése megköveteli, hogy minden szakaszban a lebontás mértéke arányos legyen, a köztitermékek ne

halmozódjanak fel kritikus szinten felül. Ha az első lebontási lépés túl gyors, a savkoncentráció megemelkedik és a pH 7 alá csökken, ami gátolja a metanogéneket. Ha a második lépés túl gyors, a metántermelés korlátozott a szerves savak feldolgozásának lassú üteme miatt. Az oldhatatlan vegyületek, mint a cellulóz, fehérjék vagy zsírok napok alatt lassan hasadnak monomerjeikre, míg az oldható szénhidrátok hidrolízise néhány óráig tart. Az anaerob lebontási folyamat érzékeny és könnyen felboruló egyensúlyi rendszerek egymásba kapcsolódó és egymástól függő hálózatából áll, aminek minden részletre kiterjedő sikeres vezérléséhez még nem eléggé alapos a tudásunk (Weiland, 2010). Az átalakulási sebességeket meghatározó lépések erősen függenek a biogáz termeléshez használt szubsztrát összetételétől és kémiai paramétereitől. A 2.4 fejezetben a legfontosabb, a folyamatot erősen befolyásoló tényezőket veszem számba.

2.4 Az anaerob lebontást befolyásoló tényezők

Az anaerob környezetben számos fontos környezeti paraméter befolyásolja a különböző lépések abszolút és egymáshoz viszonyított sebességét, például a pH, alkalitás, hőmérséklet és retenciós idő (Appels et al., 2008). Ebben a fejezetben ezeket tekintem át.

2.4.1 Retenciós/tartózkodási idő

A retenciós időt (hydraulic retention time - HRT) megfogalmazhatjuk úgy, mint az átlagos időtartamát annak amíg az anyag (mind a szubsztrát, mind a biomassza) a reaktorban tartózkodik (Strazzera et al., 2018). Általában a hosszabb retenciós idő magasabb kumulatív biogáz hozamot és magasabb szerves anyag csökkenést eredményez (Chandra et al., 2012). A hosszú retenciós idő maximalizálja a szerves anyag lebontást és pufferkapacitást biztosít a túlzott szubsztrátbevitel okozta sokk és toxikus vegyületek ellen, de növeli a szükséges reaktortérfogatot és gazdaságossági szempontból sem előnyös. A hosszú retenciós idő segít megakadályozni a toxikus vegyületek és a folyamatot hátrányosan befolyásoló köztitermékek felhalmozódását (Gerardi, 2003).

2.4.2 Hőmérséklet

A hőmérsékletnek fontos hatása van a szubsztrát összetevőinek fizikokémiai tulajdonságaira. Befolyásolja a mikroorganizmusok növekedési sebességét és anyagcseréjét és így a populációdinamikát (Appels et al., 2008). Alacsony hőmérsékleten (10-20 °C) kisebb mennyiségű szerves anyag alakul át, így a termelődő biogáz mennyisége is alacsony. Mezofil mikroorganizmusok számára megfelelő hőmérsékleten (20-45 °C) a folyamatok jól kézben

tarthatók, a biogáz termelés 35 °C körül éri el a maximumát. A termofil mikrobák számára megfelelő hőmérséklet (45-60°C) előnye a rövidebb bontási idő, a patogének mennyiségének csökkenése és magas gázhozam (Chandra et al., 2012). Ugyanakkor a termofil anaerob mikrobiológiai rendszerek sokfélesége, diverzitása csökken, ezért könnyebben billen ki a rendszer az egyensúlyi helyzetből, amely szélsőséges esetben az egész biogáz termelés összeomlásához vezethet. Fontos, hogy a hőmérséklet állandó legyen a lebontás alatt, mivel a hőmérsékletváltozás vagy ingadozás bármely irányban negatívan hat a biogáz termelésre, felborítja a mikrobiológiai egyensúlyokat. A mezofil mikroorganizmusok ± 3 °C hőmérsékletingadozást tűrnek el jelentős metántermelés csökkenés nélkül. A termofil rendszerek csak ± 1 °C ingadozást tolerálnak jól, de egy jól működő termofil fermentor térterhelése magasabb lehet, vagy rövidebb hidraulikus retenció idő szükséges, mint mérsékelt hőmérsékleten (Weiland, 2010). A reaktor megfelelő kevertetése megakadályozza, hogy eltérő hőmérsékletű gócok alakuljanak ki (Chandra et al., 2012). Az acetotróf metanogének az egyik legérzékenyebb mikroba csoport a hőmérsékletváltozás szempontjából. Ráadásul a hőmérsékletnek jelentős hatása van a fermentorban a H₂ parciális nyomására, ami befolyásolja a szintrofikus kapcsolatok kinetikáját. A termodinamika azt mutatja, hogy az endergonikus reakciók (standard körülmények között), például a propionsav bontása ecetsavvá, széndioxidá és hidrogénné, energetikailag sokkal kedvezőbb lenne magasabb hőmérsékleten, míg az exergonikus reakciók (például hidrogenotróf metanogenezis) számára a magasabb hőmérséklet nem kedvező. A magasabb hőmérsékletnek további előnye, a szerves vegyületek növekvő oldhatósága, a fokozott biológiai és kémiai reakciósebesség és a patogének mennyiségének csökkenése. A termofil hőmérsékletnek negatív hatásai is vannak: növeli a szabad ammónia arányát, amely gátló hatású a mikroorganizmusokra, illetve az illékony zsírsavak disszociációs állandójának növekedése sokkal érzékenyebbé teszi a folyamatot a gátlásra (Appels et al., 2008).

2.4.3 pH

A metánképződés folyamatában a pH jelentősen befolyásolja a teljesítményt és fontos paraméter, amely befolyásolja a folyamat működésében résztvevő mikroorganizmusok növekedését (Chandra et al., 2012). A metán képződése egy viszonylag szűk pH tartományban történik, körülbelül 6,5 és 8,5 között, az optimális tartomány 7 és 8 között van (Weiland, 2010). Bonyolítja a helyzetet, hogy a nagyobb mikrobacsoportoknak eltérő az optimális működési/szaporodási pH tartománya. A metanogének különösen érzékenyek a pH-ra, kevés kivétellel számukra a pH=6,5-7,2 az elfogadható közeg. A fermentatív mikroorganizmusok

kevésbé érzékenyek és szélesebb pH tartományban (pH=4-8,5) is jól működnek, de általában a lúgosabb környezetet kedvelik (Appels et al., 2008). Megfelelő pufferkapacitás hiányában a pH az anaerob fermentorban kezdetben a szerves savak termelődése miatt pH=6 érték alá csökkenhet és ezzel egyidőben nagy mennyiségű szén-dioxid szabadul fel. Ezután a normális működés során a pH közel neutrális értékre emelkedik, 7-8 köré. Ahogy a metanogének elfogyasztják az illékony savakat, lúgosodik a rendszer, a fermentor pH-ja emelkedik, majd stabilizálódik. Az anaerob rendszer pH-ját jelentősen befolyásolja a biogáz oldott szén-dioxid, bikarbonát tartalma. A megfelelő pH-t a szén-dioxid/hidrogén-karbonát/karbonát pufferrendszer biztosítja. Az emelkedő pH értékkel az oldott szén-dioxid szénsavat képez, ami ionizálódik (Chandra et al., 2012). A pH érték a fehérjék bontása közben keletkező ammónia felhalmozódás miatt megemelkedik, míg az illékony szerves savak felhalmozódása csökkenti a pH értéket. Az utóbbi hatást általában eredményesen semlegesíti a metanogének aktivitása. Az illékony zsírsavak felhalmozódása gyakran azért nem eredményez pH csökkenést, mert a szubsztrát pufferkapacitása megfelelően nagy. Az állati trágyának többlet alkalitása van, ami stabilizálja a pH értéket (Weiland, 2010).

2.4.4 Redoxpotenciál (ORP)

Morris (1975) számolt be arról, hogy az obligát anaerob mikroorganizmusok szaporodásához a kultúra redoxpotenciál értékét -200 és -350 mV között kell tartani. A metanogének a megfelelő biológiai aktivitásukhoz -300 mV-nál alacsonyabb redoxpotenciál értéket igényelnek (Gerardi, 2003).

2.4.5 C/N arány

A sok éves empirikus tapasztalat szerint 20-30 közötti C/N arány az optimális az anaerob lebontás szempontjából. Ha a C/N arány nagyon magas, a gáztermelés és konverzió hatásfok alacsony lesz. Ezzel szemben, ha a C/N arány nagyon alacsony, a felszabaduló nitrogén ammónia formájában felhalmozódik. A túl sok ammónia megemeli a pH értéket és az $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ arányt. Ennek hatásait a 2.4.7 fejezetben tárgyalom részletesen (Chandra et al., 2012).

2.4.6 Tápanyagok és nyomelemek

A mikrobák számára a növekedéshez és túléléshez számos makro- és mikrotápanyag szükséges. Makrotápanyag a szén, nitrogén, foszfor és kén. Az anaerob lebontás tápanyagszükséglete alacsony, köszönhetően annak a ténynek, hogy nem sok mikrobiális

biomassza képződik, így a C:N:P:S=600:15:5:1 tápanyag arány elégséges. A nyomelemek, mint a vas, nikkel, kobalt, szelén, molibdén és volfrám fontosak a mikroorganizmusok növekedése szempontjából, számos redox enzim aktív centrumának építő elemei ezek, ezért hozzá kell adni a rendszerhez ha a szubsztrát nem tartalmaz elegendő nyomelemet (Jarvis et al., 1997). A nikkelre általánosan szüksége van minden metanogénnek, mert szükség van rá az F₄₂₀ kofaktor szintéziséhez. Az optimális növekedéshez a sejtek szintén igényelnek kobaltot a kobalt tartalmú korrinoid faktor III felépítéséhez. A szelén, molibdén és volfrám feladata nem teljesen tisztázott és csak néhány metanogén növekedése függ ezektől a nyomelemtől. Metanogén kultúrák számára az optimális kobalt koncentráció 0,0059-0,12 mg/L, a szelén koncentráció 0,079-0,79 mg/L, míg a molibdén koncentráció 0,048 mg/L (Demirel & Scherer, 2011). A vasszükséglet nagyobb, 1-10 mg/l. A szerves trágya hozzáadása csökkenti a mikrotápanyagok hiányát, de akár 50%-os trágyabevitel esetén is a mikrotápanyagok hozzáadása fokozhatja az anaerob átalakítás sebességét (Weiland, 2010).

2.4.7 Ammónia

Az ammónia nitrogén tartalmú anyagok bomlása során keletkezik, főként fehérjékből és karbamidból. Az ammónium ion és szabad ammónia a szerves nitrogén két jellemző formája az anaerob rendszerekben. A szabad ammónia a toxikusabb mert képes átjutni a sejtmembránra és a sejtben proton egyensúlyhiányt és kálium hiányt okoz. A szabad ammónia koncentrációja többnyire három paramétertől függ: teljes ammónia koncentráció, hőmérséklet és pH. A magasabb hőmérséklet pozitív hatással van a mikrobák növekedési sebességére, de magasabb szabad ammónia koncentrációt eredményez. A pH emelkedése szintén a szabad ammónia és ammónium ion arányának növekedését okozza (Chen et al., 2008; Hansen et al., 1998; Sung & Liu, 2003). Az ammónia nem disszociált formája 80 mg/l koncentráció felett már gátolhatja a metán képződést. Amikor a folyamatot gátolja az ammónia, az illékony zsírsavak koncentrációjának emelkedése a pH csökkenéséhez vezet, ami az ammónia disszociációját segíti elő és ezzel az egyensúlyi helyzet felé szabályozza a rendszert (Weiland, 2010).

2.4.8 Hidrogén

Molekuláris hidrogén keletkezik az anaerob lebontás különböző szakaszaiban. Az utolsó lépésben a hidrogenotróf metanogének felhasználják a hidrogént és így megelőzik annak túlzott felhalmozódását. A szulfát redukáló baktériumok szintén fogyasztják a hidrogént, ezért a metanogenezis kompetitív inhibitorai. Az acidogenezis és acetogenezis csak akkor működik jól, ha a hidrogén nem halmozódik fel, hanem azt a metanogének felhasználják. A hidrogén

parciális nyomása hatással van az ecetsav, propionsav és vajsav termelésre (Massé & Droste, 2000; Rehm & Reed, 1999).

2.4.9 Illékony zsírsavak

Az illékony zsírsavak fontos közttermékei az anaerob fermentációnak. Az illékony zsírsavtermelés toxikus lehet a mikroorganizmusokra, különösen a metanogénekre, ha a koncentrációjuk eléri a 6,7-9 mM-t. Az illékony zsírsavak (VFA) felhalmozódását okozhatja hőmérsékletváltozás, túlzott szerves anyag bevitel, toxikus vegyületek, stb. Ha a savtermelők és metanogének egyensúlya felborul, a savak felhalmozódnak és a pH olyan alacsony értékre csökken, ahol az acetogenezis és metanogenezis gátlódik. A nem disszociált illékony zsírsavak szabadon átjutnak a sejtmembránon, a citoplazmában disszociálnak és így pH csökkenést és a homeosztázis zavarát okozzák (Batstone et al., 2000; Mechichi & Sayadi, 2005). Az ecetsav általában jóval magasabb koncentrációban van jelen, mint más illékony zsírsavak, de a propionsavnak és vajsavnak sokkal erősebb gátló hatása van a metanogénekre. Az illékony zsírsavak gátló hatása sokkal nagyobb az alacsony pH-jú rendszerekben (Mösche & Jördening, 1999; Wang et al., 1999). Ahring és mtsai. (Ahring et al., 1995) batch kísérletekben megfigyelték, hogy a VFA koncentráció 50 mM-ig nem csökkentette a metánhozamot. Ez azt mutatta, hogy VFA felhalmozódás az anaerob reaktorokban a folyamat egyensúlyának felborulása miatt történik és nem ez okozza a gátlást, ezzel igazolva, hogy az illékony zsírsavakat indikátorként lehet használni. Továbbá azt figyelték meg, hogy a vajsav és izovajsav együtt különösen jó indikátorok. Számos kutató összefüggésbe hozta a folyamat stabilitását az egyes zsírsavak koncentrációjával (Hill et al., 1987; Hill & Holmberg, 1988; Kaspar & Wuhrmann, 1978; Wohlt et al., 1990). A 13mM-nál magasabb acetát koncentráció kiegyensúlyozatlanságot sejtet (Hill et al., 1987). Más kutatók szerint a propionát jobb indikátor (Kaspar & Wuhrmann, 1978; Wohlt et al., 1990). Hill (1982) azt javasolta, hogy a propionát/acetát arányt kellene a folyamat indikátoraként használni, stabil folyamat esetén az arányuknak 1,4 alatt kell maradnia. A hosszabb szénláncú illékony zsírsavakat (C4-C6) és főként az izoformájukat szintén javasolták indikátornak (Chen & Day, 1986; Fischer, et al., 1984). Hill és Holmberg (1988) kimutatták, hogy az izovajsav és izovaleriánsav koncentrációja 0,06 mM alatt a folyamat stabilitására utal, míg 0,06 mM és 0,17 mM közötti koncentráció az egyensúly zavarának a jele. Pind és mtsai. (2003) eredményei alapján a propionsav-lebontás volt a leglassabb és legérzékenyebb folyamat a vizsgált illékony zsírsavak közül, valamint az izozsírsavak kontroll célokra történő mérését ki kell egészíteni a „normálisan” előforduló zsírsavak mérésével.

2.4.10 Hosszú láncú zsírsavak

A hosszú láncú zsírsavak a zsírok, lipidek lebontása során keletkeznek és β -oxidáció során továbbredukálódnak ecetsavvá és hidrogénné az acetogének működésének eredményeként. A hosszú láncú zsírsavak már alacsony koncentrációban gátolják a Gram-pozitív baktériumokat. A hosszú láncú zsírsavak toxicitási mechanizmusa a sejtfalra vagy sejtmembránra történő adszorpció, ami akadályozza/zavarja a sejt szállítási és védelmi funkcióit. A hosszú láncú zsírsavak nagyobb negatív hatással vannak az acetotróf metanogénekre, mint a hidrogenotróf metanogénekre (Alves et al. , 2001; Chen et al., 2008).

2.5 Lignocellulóz

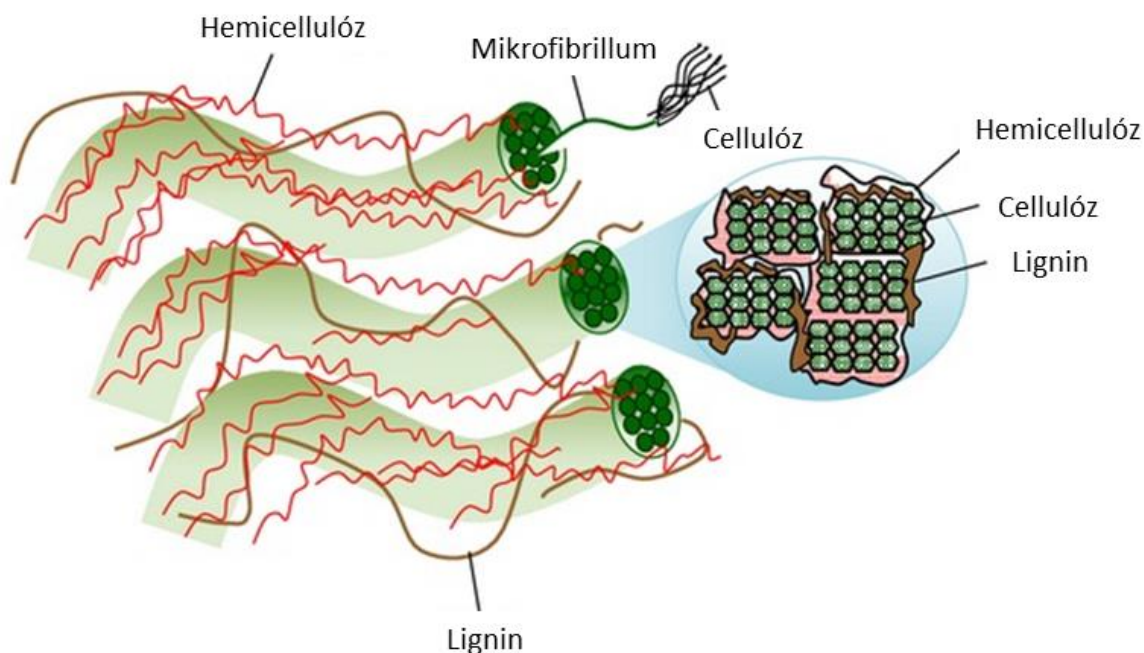
A növényi sejfal fő alkotóeleme a lignocellulóz. A lignocellulóz három fajta biopolimerből áll (2. ábra), úgymint a cellulóz, hemicellulóz és lignin (Lu, 2014). A lignocellulóz tartalmú biomassa átlagos összetétele a növény száraztömegére vetítve: 35-50 % cellulóz, 20-35 % hemicellulóz és 5-30 % lignin (Lynd et al., 2002). Az elsődleges és másodlagos sejtfal is tartalmaz cellulózt és hemicellulózt. Emellett az elsődleges sejtfalban pektint, enzimeket és szerkezeti fehérjéket találunk, míg a másodlagos sejtfalat kevés fehérje és pektin alkotja, rendszerint jelentősebb mennyiségű lignin mellett.

A poliszacharidok közül a cellulóz a legfontosabb és általában a Földön legnagyobb mennyiségben keletkező megújuló sejtfalalkotó (Lerouxel et al., 2006). A cellulóz egy lineáris, oldhatatlan biopolimer, ismétlődő β -D-glükopiranoz egységekből épül fel, amelyek β -1,4 glikozidos kötéssel kapcsolódnak. Ellentétben más glükán polimerekkel, mint a keményítő vagy kállóz, a cellulózban az ismétlődő szerkezeti egység nem a glükóz, hanem a diszacharid cellobióz. A 2-től 7-ig terjedő polimerizációs fokkal rendelkező β -1,4-glükóz oligomerek, más néven cello-dextrinek vagy cello-oligoszacharidok, vízdékok. A cellulózban a glükán lánc hossza elérheti a több mint 25 000 glükóz egységet. A cellulóz makromolekulák összekapcsolódása mikrofibrillum kialakulásához vezet, amelyek 15-45 láncot tartalmaznak csaknem szabályos, kristályos elrendezésben. Ezek a mikrofibrillumok hozzák létre a cellulóz fibrillumokat, más néven makrofibrillumokat vagy rostokat. A natív cellulóz parakristályos, mivel a mikrofibrillumokon belül az amorf és kristályos régiók váltakoznak. Ráadásul a cellulóz rostok különböző jellegű szabálytalanságokat is tartalmaznak - ezek lehetnek csavarodások vagy hézagok - amelyek növelik a felületet. Alacsony sűrűsége ellenére, a cellulóz a legellenállóbb és legstabilabb ismert természetes szerves vegyületek egyike (Desvaux, 2005).

A hemicellulóz poliszacharidok olyan komplex molekulák, amelyek összekapcsolódnak a cellulóz mikrofibrillumokkal, és keresztkött hálózatot alakítanak ki. A hemicellulózokat négy fő csoportba sorolhatjuk: 1.) xiloglükánok, amelyek erősen szubsztituált β -1,4-glükán vázat tartalmaznak; 2.) (glüko)mannánok, ezek különböző szubsztituált vázzal rendelkeznek, amelyek β -1,4-kapcsolt mannóz alegységekből állnak; 3.) glükuronoarabinoxilánok, melyek xilán váza szubsztituált β -1,4-kapcsolt alegységekből tevődik össze; 4.) a kevert-kötésű glükánok, amelyeket nem szubsztituált β -1,3- és β -1,4-kapcsolt glükozid alegységekből álló váz építi fel.

A pektinek komplex poliszacharidok amelyeket homogalakturonsav, ramnogalakturonsav I és viszonylag kis mennyiségű ramnogalakturonsav II domének alkotnak (Lerouxel et al., 2006).

A lignin a növényi sejtfal másik fő összetevője és a bioszférában legnagyobb mennyiségben jelenlevő aromás vegyület. Nélkülözhetetlen sejtfal összetevőként, a lignin szilárdságot és ellenállást nyújt a növényeknek. A lignin részt vesz a víztranszportban és akadályt képez a mikrobiális lebontás ellen. Kémiaiailag a lignin egy heterogén polimer, fenilpropanoid alegységekből áll, amik különböző típusú kovalens kötésekkel (például aril-éter, aril-aril és szén-szén kötés) kapcsolódnak össze. A meghatározó struktúra a β -O-4-kapcsolt éter, ez alkotja a szerkezet felét, ezt követi a fenilkumarin, rezinol és különféle kisebb alegységek. A lignin eltérő kötés típusai és heterogenitása a mikrobiális lebontással szemben nagyon ellenálló, amorf, nem-kristályos növényi sejtfalhálózatot hoz létre (Li et al., 2009).



2. ábra. A lignocellulóz szerkezete (Lee et al., 2014)

2.6 Előkezelés

Felhasználás előtt, a lignocellulóz tartalmú biomasszát legtöbb esetben szükséges előkezelni. Az előkezelés lehet fizikai (aprítás, gőzrobbantás, forróvíz, besugárzás) kémiai (lúgos vagy savas előkezelés, nedves oxidáció, ózonolízis, oxidáció peroxidokkal, ionos folyadékok), biológiai (gomba, mikrobiális konzorcium, enzimatikus) vagy kombinált előkezelés (Bruni et al., 2010; Carlsson et al., 2012; Hendriks & Zeeman, 2009; Mutschlechner et al., 2015; Rodriguez et al., 2016; Sapci, 2013; Singh et al., 2015). Aprítással növelhető a szubsztrát felülete és csökkenthető a cellulóz kristályossági foka. A gőzrobbantás során a biomasszát rövid ideig magas nyomású telített gőzzel kezelik, majd gyorsan lecsökkentik a nyomást. Ezalatt hidrolizálódik a hemicellulóz és a lignin egy része átalakul. Magas lignocellulóz tartalmú biomassza esetén az egyik leghatékonyabb előkezelési módszer, bár nagyon energiaigényes. A folyékony forróvízes kezelés alatt a biomasszát magas hőmérsékleten és nyomáson vízben főzik. A lúgos előkezelés során valamilyen lúgot, mint például NaOH, Ca(OH)₂, KOH, és NH₄OH, használnak, hogy eltávolítsák a lignin és hemicellulóz egy részét és megnöveljék a mikrobák számára hozzáférhető felszínt. A savas előkezelés elvégezhető tömény savval alacsony hőmérsékleten vagy híg savval magas hőmérsékleten. Szerves és szervetlen savakat is lehet alkalmazni. A barna és fehér korhasztó gombák a szubsztrát lignin és hemicellulóz részeit bontják. Enzimatikus előkezeléshez leggyakrabban cellulázokat és hemicellulázokat használnak. A különböző előkezeléseknek az előnyökön kívül hátrányaik is vannak, például a magas energiafelhasználás, magas költségek, gátló anyagok képződése, a berendezés korróziója, a felhasznált vegyszerek nehézkes visszanyerése a folyamat végén. Ezeket is figyelembe kell venni a megfelelő előkezelés kiválasztásakor (Nanda et al., 2014; Zheng et al., 2014).

2.7 Bioaugmentáció

A bioaugmentáció általában alkalmas módszer a szennyezőanyagok eltávolítására és a szennyezett terület remediációjára, ez az eljárás egy vagy több specifikus mikroorganizmust juttat be a helyi populációba, amely képes a célzott anyag bontására, átalakítására. Jelenleg a legsikeresebb bioaugmentációs eljárásokat zárt rendszerekben, bioreaktorokban alkalmazzák, ahol a körülményeket szabályozni lehet, hogy kedvezzen az exogén mikrobiális populáció túlélésének és biológiai aktivitásának (Zhang et al., 2015).

A szakirodalomban vizsgálták tiszta kultúrák (Ács et al., 2015; Bagi et al., 2007; Kovács et al., 2013; Nkemka et al., 2015; Peng et al., 2014) és konzorciumok bioaugmentációs hatását is a metántermelésre (Kinet et al., 2015; Martin-Ryals et al., 2015; Tuesorn et al., 2013; Weiß

et al., 2010). A hidrogén termelő törzsek (a mezofil *Enterobacter cloacae*, a termofil *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*) fokozták a biogáz termelést akár 60-70%-kal (Ács et al., 2015; Bagi et al., 2007; Kovács et al., 2013). Nkemka és mtsai. (2015) egy anaerob gombát, a *Piromyces rhizinflata* YM600-at alkalmazták a silókukorica és buzogánysás anaerob fermentációjának bioaugmentálásához, de pozitív hatást nem tapasztaltak a metánhozamban. A *Ruminiclostridium cellulolyticum* elősegítette a búzaszalma hidrolízisét, a metántermelés 7,6 és 13%-al emelkedett (Peng et al., 2014). Zhang és mtsai. (2015) a mezofil, ecetsav és hidrogén termelő *Acetobacteroides hydrogenigenes*-t használták kukoricaszár bioaugmentációjához, 19-23%-kal növekedett a metánhozam. A *Caldicellulosiruptor bescii* termofil, cellulózbontó baktérium gőzrobbantásos előkezeléssel együtt 140%-kal növelte a nyírfából a metánhozamot (Mulat et al., 2018). Egy komposztból izolált termofil cellulózbontó konzorcium a biogáz és metántermelést 12-14,5%-al fokozta (Kinet et al., 2015). Martin-Ryals és mtsai. (2015) arról számoltak be, hogy a cellulolitikus mikroorganizmusokkal végzett rendszeres bioaugmentáció 56%-kal emelte a csemegekukorica feldolgozása után visszamaradó hulladékból nyert metán mennyiségét. Hasonló eredményt értek el sertés trágya szubsztrát lignocellulolitikus mikroba konzorciummal végzett bioaugmentációjával: a biogáz és metánhozam 40-55%-al nőtt meg (Tuesorn et al., 2013). Weiß és mtsai. (2010) hemicellulolitikus mikroorganizmusokat immobilizáltak zeolitra, ezek 53%-kal emelték a metán produkciót xilánból. A felsorolt példák közül általánosítható következtetéseket nehéz levonni, mert az alkalmazott rendszerek, működési paraméterek és mikroorganizmusok is eltérőek voltak.

2.8 Metagenomika

A metagenomika teljes mikrobiális közösségek összetételének vizsgálatával foglalkozik és bepillantást enged annak felépítésébe és működésébe. Információt ad olyan organizmusokról is, amelyeket nehezen vagy egyáltalán nem tudunk laboratóriumi körülmények között tenyészteni (Handelsman et al., 1998). Az elmúlt évtizedben, az új generációs szekvenálási eljárásokon alapuló metagenomika kiterjedten alkalmazott kutatási területté vált az élettudományok számos területén, így a mikrobiológiában is. Hasonló lendülettel fejlődött az óriási adathalmazokat kezelni képes bioinformatika, amely mára rengeteg algoritmust, eszközt és szoftvercsomagot kínál az adatok kiértékelése, grafikus ábrázolása számára. Ismert, hogy a mikroorganizmusok nagy része, 95-99%-a nehezen vagy egyáltalán nem tenyészthető, ezért a hagyományos mikrobiológiai módszerekkel nem vizsgálható (Streit & Schmitz, 2004). Az első generációs tenyésztésfüggetlen módszereket, mint például a denaturáló grádiens gél elektroforézis (Ferris et al., 1996; Muyzer et al., 1993), terminális restrikciós fragment-hossz

polimorfizmus (Liu et al., 1997; Osborn et al., 2000), fluoreszcens in situ hibridizáció (Antón et al., 1999; Llobet-Brossa et al., 1998) és különböző típusú PCR-ek, mint a kvantitatív real-time PCR, évtizedekig használták organizmusok vagy teljes környezeti közösségek tenyésztés nélküli vizsgálatához (Fierer et al., 2005; Kolb et al., 2003). De az ezekkel a technikákkal nyerhető információ korlátozott, azaz a teljes mikroba közösségről és annak tagjairól nem tudnak elegendően alapos és részletes leírást adni. Az új évezred kezdetén kifejlesztett úttörő, teljes genom shotgun szekvenálási módszerek olyan gazdag diverzitással rendelkező közösségekről is hű képet adtak, mint például a Sargasso-tenger (Venter et al., 2004). Ezek a „második generációs” nevezhető eljárások a teljes környezeti DNS különféle marker szekvenciáinak (általában a 16S rRNS-t kódoló gén egy részének) direkt klónozásán alapultak, de a nagy áteresztő képességű kapilláris szekvenálással együtt még meglehetősen költségesek és időigényesek voltak ebben az időben. Az „új generációs szekvenálási technológiák” megjelenése nem sokkal ezután forradalmasította a szekvenáló piacot és a szekvencia alapú kutatást, mert drámaian csökkentették a szekvenálási költségeket és egyidejűleg egyszerűsödött a DNS könyvtárkészítés azzal, hogy elhagyták a klónozási lépést. Ezzel lehetővé vált számos környezet és mikroorganizmus közösség teljes génszekvenciájának vizsgálata a kihalt organizmusok fossziliáján át az olyan élőlényekig, amelyeket senkinek sem sikerült még tiszta kultúrában tenyészteni, mint például a szimbiontákat. Az új generációs megközelítés lényege, hogy az organizmusból vagy környezeti mintából kivont teljes DNS frakcióval dolgozunk, amit először fragmentálunk, majd minden fragmentumot egyenként megszekvenálunk úgy, hogy több tízezer vagy akár milliónyi szekvenálást végzünk párhuzamosan és nagy gyorsasággal. Az első, széles körben elérhető új generációs szekvenáló berendezés a GS20 szintézis alapú piroszekvenáló berendezés volt melyet a 454 Life Sciences (később Roche) dobott piacra 2004-ben, illetve az utódja a 454 GS FLX (2005-ben) 100-150 bp read hosszt és 20 Mb-nyi szekvenciaadatot nyújtott futásonként. A 454 platform folyamatos fejlesztésen ment keresztül a 2008-as 454 GS FLX Titanium és 2009-es 454 GS FLX+ továbbfejlesztéssel, képes volt már több mint 600 Mb előállítására egyetlen futással, akár 1 kbp hosszúságú readekkel. A szekvenáló piac számára a másik lökést a Solexa adta 2006-ban a Genome Analyzer forgalomba hozatalával, amely közvetlen versenytársa volt a GS FLX-nek. Ennek a szintézis alapú szekvenátornak a működési elve hasonlít a Sanger eljáráshoz abban, hogy fluoreszcens reverz terminátor nukleotidokat használ. Egy futással 1 Gb adatot szolgáltat, de még mindig nagyon rövid read hosszal (35 bp) rendelkezik, viszont azzal a lehetőséggel, hogy paired end (a DNS szál mindkét végéről - 5' és 3' - történik a szekvenálás) szekvenálást végez, gyakorlatilag megduplázza a read hosszát. Az Illumina 2007-ben megvette a Solexát, az elkövetkező években

fejlesztések és eszközök széles választékát fejlesztette a közepestől a nagy teljesítményűig (például a GAIIx, a HiSeq család, és a népszerű asztali változat a MiSeq). Jelenleg, kétségkívül az Illumina szekvenáló berendezései a legszélesebb körben használtak a kutatásban, köszönhetően a kiváló költséghatékonyságnak és magas szekvenáló pontosságnak. A platformjaik között elérhető read hossz 2x125 és 2x300 bp között van és a teljesítmény több Gb (néhány óra) és néhány terabázis (majdnem egy hét) között változhat. Természetesen számos másik vállalat is piacra dobta a saját készülékét, például a Pacific Bioscience fluoreszcens nukleotidokat érzékel az egy molekula valós idejű szintézis alapú szekvenálási folyamatában az RS és RS II készülékkel, a dinukleotidok ligálás alapú szekvenálása SOLiD szekvenálóval, amelyet az Applied Biosystems értékesített (időközben felvásárolta a Thermo Fisher Scientific). Az Ion Torrent szekvenátorok (Thermo Fisher Scientific, korábban Life Technologies) olyan DNS szekvenáló technológiát használnak, amelyben félvezető technikával, integrált áramköröket hoznak létre, ami képes közvetlen elvégezni a genomok, nem-optikai alapú DNS szekvenálását. Tehát ez is egy szintézis alapú szekvenálási módszer. A szekvenciaadatok közvetlen a felszabaduló hidrogénionok, és az általuk okozott pH változás érzékeléséből származnak, melyek akkor keletkeznek, amikor a DNS polimeráz beépíti a templátnak megfelelő nukleotidot. Az ionchip ion-szenzitív, térvezérlésű tranzisztor (FET) alapú szenzorokat tartalmaz. Az integrált áramkörök kialakításához használt, széleskörben elterjedt technológia, a komplementer fém-oxid félvezető (CMOS), lehetővé teszi a készülék alacsony költségű, nagy mennyiségű gyártását (Rothberg et al., 2011). A következő, „harmadik generációs” szekvenáló platformok, mint például az Oxford Nanopore MinION készüléke egyetlen hosszú DNS lánc szekvenálását valósítja meg, ionáramot használ az egyszálú jelöletlen DNS molekula érzékeléséhez, ahogy áthalad egy fehérje nanopóruson (Goodwin et al., 2015; Hodgkinson & Grice, 2015; Kulski, 2016). Ez a mindenre kiterjedő fejlődés elősegítette a szekvenálás alapú kutatás befolyásának növekedését az élettudományok minden területén. Azonban, mivel a technológia gyorsabban fejlődött, mint a számítástechnikai megfelelője, valójában teljesítményben többszörösen felülmúlta Moore-törvényét (Moore, 2006), előre nem látott mennyiségű szekvenciaadat keletkezett, ami igazi kihívást okozott az adatelemzés és általánosságban a bioinformatika számára.

A kifinomult bioinformatikai eszközökre, amelyek belátható időn belül képesek több millió readet feldolgozni, korábban nem volt szükség, ezért nem is álltak rendelkezésre. Így a korai új generációs szekvenáláson alapuló metagenomikai tanulmányok fő témája, tekintettel a bioinformai feldolgozásra, lényegében ezeknek a hatalmas mennyiségű adatoknak a kezelése volt. Ennek köszönhetően a feldolgozási folyamat egyszerű maradt, azaz közvetlenül

a nyers szekvenciákból származtak az eredmények, átfogó BLAST (Camacho et al., 2009) kereséseket végeztek nagy mennyiségű adathalmazon, hogy összehasonlítsák a 16S rRNS gén variábilis régiójának szekvencia alapján differenciálható azonosító motívumokat a riboszóma adatbázisokkal vagy kimutassák más környezeti marker gén azonosító motívumait és a teljes genom szekvenciát számos nukleotid és fehérje adatbázisban keresték (Angly et al., 2006; Edwards et al., 2006; Gill et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006). Másik nehézsége az új generációs szekvenáló berendezéseknek a vele járó platform specifikus hiba profil. A lehetséges eltérések és műtermékek, amelyek bekerülhetnek a szekvenálási folyamatba nem voltak eléggé ismertek. Ha ezeket nem szűrjük ki, eltorzíthatják a vizsgálati eredményeket (Berry et al., 2011; Dohm et al., 2008; Gomez-Alvarez et al., 2009; Huse et al., 2007; Kunin et al., 2010; Nakamura et al., 2011; Taub et al., 2010). Idővel és a szekvenálási mélység növekedésével, a megfelelő minőségi kezelés, mint a hibaszűrés vagy hibajavítás alapvető lépéssé vált a metagenomikában és beépítették a bioinformatikai kiértékelés folyamatába (Yang et al., 2013; Zhou et al., 2014). Ráadásul új eszközöket fejlesztettek kimondottan a metagenomikai adatok feldolgozásához és kiértékeléséhez, mint az előzetes feldolgozás (pre-processing), különböző típusú taxonómiai osztályozás, genomok újjáépítése a metagenomok összeszerelésével (genom alapú szekvenálás), az összeépített genom fragmentek csoportosítása, az egyes readok csoportosítása taxonómiai egységekbe vagy funkcionális csoportokba (Kim et al., 2013; Teeling & Glöckner, 2012). Ez sokkal komplexebb és információban gazdagabb eredményeket nyújt, de sokkal alaposabb vizsgálatokat is igényel. Lehetővé vált a mikrobiális csoportok taxonómiai azonosításán túl a metagenom readok génekhez, ortológ csoportokhoz vagy metabolikus útvonalakhoz való kapcsolása. Megismerhetjük az extrém környezetekben élő mikroba közösségek túlélési stratégiáit és a komplex közösségeknek otthont adó élőhelyeket (Xie et al., 2011), ami lehetővé tette például, hogy hasonlóságot találjunk a mélytengeri üledékek és esőerdők talajában élő mikrobiológiai közösségek ökológiai szerepe között (Quaiser et al., 2011), vagy a nyál mikrobiom bakteriális közösség szerkezetében bekövetkező változások azonosítását, amely fogszuvasodást, fogágygyulladást okozhat (Yang et al., 2012). Ezzel a megközelítéssel lehet esélyünk a biogáz fermentorban lezajló, anaerob biomassza-lebontásban és biometántermelésben résztvevő összetett mikroba közösség teljesebb megismerésére, így kikövezve az utat a jövőbeli folyamatoptimalizálásnak (Jaenicke et al., 2011; Jünemann et al., 2017).

Az összeszerelt metagenomok általában nagyon fragmentáltak, több ezer contigot tartalmaznak, és a kutatók előzetesen (a priori) nem tudják, hogy melyik contig melyik genomból származik, vagy hány genom van jelen a mintában. A contigok binelésének célja,

hogy fajok szerint csoportosítsuk a contigokat. Az irányított binelő módszerek már megszekvenált genomok adatbázisát használják, hogy a contigokat taxonómiai osztályokba sorolják. A nem irányított (csoportosító) módszerek természetes csoportokat keresnek az adatokban. Mind az irányított, mind a nem irányított módszereknek két fő része van: egy metrikus, amely meghatározza a hasonlóságot egy adott contig és bin között, és egy algoritmus, ami ezeket a hasonlóságokat hozzárendeléssé alakítja. A taxonómiai osztályozáshoz hasznos megközelítés, ha ismert genomokkal szemben vizsgáljuk a contigok homológiáját, de a legtöbb mikroba faj még nincs megszekvenálva, így a felépített genom fragmentek nagy részét nem lehet referencia genomokhoz térképezni. Ez ösztönözte a kutatókat arra, hogy a contigok szekvencia összetételét használják bineléshez (Quince et al., 2017). A különböző mikroba fajok genomjai sajátos bázis kombinációkat tartalmaznak, és ezek eltérő *k*-mer gyakoriságot eredményeznek (Karlín et al., 1997). Ezen a *k*-mer gyakoriságon alapuló metrikát használhatjuk a contigok binelésére: a tetramereket tekintik a leginformatívabbnak a metagenomikai adatok bineléséhez (Dick et al., 2009).

A contigok csoportosítása vonzó eljárás lehet, mert nem igényel referencia genomot. Egészen a legutóbbi időkig, a legtöbb contig csoportosító algoritmus, mint pl. a MetaWatt (Strous et al., 2012) és SCIMM (Kelley & Salzberg, 2010), különféle fajösszetétel metrikát használt, néha teljes lefedettséggel párosítva. Mivel mostanában sokmintás metagenom adatmennyiségek keletkeznek, a kutatók rájöttek, hogy az összetett mintában a contig lefedettség sokkal erősebb jelet biztosít a contigok összecsoportosításához (Albertsen et al., 2013; Sharon et al., 2013). Az alapelv az, hogy ugyanabból a genomból származó contigoknak hasonló lefedettségi értékük lesz minden metagenomon belül, habár a genomon belüli GC tartalom változás és a bakteriális replikációs origó körül megnövelt olvasási mélység kihívást jelenthet (Korem et al., 2015). Az első algoritmusok emberi adatbevitelt igényeltek, hogy elvégezzék a csoportosítást. Ez lefedettségi információkon és összetételen alapult, amelyet meg lehetett jeleníteni két dimenzióban (Albertsen et al., 2013). Ma már elérhetőek teljesen automatizált megközelítések, mint például a CONCOCT (Alneberg et al., 2014), GroopM (Imelfort et al., 2014) és MetaBAT (Kang et al., 2015), amelyek nagy adatmennyiségek kezelésére is képesek, de még jobb eredményeket érhetünk el, ha manuális finomítással kombináljuk ezeket és egy alkalmas megjelenítő eszközt használunk, mint amilyen az Anvi'o (Eren et al., 2015).

A metagenom adatokból összeszerelt genomok (metagenomic assembled genomes MAGs) felépítéséhez használt módszerek nélkülözhetetlenek a baktériumok sokféleségének

megismeréséhez. A MAGs teljességét általában az egy kópiában jelen lévő mag (core) gének vizsgálatával becsülik meg, mint például a tRNS szintetázok vagy riboszomális fehérjék. Egy tiszta MAG ezeket a géneket egyetlen kópiában fogja tartalmazni. A MAG értékes adatokat biztosít az összehasonlító genomika számára, beleértve filogenetikai fák készítését, funkcionális jellemzést és MAG abundanciák összehasonlítását a különböző mintákban (Quince et al., 2017).

A metagenomok taxonómiai jellemzése azonosítja, mely mikroba fajok vannak jelen a metagenomban és megbecsüli az abundanciájukat. Ezt elvégezhetjük összeszerelés nélkül, külső szekvencia-adatbázison keresztül, mint például a mindenki számára elérhető referencia genomok. Ez a megközelítés mérsékelheti az összeszerelési problémákat, felgyorsítja az adatfeldolgozást és lehetővé teszi az alacsony abundanciájú organizmusok jellemzését, amelyeket nem lehet *de novo* összeszerelni. Ennek a megközelítésnek a legfőbb korlátja, hogy a korábban nem jellemzett mikrobákat nehéz jellemezni/bemutatni. Viszont az elérhető referencia genomok száma gyorsan nő, évente több ezer genommal. A readok egyszerű, genomokra történő térképezése sok hibás pozitív eredményt adhat, de ez a megközelítés hatékonynak bizonyul, ha az eredményt a legközelebbi közös ő (lowest common ancestor LCA) alapján (Huson et al., 2011) utólag feldolgozzuk vagy társítjuk interpolált Markov modellel (Brady & Salzberg, 2009). A Kraken szintén az LCA-t használja, de felgyorsítja az adatfeldolgozást azzal, hogy a szekvencia térképezést *k*-mer egyezéssel helyettesíti (Quince et al., 2017).

3 Célkitűzés

Munkám során célként tűztem ki a cellulóz tartalmú alapanyagokból történő biogáz termelés hatékonyságának javítását a következő stratégia alapján:

:

- Termofil anaerob fermentációban résztvevő mikroba konzorcium hozzászoktatását a cellulóz szubsztráthoz a közösségben jelen levő cellulózbontók dúsításával.
- A dúsítással létrehozott stabil cellulózbontó mikroba közösség izolálása, jellemzése, fenntarthatósága.
- A biogáz ipari mezőgazdasági melléktermék alapanyagok (kukoricaszár és napraforgószár) biometán potenciáljának vizsgálata mezofil és termofil körülmények között, illetve hozzáadott cellulózbontó törzsek fermentációra gyakorolt hatásának megfigyelése.
- A biogáz termelés fokozása az izolált cellulózbontó mikroba közösségekkel.
- Annak vizsgálata, hogy a legnagyobb mennyiségben jelen lévő törzsek egyenként bejuttatva elegendőek-e az optimális lignocellulóz lebontáshoz és ebből következően a metántermeléshez.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Tápoldatok és törzsek

A DSMZ-től (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Germany) vásárolt törzseket és a tenyésztéshez ajánlott tápoldatokat az alábbi táblázat tartalmazza.

Törzs	Új név	DSM azonosító	DSMZ tápoldat száma
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>		DSM 8903	640
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>		DSM 571	61
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>		DSM 2355	144
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>subterraneus</i>		DSM 13054	899
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i>	DSM 5812	520
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>	DSM 1237	122

1. táblázat. Felhasznált törzsek és tápoldatok

4.1.1 DSMZ 640 tápoldat (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*)

NH ₄ Cl	0,9 g
NaCl,	0,9 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g
K ₂ HPO ₄	1,55 g
Trypton	2 g
Élesztő kivonat	1 g
Nyomelem-oldat SL-10	1 ml
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	2,5 mg
D-cellobióz	1 g
L-Cisztein-HCl x H ₂ O	0,75 g
Resazurin	0,5 mg
Desztillált víz	1000 ml
A pH-t 7,2 értékre állítottam be.	

4.1.1.1 Nyomelem oldat SL-10:

HCl (25%; 7,7M)	10 ml
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 g
ZnCl ₂	70 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg

NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg
Desztillált víz	990 ml

Először a FeCl₂-t oldottam fel a HCl-ban, majd vízben kihígítottam. Ezután adtam hozzá a többi sót, végül desztillált vízzel kiegészítettem 1000 ml-re.

4.1.2 DSMZ 61 tápoldat (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)

Trypton	10 g
Szacharóz	10 g
Élesztő kivonat	2 g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,20 g
Na ₂ SO ₃	0,2 g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	0,08 g
Resazurin	1 mg
Desztillált víz	1000 ml
A pH-t 6,8-7,8 közé állítottam be.	

4.1.3 DSMZ 144 tápoldat (*Thermoanaerobacter pseudethanolicus*)

NH ₄ Cl	0,9 g
NaCl,	0,9 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
Nyomelem oldat	9 ml
Élesztő kivonat	1 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3 mg
Resazurin	1 mg
Vitamin oldat	5 ml
Élesztő kivonat	3 g
Trypton	1 g
Glükóz	5 g
Desztillált víz	1000 ml
Az oldat pH értékét 7,2-7,4 közé állítottam be	

4.1.3.1 Nyomelem oldat

Nitrilotriecetsav	12,8 g
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	0,2 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,17 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,1 g
CuCl ₂	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,026 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3 mg
NaCl	1 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,02 g
Desztillált víz	1000 ml
A pH-t 6,5-ös értékre állítottam be.	

4.1.3.2 Vitamin oldat

Biotin	2 mg
Folsav	2 mg
Piridoxin HCl	5 mg
Tiamin HCl x 2 H ₂ O	5 mg
Riboflavin	5 mg
Niacin	5 mg
D-Ca-pantoténsav	5 mg
Vitamin B ₁₂	0,1 mg
p-amino-benzoésav	5 mg
Liponsav	5 mg
Desztillált víz	1000 ml

4.1.4 DSMZ 899 tápoldat (*Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *subterraneus*)

NH ₄ Cl	1 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 g
L-Cisztein-HCl x H ₂ O	0,5 g
KCl	0,2 g
NaCl,	0,6 g
Nyomelem oldat	10 ml
Élesztő kivonat	2 g
Glükóz	4 g
NaHCO ₃	4 g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	2,5 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,45 g
Resazurin	0,5 mg
Desztillált víz	1000 ml
A pH-t 7-re állítottam be.	

4.1.4.1 Nyomelem oldat

Nitrilotriecetsav	1,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3 mg
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,3 mg
Desztillált víz	1000 ml
Az oldat pH-ját 7-re állítottam be.	

4.1.5 A cellulózbontó mikrobák izolálásához és tenyésztéséhez használt tápoldat

KH ₂ PO ₄	2,7 g
K ₂ HPO ₄	3,5 g
NH ₄ Cl	0,53 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,08 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
Élesztő kivonat	0,2 g
KI	0,01 g
Resazurin	1 mg
L-Cisztein-HCl x H ₂ O	0,75 g
Nyomelem oldat SL-10	1 ml
D-cellobióz	1 g
α-cellulóz	2 g
Karboximetil-cellulóz	2 g
Desztillált víz	1000 ml
A pH-t 7,2-es értékre állítottam be.	

4.1.6 DSMZ 520 tápoldat (*Ruminiclostridium cellulolyticum*):

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
K ₂ HPO ₄	2,66 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	75 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O oldat (1% w/v 0,1N H ₂ SO ₄ -ben)	125 µl
Nyomelem oldat SL-10	1 ml
Élesztő kivonat	2 g
D-cellobióz	6 g
L-Cisztein-HCl x H ₂ O	0,5 g
Desztillált víz	1000 ml
Az oldat pH-ját 7,2-re állítottam be	

4.1.7 DSMZ 122 tápoldat (*Hungateiclostridium thermocellum*):

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,6 g
KH ₂ PO ₄	1,43 g
K ₂ HPO ₄	5,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,13 g
Na ₂ -β-glicerol foszfát x 4 H ₂ O	6 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O oldat (1% w/v 0,1N H ₂ SO ₄ -ben)	1,1 ml
L-Glutation (redukált)	0,25 g
Élesztő kivonat	4,5 g
Resazurin	0,5 mg
Cellobióz	5 g
Desztillált víz	1000 ml
A pH-t 7,0-7,2 közé állítottam be.	

4.1.8 Fiziológias sóoldat:

NaCl	9 g
Desztillált víz	1000 ml

4.1.9 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903

4.1.10 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571

4.1.11 *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *subterraneus* DSM 13054

4.1.12 *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* DSM 2355

4.1.13 *Ruminiclostridium cellulolyticum* DSM 5812

4.1.14 *Hungateiclostridium thermocellum* DSM 1237

4.2 A dúsításhoz és biogáz fermentációhoz használt oltóiszapok

A dúsítási/izolálási folyamathoz az oltóiszap egy termofil biogáz üzemből (Bátortrade Kft., Nyírbátor) származott, amit különböző növényi biomasszával, baromfitrágyával és pasztórizált vágóhídi hulladékkal tápláltak. A mezofil biogáz üzemből származó iszapot, amely sertéshígtágyát és silókukoricát használ szubsztrátként (Zöldforrás Kft., Szeged), 2 hétig 55 °C-on inkubáltam a termofil kísérleteket megelőzően, hogy a benne található mikroba konzorcium adaptálódjon a termofil körülményekhez. Ezt a közösséget használtam oltóiszapként a bioaugmentációs kísérletekben.

4.3 Cellulózbontó konzorcium dúsítása és izolálása

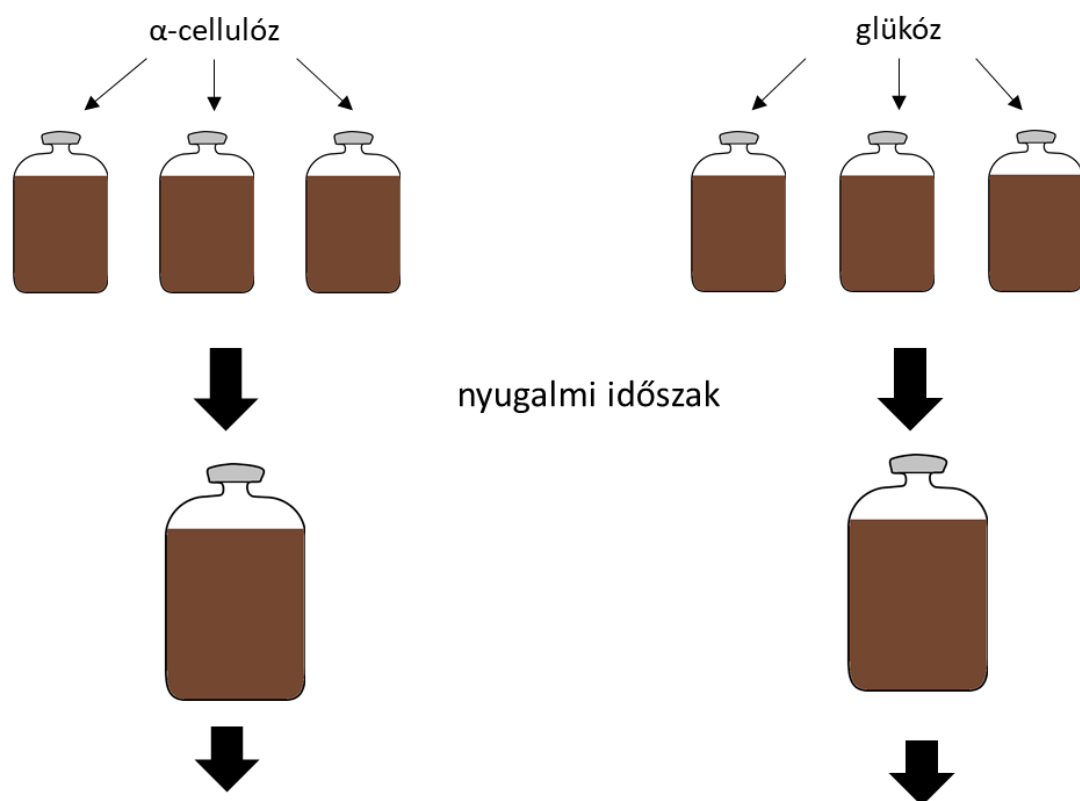
4.3.1 Első dúsítási lépés

Az első dúsítási lépés 500 mL térfogatú szérum üvegekben történt. Minden üveget butil gumi szeptummal és alumínium gyűrűvel zártam le és a légterét nitrogén gázzal átfúvattam, hogy anaerob környezetet hozzak létre. Az üvegekbe 400 mL iszapot töltöttem (Bátortrade Kft.). Szénforrásként α -cellulózt, illetve glükózt adtam a rendszerhez. A kezdeti 1 g/L heti szubsztrát bevitelt fokozatosan 10 g/L-re növeltem a 10. hétre, viszont utána 6 g/L-re csökkentettem a megemelkedett illékony szerves sav koncentráció miatt. Ezután egy nyugalmi időszak következett, hogy a felhalmozódott szerves savak mennyisége lecsökkenjen. Az első dúsítási lépés három párhuzamossal zajlott 55°C-on és az üvegeket naponta egyszer manuálisan megkevertem. Az első dúsítási szakasz 15 hétig tartott, amelyet egy négy hetes nyugalmi időszak követett.

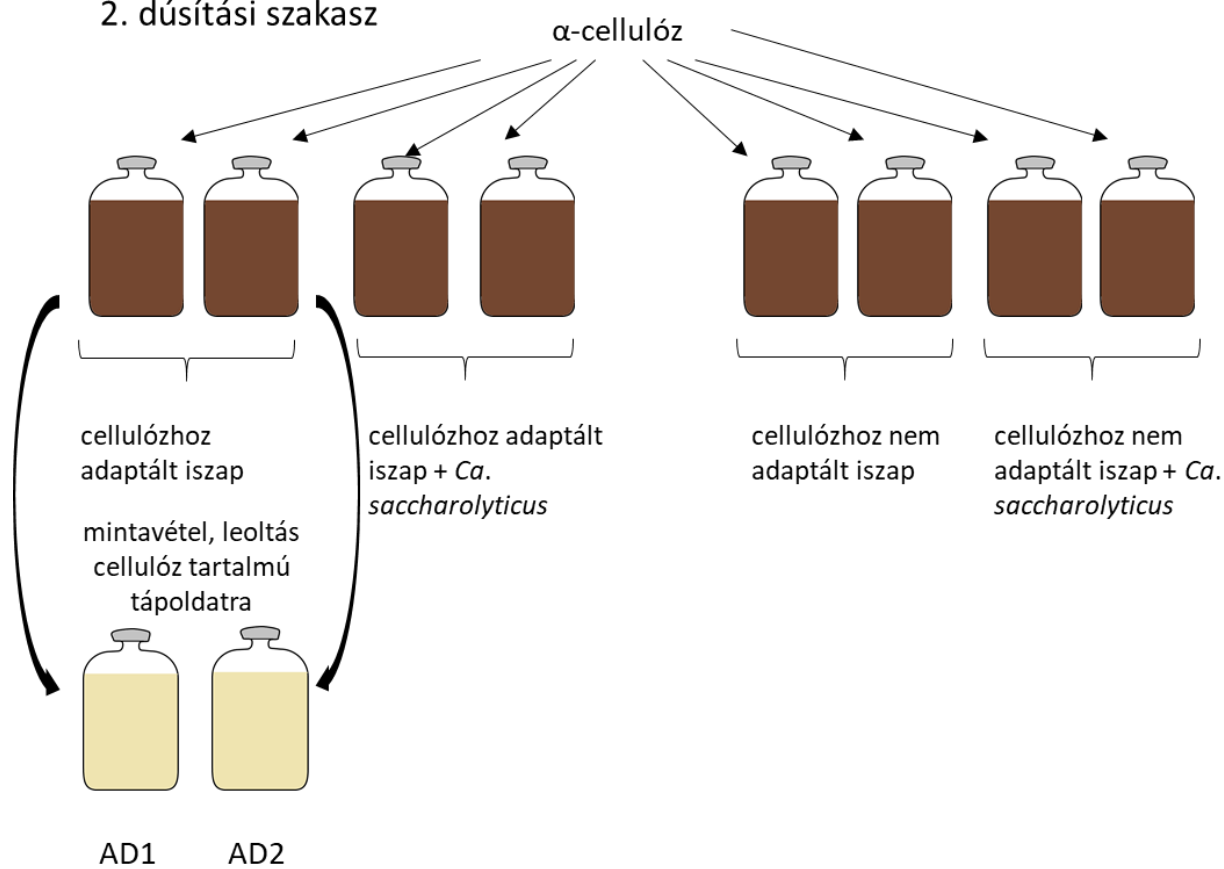
4.3.2 Második dúsítási lépés és izolálás

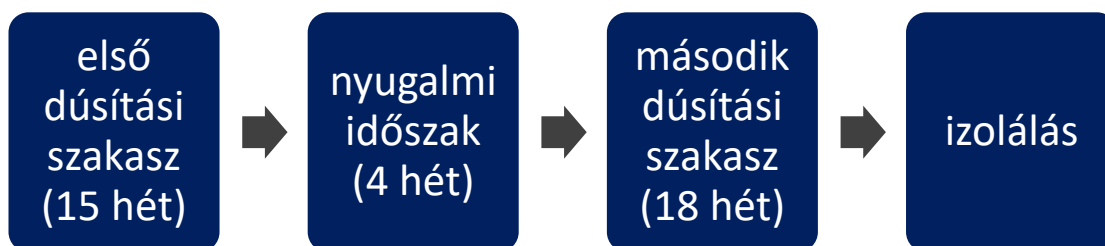
A második dúsítási lépésben az első szakaszból származó, nyugalmi időszakon átesett biogáz termelő kultúrát használtam oltóiszapként. A cellulózhoz történő adaptáció második fázisában olyan fermentációkat is összeállítottam amelyekhez *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*-t adtam, hogy összehasonlítsam a dúsított és ennek a cellulózbontó kultúrának a teljesítményét, amelynek a termofil bioaugmentációs képessége ismert (Kovács et al., 2013). Ebben a kísérleti összeállításban, az üvegek 190 mL oltóiszapot és 10 mL desztillált vizet, illetve *Ca. saccharolyticus* kultúrát ($1,8 \times 10^7$ CFU/mL) tartalmaztak. A hetedik héten ismét jutattam a fermentorokba friss *Ca. saccharolyticus* kultúrát. A heti szubsztrát bevitel 4 g/L α -cellulóz volt. A második dúsítási fázis két párhuzamossal zajlott 18 hétig 55°C-on és az üvegeket naponta egyszer manuálisan megkevertem. A második szakasz után mintát vettem a kezdetek óta α -cellulózzal táplált két fermentorból és a 4.1.5 pontban jellemzett tápoldatban tartottam fent az így létrejövő kevert cellulózbontó kultúrákat, amelyeket AD1 és AD2-nek neveztem el.

1. dúsítási szakasz



2. dúsítási szakasz

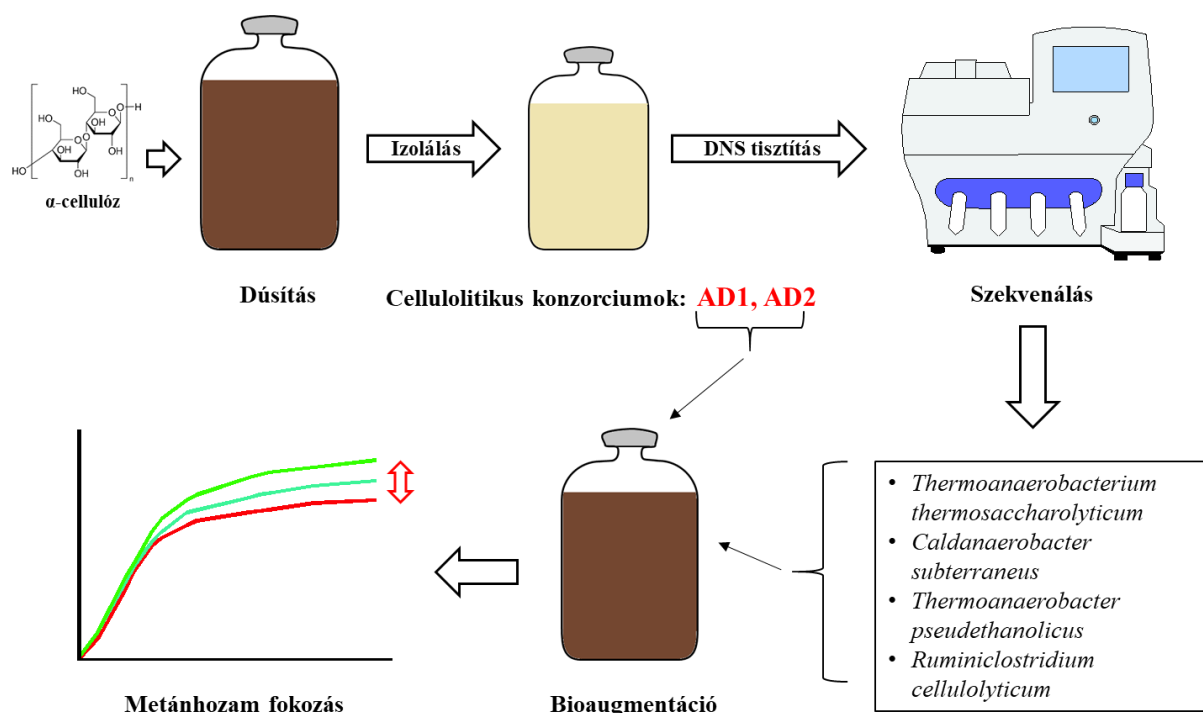




3. ábra. A dúsítás és izolálás folyamatábrája

4.4 Bioaugmentáció kevert cellulózbontó konzorciumokkal

Ezután megvizsgáltam a cellulózbontó konzorciumok (AD1 és AD2) bioaugmentációs hatását. A 125 mL-es szérum üvegek 60 mL folyadék fázist tartalmaztak: 50 mL oltóiszap (Zöldforrás Kft., 4.2. fejezet) és 10 mL AD1, illetve AD2 ($4,6 \times 10^8$ sejt/mL) vagy steril desztillált víz. Ezekben a kísérletekben kukoricaszárat használtam szubsztrátként 8 g VS/L adagolásban. A kukoricaszárat egy helyi termőföldről gyűjtöttem be és 55 °C-on kiszárítottam. A száraz kukoricaszárat mechanikailag előkezeltem <2 mm-es szemcseméretűre egy Retsch SM 100 késes aprítóval, majd szobahőmérsékleten tároltam fénytől és nedvességtől elzártan.



4. ábra. A dúsítási, izolálási és bioaugmentációs kísérletek folyamatábrája

4.5 Kukorica- és napraforgószár fermentációja mezofil és termofil körülmények között

Ezekben a kísérletekben a kukoricaszár mellett napraforgószárat is használtam szubsztrátként. A napraforgószárat hasonlóan a kukoricaszárhoz egy helyi termőföldről gyűjtöttem be és a 4.4 pontban leírtakkal megegyezően kezeltem és tároltam.

A fermentációkat 125 mL szérum üvegekben állítottam össze 60 mL végtérfogatban. A fermentorok 45 mL oltóiszapot és 15 mL fiziológias sóoldatot tartalmaztak. A szubsztrát bevitel 8 g VS/L volt.

4.6 Kukorica- és napraforgószár előkezelésének és bioaugmentációjának összehasonlítása

A bioaugmentációs és előkezelési kísérlet esetén a felnövesztett *Ruminiclostridium cellulolyticum* és *Hungateiclostridium thermocellum* kultúrákat lecentrifugáltam (10000 rpm, 10 perc, 4°C), leöntöttem a felülúszót és a sejteket fiziológias sóoldatban szuszpendáltam fel. Ezzel a lépéssel eltávolítottam a növesztéshez használt tápoldatot és elkerültem, hogy a szubsztráton kívül további szénforrást juttassak a fermentorba. Továbbá az eredeti sejt kultúrájánál töményebb kultúrával dolgozhattam. Ebből a töményebb baktérium kultúrából 6 mL került a fermentorokba. A tömény sejt kultúra a *R. cellulolyticum* esetén $3,1 \times 10^9$ sejt/mL, a *H. thermocellum* esetén $4,2-5,9 \times 10^9$ sejt/mL koncentrációjú volt. A szubsztrát előkezelése négy napig tartott 15 mL fiziológias sóoldatban, a *R. cellulolyticum* esetén 37°C-on, míg a *H. thermocellum* esetén 55°C-on rázatás nélkül, anaerob körülmények mellett.

4.7 Analitikai módszerek

Az illékony zsírsavak (VFA, volatile fatty acid) mennyiségét nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) határoztam meg (Hitachi Elite, IC Sep ICE-COREGEL 64H kolonna és Refraktív index (RI) detektor L2490) a következő paramétereket használva: eluensként 0,05 M H₂SO₄-t alkalmaztunk, 0,8 mL/perc áramlási sebesség mellett, a kolonna hőmérséklete 50°C, a detektor hőmérséklete 41°C volt. A tíz pontos kalibráció ismert koncentrációjú HPLC tisztaságú szerves savakkal történt.

A keletkező biogáz metántartalmát gázkromatográf segítségével határoztam meg (6890N Network GC System, Agilent Technologies). Ehhez kezdetben egy „nyitott” Hamilton fecskendő segítségével vettem mintát a gáztérből. A bioaugmentáció és előkezelés hatásának összehasonlításához végzett kísérleteknél már egy gázzáró fecskendőt használtam a mintavételhez, ebből ered, hogy azonos szubsztrát esetén magasabb metánhozamot figyelhetünk meg, mint korábban. A gázkromatográf 5 Å molekulaszűrő kolonnával (30 m

hosszú, I.D. 0,53 megabore, film 25 μm) és hővezetőképességi detektorral (TCD) van felszerelve. Nitrogént, illetve a későbbiekben argont használtam vivőgázként. A kapott értékből kalibrációs egyenes segítségével számoltam ki a mintában levő metán mennyiségét.

A szárazanyag tartalom meghatározásához a mintákat kerámia téglékbe helyeztem, majd lemértem. 105°C-on szárítottam egy éjszakán át és így is lemértem a tömegüket. A száraz és nedves tömeg hányadosából következtettem a minta szárazanyag tartalmára. A szerves szárazanyag tartalom meghatározásához a kiszáradt anyagot 550°C-on hevítettem 2 órán keresztül. Ez alatt a mintában található szerves anyagok elégnék és csak a szervesetlen hamu marad vissza. Az égetés után kapott értéket kivontam a száraz minta tömegéből majd ezt osztottam a száraz tömeggel. Az így kapott eredmény a szerves szárazanyag tartalom.

A minták C és N tartalmát Elementar Analyzer Vario MAX CN (Elementar Analysensysteme GmbH) készülékkel mértem. Mérés során a műszer a mintákat elégeti és a keletkező CO₂ és N tartalmú gázok mennyiségéből következtet a minta C és N tartalmára (égési hőmérséklet: 900°C, égés utáni hőmérséklet: 900°C, redukciós hőmérséklet: 830°C, kolonna hőmérséklet: 250°C). A berendezés TCD detektor segítségével határozza meg a minta összetevőit. A minták égetése 4.5-ös tisztaságú oxigénnel történt, a vivőgáz 5.0-ás tisztaságú hélium.

A keletkező biogáz mennyiségét vízkiszorításos technikával mértem, az ideális gáztörvény használatával, a mért értéket átszámítottam normál állapotra vonatkoztatva (normál hőmérséklet: 273K és normál légköri nyomás: 1013 mbar) (Yuan et al., 2014).

4.8 Enzimaktivitás mérés

A β -glükózidáz aktivitás méréséhez szubsztrátként 4-nitrofenil- β -D-glükopiranozidot (pNPG) használtam. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: a 2 mL reaktorból származó mintához centrifugálás után 750 μL nátrium-acetát puffert (pH 5) és 250 μL pNPG-t (20 mM) adtam. A mintákat 55°C-on inkubáltam 30 percig. Az exoglukanáz aktivitás méréshez szubsztrátként 4-nitrofenil- β -D-cellobiozidot (pNPC) használtam. Az enzimatis reakció az alábbi összetevőket tartalmazta: a 2 mL reaktorból származó mintához centrifugálás után 950 μL nátrium-acetát puffert (pH 5), 25 μL glükonolaktont (20 mM) és 25 μL pNPC-t (20 mM) adtam. A glükonolakton megakadályozza, hogy a β -glükózidáz hidrolizálja a pNPC-t (Gao et al., 2011). A mintákat 55°C-on inkubáltam 3 óráig. Mindkét esetben a keletkező p-nitrofenol mennyiségét spektrofotometriásan 400 nm-en mértem 200 μL 1M Na₂CO₃ hozzáadása után.

4.9 DNS izolálás

Az első szekvenáláshoz a teljes genomi DNS-t egy módosított cetil-trimetil-ammonium-bromid (CTAB)-alapú módszerrel vontam ki 10 mL cellulózbontó konzorciumból (Ács et al., 2015). A második szekvenáláshoz a DNS-t Zymo Research Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Kit-tel izoláltam négy külön növesztésből, majd az így kapott DNS mintákat szekvenálás előtt egyesítettem. A tisztított DNS koncentrációját spektrofotometriásan mértem (NanoDrop ND-1000 Technologies), és az integritását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

4.10 Újgenerációs DNS szekvenálás

A szekvenálás Ion Torrent PGM 316 chip (Thermo Fisher Scientific) használatával történt az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Szekvenáló Laboratóriumában. Az első szekvenálás során nyert szekvenciákat az MG-RAST programcsomag használatával értékeltük ki (Meyer et al., 2008). Az MG-RAST szerver az eredményeket számos referencia adatállománnyal összevetve szolgáltatja (NCBI M5nR) (Wilke et al., 2014, Wirth et al., 2015). A második szekvenálás után kapott eredményeket a Kraken programcsomag (Wood & Salzberg, 2014) segítségével értékeltük ki, illetve a korábbi szekvenálást is újra kiértékeltek a jobb összehasonlíthatóság érdekében. A Kraken a szekvenciák azonosításához a *k*-merek a legközelebbi közös őshöz térképezi. Az azonosításhoz az NCBI RefSeq taxonómiai adatbázisát használja. A 230-270 bp hosszúságú readeket CLC bio program segítségével szereltük össze 500-1000 nukleotid hosszúságú contigokká. A readek hosszának legalább 50%-ban átfedőnek kell lenniük egymással, 80%-os pontossággal. (CLC bio beállítások: Mismatch cost 2, Length fraction 0,5, Similarity fraction 0,8, Insertion cost 3, Deletion cost 3). 0,7-es konfidencia értékkel szűrtük a kapott eredményeket. A nyers readek contigokká szerelése MEGAHIT-tel történt, az alapbeállításokat használtuk, kivéve a minimum contig hossz esetén, amely 1000 nukleotid volt. A MEGAHIT egy *de novo* összeszerelő, amely képes nagy és komplex metagenomikai adatok idő- és költséghatékony összeszerelésére (Li et al., 2015). Az összeszerelt contigokat az Anvi'o segítségével vizsgáltuk. Az Anvi'o egy fejlett, 'omikai adatokat elemző és ábrázoló platform. A metagenomikai adatállomány előkészítéshez az anvi'o-val történő vizsgálat előtt szükség van a mintákban lévő rövid readek összeszereléséhez, hogy létrehozzunk közösségi contigokat. Ezt követi az egyéni mintákban lévő rövid readek visszatérképezése ezekre a contigokra. A közösségi contigok FASTA fájlja és a BAM fájlok, amelyek a térképezés eredményét tartalmazzák, adják az anvi'o számára a kiindulási adatot. A metagenomikai minták anvi'o-val történő vizsgálata jellemzően a következő lépésekből áll: (1) egy contig adatbázis létrehozása, (2) minden minta jellemzése egyenként és az egyedi

jellemzések összeolvasztása/egyesítése, (3) az eredmények interaktív ábrázolása, a felhasználó által végzett binelés, vagy az automaikusan azonosított binek finomítása, és (4) az eredmények összegzése (Eren et al., 2015). A HMMER a Pfam adatbázisból (kurált fehérje adatbázis) azonosítja a szekvenciákhoz tartozó fehérjét (El-Gebali et al., 2019). A Bowtie 2 mintánként visszatérképezi a readeket a contigokra (Langmead & Salzberg, 2012). Ebből készül egy profil, amelyet össze kell olvasztani, ezután megtörténik az automata binelés a CONCOCT-tal, illetve manuális binelést is alkalmaztunk. A CONCOCT egy olyan program, amely a contigokat számos mintán keresztül a szekvenciaösszetétel és lefedettség alapján csoportosítja genomokba (Alneberg et al., 2014). Az elemzésnél minimum 2000 nukleotid hosszúságú contigokat használtunk, hogy csökkentsük a fragmentált binek számát. A kapott eredményeket Kaiju segítségével annotáltuk. A Kaiju egy taxonómiai osztályozó program, amely a szekvenciákat egy mikrobiális fehérje-referenciaadatbázishoz hasonlítja. A Kaiju lefordítja a metagenomikai szekvencia readeket a hat lehetséges leolvasási keretté és az aminosav-szekvenciák egyezéseit keresi mikrobiális referencia genomokból származó annotált fehérje-adatbázisból (Menzel et al., 2016). CheckM ellenőrzi a genomok teljességét (Parks et al., 2015).

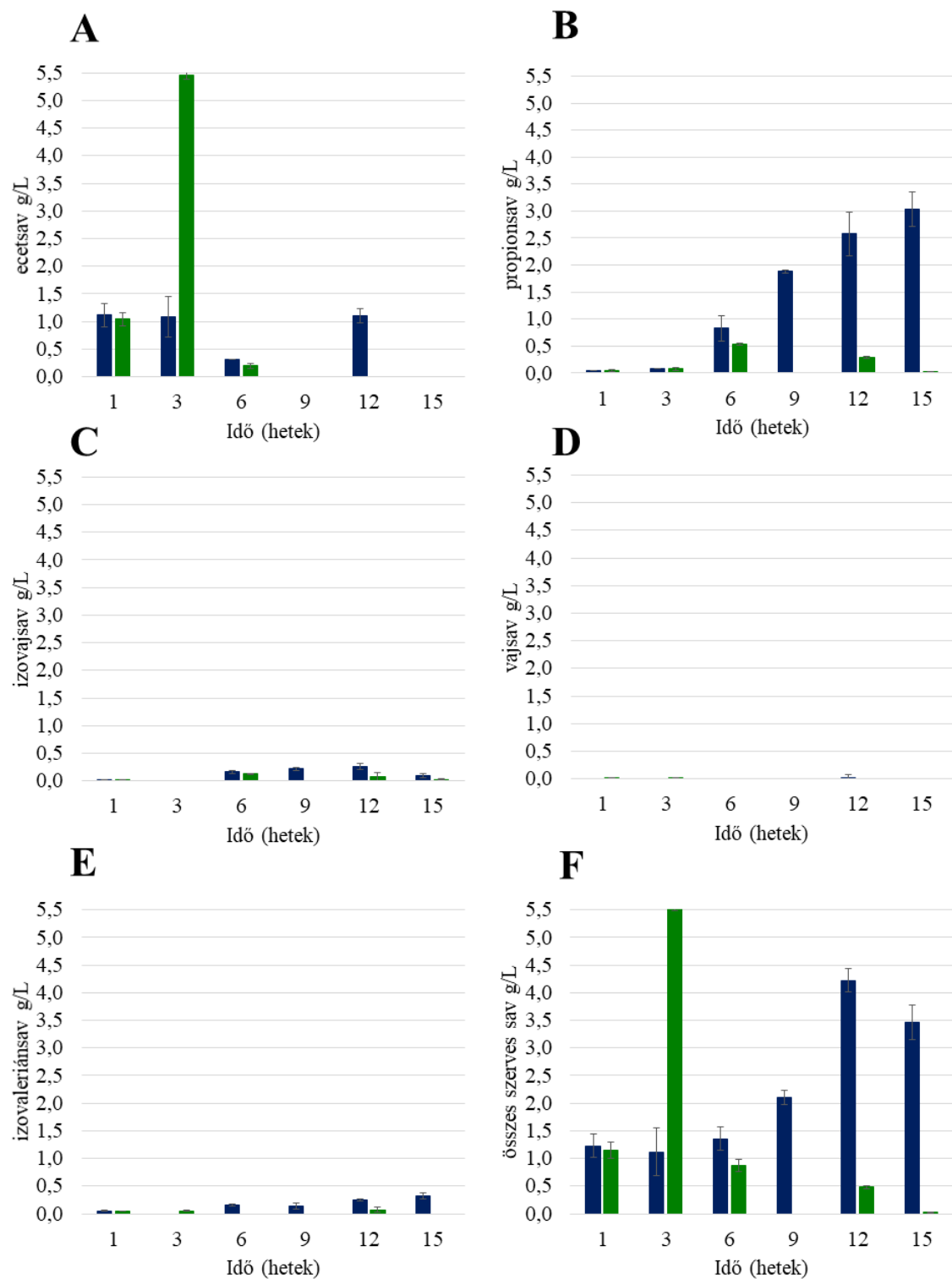
4.11 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist Student-féle t-eloszlás használatával végeztem (kétszélű, két mintás, nem egyenlő varianciájú). A különbségeket statisztikailag szignifikánsak tekintettem, ha $p < 0,05$ volt.

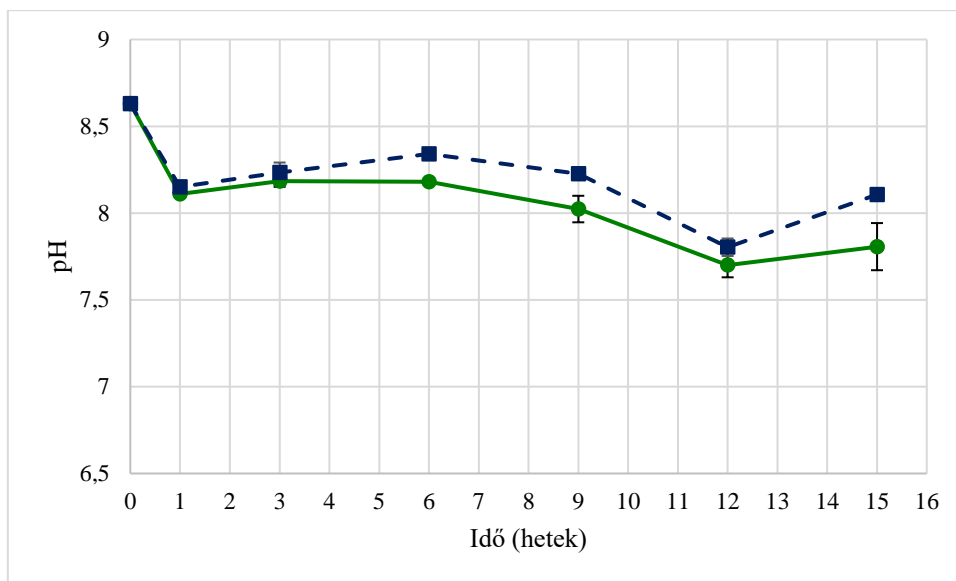
5 Eredmények és értékelésük

5.1 Cellulózbontó termofil konzorcium dúsítása

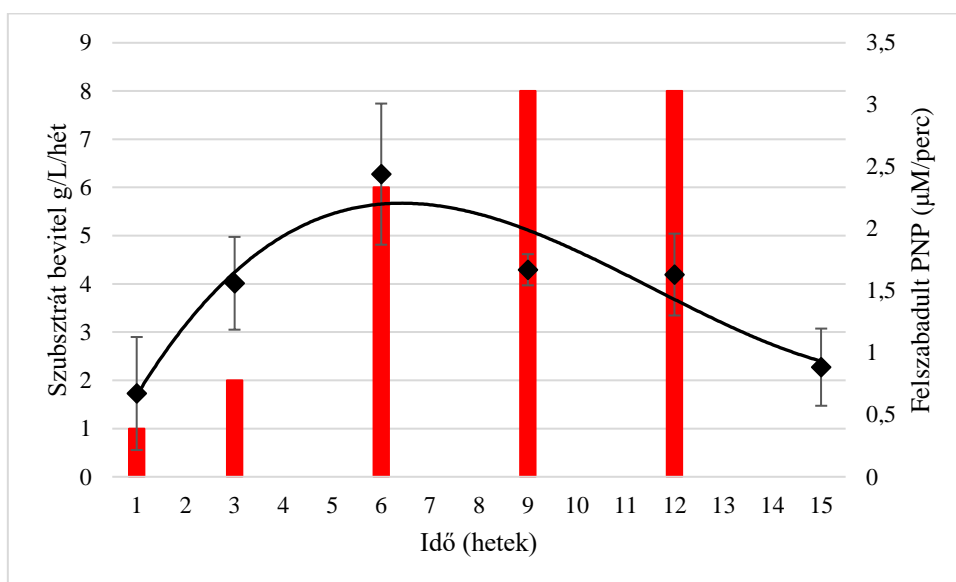
A lignocellulóz tartalmú biomassza anaerob lebontása során a hidrolízis a sebességmeghatározó lépés (Sawatdeenarunat et al., 2015). A hatékony lebontás érdekében a biogáz termelő mikroba konzorciumnak magas celluláz aktivitással rendelkező mikrobákra van szüksége. Ennek érdekében α -cellulóz szubsztrát segítségével kívántam feldúsítani az oltóiszapban (amely egy termofil biogáz üzemből (Bátortrade Kft., Nyírbátor) származott) jelen lévő cellulózbontó mikrobákat. Kontrollként glükózt használtam szénforrásként, mivel ez a mikrobák számára könnyen hasznosítható szubsztrát és a cellulóz láncot glükóz monomerek építik fel. Termofil hőmérsékleten gyorsabb a szerves anyagok átalakítása és magasabb a biogáz hozam. Annak érdekében, hogy nyomon kövessem a fermentáció megfelelő működését, az illékony zsírsav tartalom (5. ábra) és pH (6. ábra) változását rendszeresen monitoroztam a β -glükózidáz enzimaktivitással együtt (7. ábra), utóbbi tükrözi a cellulóz hidrolízisét. A folyamat során keletkezett biogáz mennyiségét a 8. ábra szemlélteti. Amikor az egyedüli szénforrásként glükózzal táplált fermentorok szubsztrátbevitelére elérte a 10 g/L értéket (10 hét), az illékony zsírsavak mennyisége (VFA), különösen a propionsav, 2 g/L feletti koncentrációt mutatott, ami már azt jelzi, hogy a biogáz termelésben résztvevő mikrobák közötti egyensúly felborult. Nielsen és mtsai. (2007) munkájukban megállapították, hogy a propionát kulcsparaméter a komplex szerves hulladékot kezelő biogáz üzemekben a folyamat kiegyensúlyozatlanságának jelzéséhez, és a biogáztermelő folyamat szabályozásához és optimalizálásához. Az eredményeik azt mutatták, hogy a metántermelés, pH vagy propionát:acetát arány nem használható egyetlen megbízható paraméterként a trágyát és ipari hulladékot együtt kezelő biogáz üzemekben a folyamatban bekövetkező zavar jelzésére. Wang és mtsai. (2009) azt találták, hogy amikor a propionsav koncentrációja elérte a 900 mg/L-t, az acidogén baktériumok aktivitása csökkent, amely hatására az illékony zsírsavak lebontási sebessége nagymértékben lelassult és ennek következtében az illékony zsírsavak felhalmozódtak. Bár az össz VFA tartalom a metanogének számára gátló küszöbérték felett volt (2.4.9 fejezet), láthatólag nem volt hatással sem a pH-ra sem a biogáz termelésre, ami azt mutatja, hogy a rendszer jó pufferkapacitással rendelkezett. A cellulóz fermentációja esetén az 1 g szerves szárazanyagból keletkezett biogáz mennyisége 304 ± 26 mL, míg glükóz esetén 276 ± 2 mL volt (8. ábra).



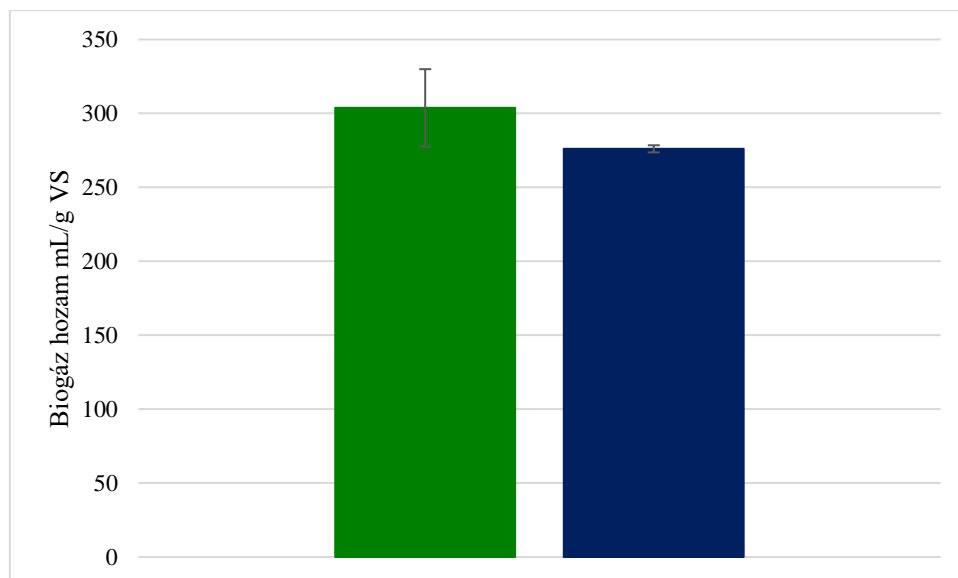
5. ábra A-F. VFA koncentrációk (A - ecetsav, B - propionsav, C - izovajsav, D - vajsav, E - izovaleriánsav, F - összes szerves sav) változása az első dúsítási lépés alatt, glükóz (kék oszlop) vagy α -cellulóz (zöld oszlop) szubsztrát esetén. Az értékek három párhuzamos minta átlagai és a hibásávok a sztenderd szórást jelzik.



6. ábra. pH változás glükóz (kék, szaggatott vonal) illetve cellulóz (zöld, folytonos vonal) szénforrás esetén. A heti szubsztrát bevitt fokozatosan 10 g/L-re növeltem a 10. hétig, utána visszacsökkenttem 6 g/L/hétre.



7. ábra. β -glükozidáz enzim aktivitás változás a cellulóz adaptáció alatt (♦). Növekvő aktivitást figyelhetünk meg a magasabb szubsztrát felhasználás esetén és az aktivitás csökkenését láthatjuk az alacsonyabb vagy hiányzó szubsztrát terhelés (piros oszlop) alatt.



8. ábra. A cellulóz (zöld) és glükóz (kék) fermentáció biogáz hozamai: 304 ± 26 mL, illetve 276 ± 2 mL/g VS ($p > 0,05$)

Siegert és Banks (2005) cellulóz és glükóz anaerob lebontását tanulmányozta hasonló batch reaktorokban. Kísérletükben a cellulóz és glükóz biogáz hozama 287 mL/g, illetve 126 mL/g szubsztrát volt abban az esetben, amikor nem adtak illékony zsírsavakat a rendszerhez. Vizsgálták, hogy milyen hatással van a fermentációra a különböző mennyiségben hozzáadott illékony zsírsavak mennyisége. A cellulolitikus aktivitást, így a cellulóz hidrolízisét ≥ 2 g/L koncentrációban gátolták az illékony zsírsavak. A glükóz esetén 4 g/L feletti zsírsav koncentráció némileg gátolta a fermentációt, 8 g/L felett a biogáz termelés felére csökkent. Ez azt mutatja, hogy a glükóz fermentációja kevésbé volt érzékeny az illékony zsírsavak okozta gátlásra. Általánosan elfogadott megállapítás, hogy a propionsav gátló hatása a metanogenezisre erősebb, mint az ecet- vagy vajsavé. Az általam mért biogáz hozamok elérték és meg is haladták a Siegerték által megfigyelt értékeket, viszont a Richards és mtsai. (1991) által tapasztalt 604 ± 6 és 630 ± 6 mL/g VS értékeknek csupán a 48-50% volt, amelyet a cellulóz és cirok termofil fermentációja során mértek.

A második dúsítási lépésben új fermentációkat indítottam az előző szakaszból származó cellulózhoz adaptált (dúsított) és nem adaptált (glükózzal táplált) iszap felhasználásával annak érdekében, hogy megvizsgáljam vajon az első dúsítási lépés sikeres volt-e? A második dúsítási lépéshez használt iszap paramétereit a 2. táblázat mutatja, szénforrásként minden fermentor esetében α -cellulózt használtam. A fermentáció megfelelő működésének nyomon követésére mértem az illékony zsírsavak koncentrációit (9. ábra), pH-t (10. ábra), biogáz hozamot (11. ábra). A cellulóz hidrolízis hatékonyságát az exoglükánáz (12. ábra) és β -glükozidáz (13. ábra) enzimek

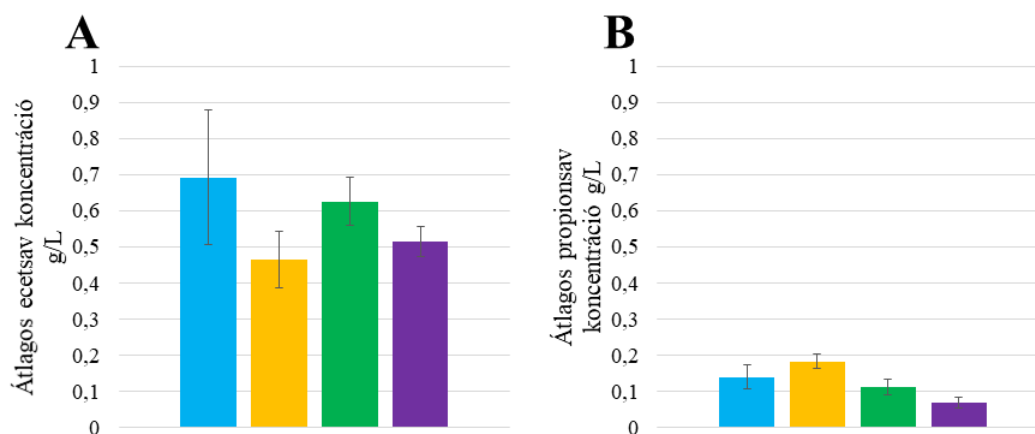
aktivitásával monitoroztam. A *Ca. saccharolyticus*-t, egy celluláz aktivitással rendelkező termofil, hidrogén termelő baktériumot használtam pozitív kontrollként. A *Ca. saccharoliticus* egy anaerob, Gram-pozitív baktérium, amelyet Új Zélandon egy termálforrásból izoláltak. Hőmérsékleti optimuma 70 °C. Sokféle szénhidrátot képes hidrolizálni, például a cellulózt, hemicellulózt, pektint, α -glükánt, β -glükánt, hogy ecetsavat, tejsavat, hidrogént és CO₂-ot állítson elő (Van De Werken et al., 2008). Erről a baktériumról már korábban bizonyítást nyert, hogy alkalmas a biogáz fermentáció bioaugmentációjára (Bagi et al., 2007). A kísérlet során a szerves sav koncentrációk (9. ábra) és pH értékek (10. ábra) az optimális tartományon belül (2.4.3 és 2.4.9 fejezetek) maradtak. A 10. ábra látható, hogy a fermentációs folyadékok pH értékei az adaptált, illetve nem adaptált oltóiszapot tartalmazó fermentorok esetén együtt mozogtak, de az eltérő iszapot tartalmazó fermentorok esetén a nem adaptáltak értékei magasabbak. A 2. táblázatból láthatjuk, hogy a nem adaptált iszap illékony szerves sav (VOA) koncentrációja és pufferkapacitása (TAC) is kétszerese az adaptált iszapénak. Ez utóbbi paraméter miatt figyelhettünk meg magasabb pH értékeket a nem adaptált oltóiszapot tartalmazó fermentációk esetén. Az alacsonyabb pufferkapacitás az adaptált oltóiszap esetén azzal magyarázható, hogy az első dúsítási lépésben nagyobb térfogatú mintavétel történt ezekből a fermentorokból, mint a glükózzal táplált fermentorokból, az enzimaktivitás mérés miatt. Ez magyarázza az alacsonyabb szárazanyag tartalmat is. A kivett mennyiséget desztillált vízzel, illetve fermentációs folyadékkal pótoltam.

	pH	VOA	TAC	VOA/TAC	TS	VS
Adaptált	8,96	0,62	3,75	0,17	0,83	66,62
Nem adaptált	9,17	1,22	7,94	0,15	1,18	65,17

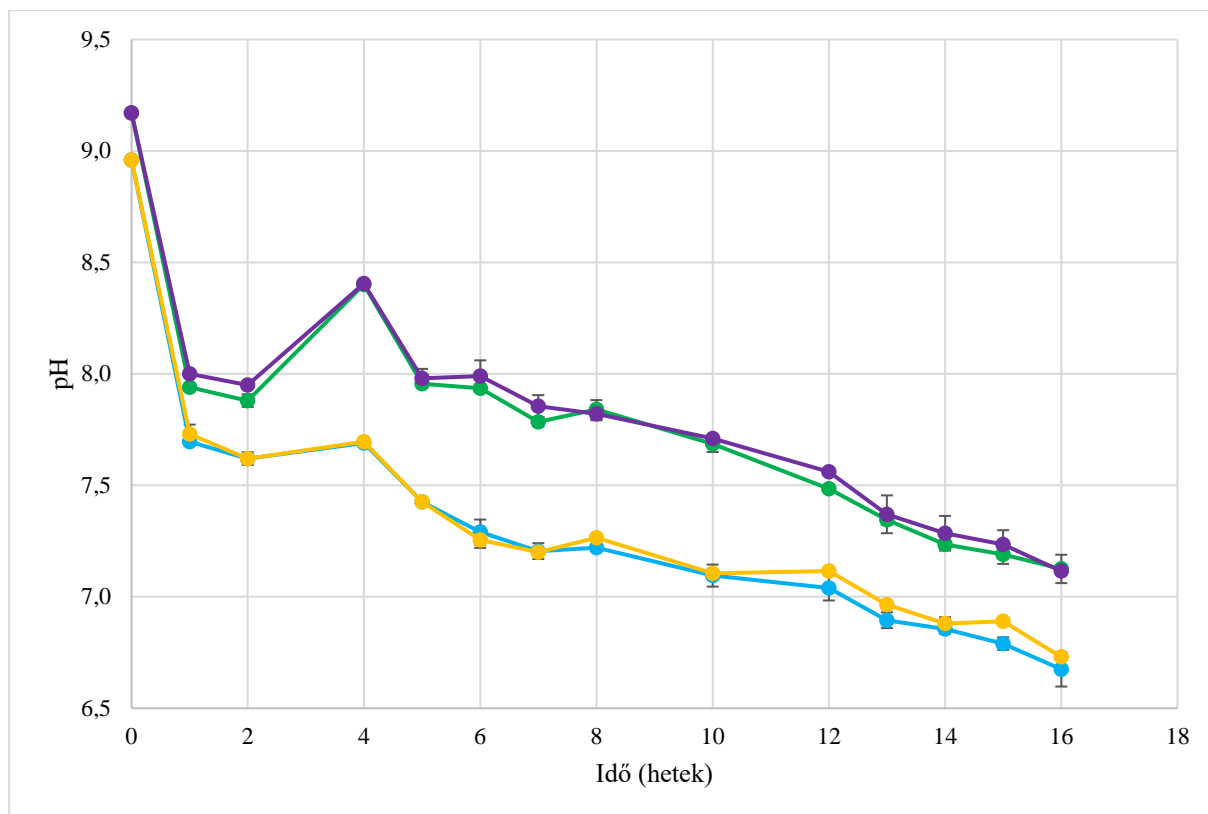
2. táblázat. A fermentációkhoz használt oltóiszap paraméterei a második dúsítási lépés kezdete előtt. VOA - illékony szerves sav koncentráció, TAC - pufferkapacitás, TS - szárazanyag tartalom, VS - szerves széntartalom

A *Ca. saccharolyticus* 11%-kal növelte a biogáz hozamot a nem adaptált reaktorokban, de azokban a reaktorokban, amelyek a cellulózhoz adaptált biogáz termelő konzorciumot tartalmazták a hatása elhanyagolható volt (11. ábra). Ez megerősíti, hogy az adaptáció sikeres volt: az adaptáció során a mikroba közösségben felhalmozódtak a cellulózt hatékonyan bontó törzsek, ezért a cellulolitikus *Ca. saccharoliticus* további adása már nem növelte a lebontás hatékonyságát. A *Ca. saccharolyticus* hozzájárulása nélkül az adaptált konzorcium 14%-kal több biogázt termelt, mint a nem adaptált (9. ábra). Ezek az értékek 65,3-79,8%-a a Richards

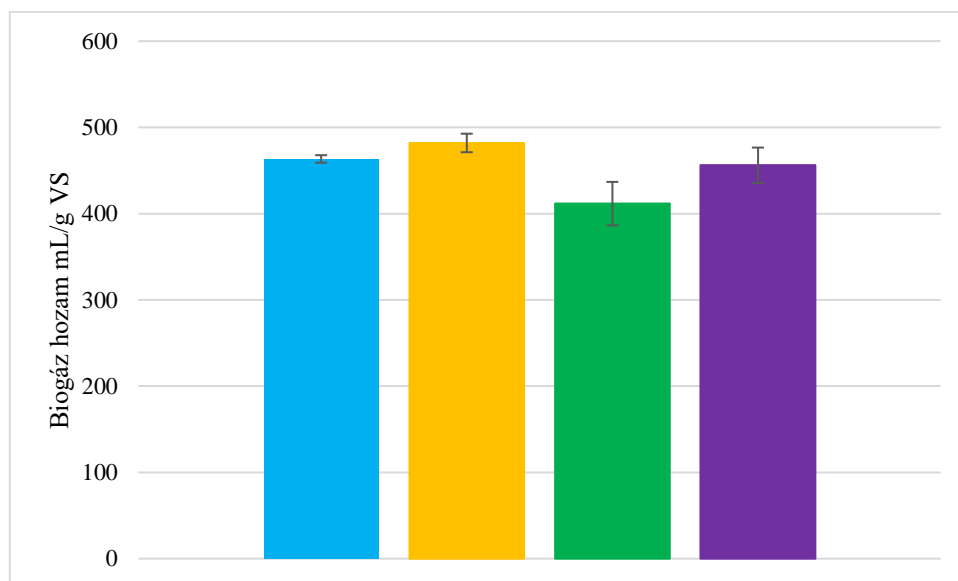
és mtsai. (Richards et al., 1991) által megfigyelt 604 ± 6 és 630 ± 6 mL/g VS értéknek. Az exoglukanáz enzimaktivitás a nem adaptált (az első dúsítási szakaszban glükóz szénforrással táplált oltóiszapot tartalmazó) fermentorok esetében volt a magasabb (12. ábra). A β -glükozidáz aktivitásban nem figyelhető meg különbség az adaptált és nem adaptált iszapot tartalmazó fermentorok között (13. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a cellulóz hatékony hidrolízisében a cellulóz láncból oligomereket lehasító exoglukanázok játszhatalnak fontosabb szerepet. A második dúsítás után az α -cellulózból keletkezett biogáz mennyisége 52%-kal megemelkedett az első szakaszban mért értékhez képest. Az eredmények igazolják, hogy a termofil mikrobiális közösség adaptációja a cellulózhoz sikeres volt és az általam dúsított kultúrák hasonló bioaugmentációs hatást értek el, mint a *Ca. saccharolyticus*. A kezdetek óta α -cellulózzal táplált két párhuzamos fermentorból izolált két dúsított kevert kultúrát AD1-nek és AD2-nek neveztem el és a későbbi bioaugmentációs kísérleteket ezek felhasználásával végeztem.



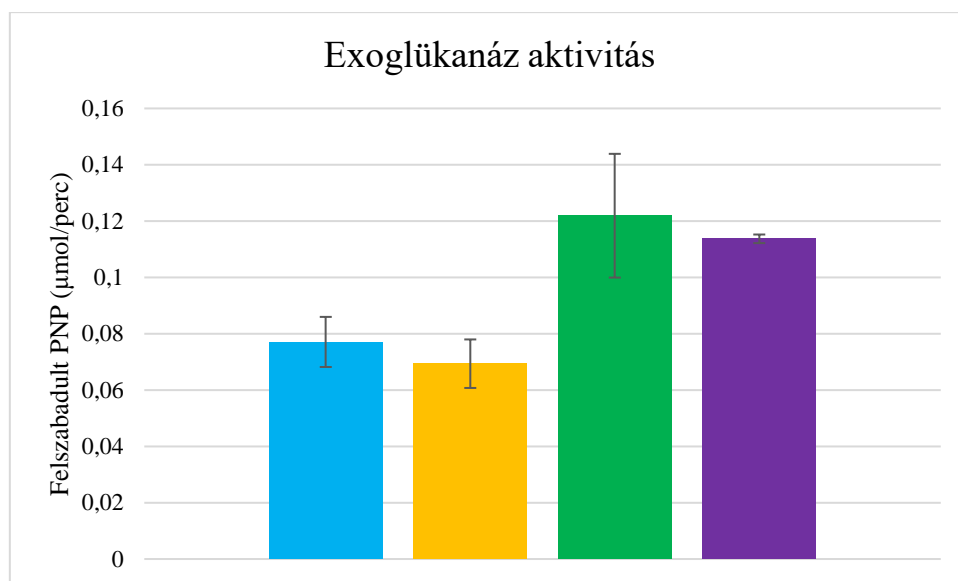
9. ábra A-B. Az ecetsav (A) és propionsav (B) mennyiségének változása a második dúsítási lépésben, adaptált (kék), adaptált+*Ca. saccharolyticus* (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+*Ca. saccharolyticus* (lila).



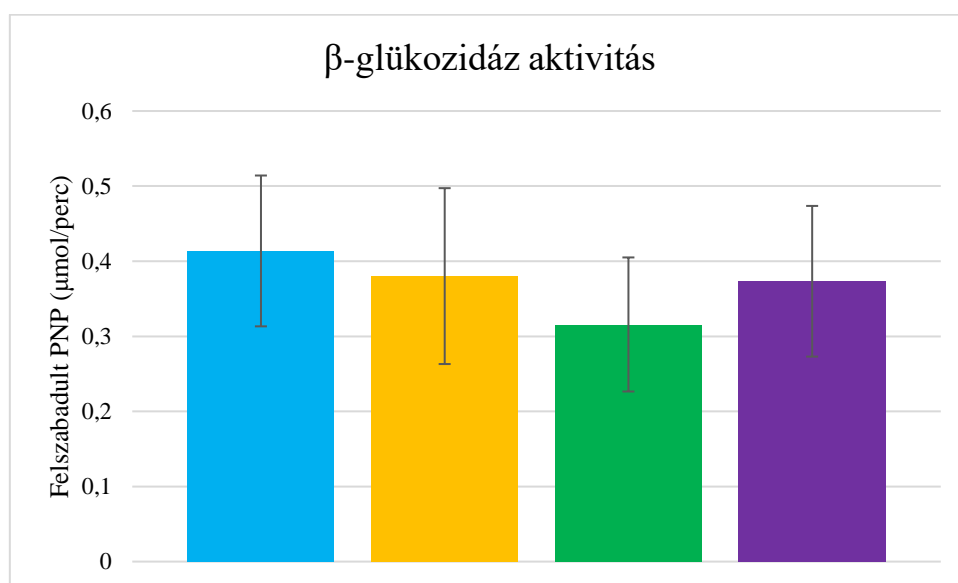
10. ábra. pH változás a második dúsítási folyamat során, adaptált (kék), adaptált+Ca. saccharolyticus (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+Ca. saccharolyticus (lila).



11. ábra. Biogáz termelés a második dúsítási szakaszban. Az első szakaszból származó dúsított oltóiszap Ca. saccharolyticus nélkül (kék) 463 ± 4 , és Ca. saccharolyticus-szal (sárga) 482 ± 11 , összehasonlítva a nem adaptált iszappal (zöld) 412 ± 25 és a nem adaptált iszap Ca. saccharolyticus-szal kiegészítve (lila) 456 ± 21 mL/g VS. ($p \leq 0,2$)



12. ábra. Exoglukanáz enzimaktivitás, adaptált (kék), adaptált+Ca. saccharolyticus (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+Ca. saccharolyticus (lila).



13. ábra. β-glükózidáz enzimaktivitás, adaptált (kék), adaptált+Ca. saccharolyticus (sárga), nem adaptált (zöld), nem adaptált+Ca. saccharolyticus (lila).

5.2 Metagenom analízis

A nagy teljesítményű szekvenáló megközelítések lehetővé teszik az egy mintában található minden mikroba analízisét, nem csak azokét, amelyet tenyésztetni lehet. Egy ilyen módszer, a shotgun metagenomika, a mintában jelenlévő minden („meta”) mikrobiális genom (ezt vizsgálja a „genomika”) nem célzott („shotgun”) szekvenálása. A shotgun szekvenálást

használhatjuk mikrobiális közösségek taxonómiai összetételének és funkcionális képességének jellemzésére, és teljes genom szekvenciák visszanyerésére (Quince et al., 2017).

5.2.1 Az Ion Torrent szekvenálás és kiértékelése MG-RAST programcsomaggal (2014)

Új generációs szekvenálás segítségével megvizsgáltuk a dúsított, izolált cellulózbontó kultúrák mikroba összetételét az egyik legmodernebb szekvenálási és kiértékelési módszerrel, amely az MG-RAST programcsomagot és hozzá kapcsolt M5nR adatbázist jelentette 2014-ben.

	Readok száma	Átlagos hossz bp	Contigok száma	Átlagos méret nt
AD1 2014	578372	231,17	1950	2029
AD2 2014	515436	246,19	734	4413

3. táblázat. Az első szekvenálás után kapott contigok és readok száma és átlagos mérete

A szekvenálás után kapott contigok számát és átlagos méretét, illetve a readok számát és átlagos hosszát a 3. táblázat tartalmazza. A teljes DNS genom minta új generációs szekvenálása azonosította a meghatározó rendeket, amelyek AD1 és AD2 esetén a *Thermoanaerobacterales* 70% illetve 73% és *Clostridiales* 10% illetve 11% abundanciával. Ugyanezek a rendek jellemezték a teljesen más körülmények között, különböző eredetű és eltérő helyről származó - lignocellulóz bontó mikroba konzorciumból (Tuesorn et al., 2013), komposztból (Hua et al., 2016; Kinet et al., 2015; Yuan et al., 2016, 2014) vagy talajból (Zhang et al., 2011) - dúsított termofil konzorciumokat. Ez azt sugallja, hogy hasonló közösségek alakulhatnak ki teljesen különböző forrásból, a közösség hasonló környezeti szelekciós nyomás alatt szelektálódik, úgymint a lignocellulóz tartalmú szubsztrát és a termofil körülmények. Ezekről részletesebben az 5.6 fejezetben lesz szó. További kutatásokra van szükség a részletek pontos megértése érdekében.

A korábbi tanulmányokban (Hua et al., 2016; Kinet et al., 2015; Tuesorn et al., 2013; Yuan et al., 2016, 2014; Zhang et al., 2011) a lignocellulózbontó kultúrák jellemzésére használt módszerek nem tették lehetővé a konzorcium tagjainak fajszintű azonosítását vagy relatív mennyiségi meghatározását a közösségben. Az eredményeim ezért új ismeretekkel bővítették a cellulózbontás megismerésére törekvő kutatásokat, ezért segíthetnek egy racionálisan megtervezett és optimalizált stabil mikroba készítmény kifejlesztésében. A jó minőségű szekvenciaadatok lehetővé tették a legabundánsabb törzsek faj szintű azonosítását. A négy legmeghatározóbb törzset a két kevert cellulózbontó konzorciumban *Thermoanaerobacterium*

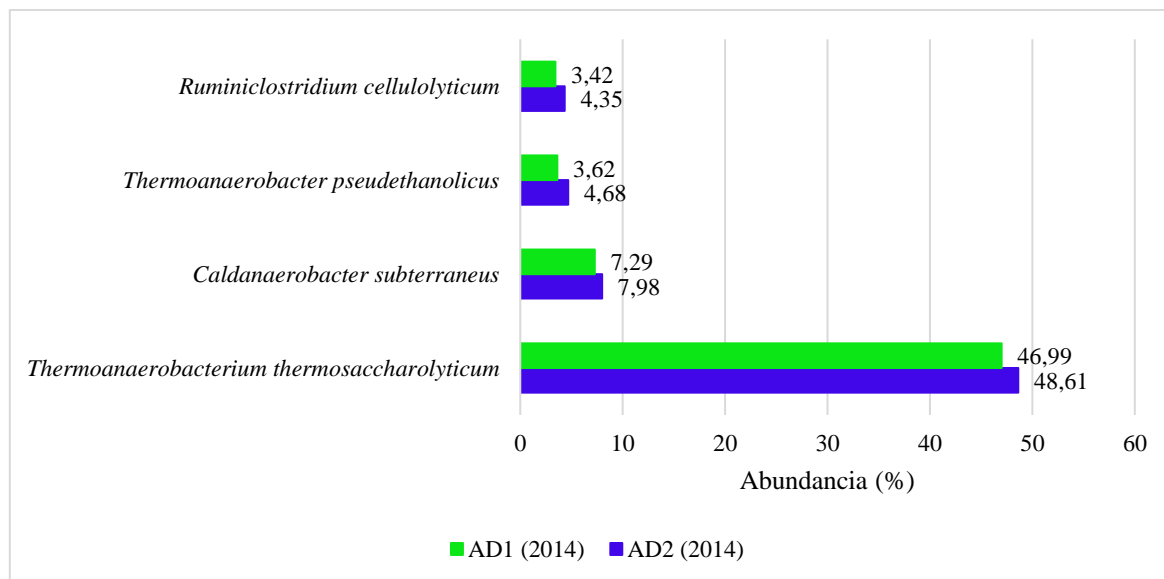
thermosaccharolyticum (99,81 és 99,80%), *Caldanaerobacter subterraneus* (100 és 100%), *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* (99,92 és 99,99%) és *Ruminiclostridium cellulolyticum*-ként (100 és 100%) azonosítottam. A zárójelben szereplő számok jelzik az MG-RAST bioinformatikai programcsomag (14. ábra) által talált azonossági szinteket. A négy legnagyobb abundanciával rendelkező törzset alacsony abundanciájú törzsek kísérték a közösségben. Az AD1 és AD2 azon tagjait, amelyek magasabb, mint 1% relatív abundanciával vannak jelen az 4. táblázat mutatja be.

Legközelebbi találat	AD1 abundancia %	AD2 abundancia %
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	47,0	48,6
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	7,3	8,0
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	3,6	4,7
<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i>	3,4	4,4
<i>Thermosinus carboxydivorans</i>	-	4,1
<i>Clostridium thermoamylolyticum</i>	3,0	2,3
<i>Hungateiclostridium thermocellum</i>	3,0	4,0
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	2,6	3,6
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	2,2	2,3
<i>Clostridium sardiniense</i>	2,0	0,5
<i>Eubacterium limosum</i>	1,8	2,2
uncultured bacterium	1,8	1,3
<i>Ralstonia solanacearum</i>	1,7	-
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	1,6	-
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	1,0	0,7
<i>Carnobacterium</i> sp. AT7	0,9	1,1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0,5	1,0

4. táblázat. Az AD1 és AD2 közösség legnagyobb mennyiségben jelenlevő tagjai közötti hasonlóságok és különbségek, szürkével jelöltem azokat a fajokat, amelyek jelen vannak az egyik konzorciumban, a másiktól viszont hiányoznak.

A szekvenálás talán legfontosabb eredményeként kiderült, hogy az AD1 és az AD2 alapján véve ugyanazt a mikroba összetételt mutatja. Ez azért érdekes, mert a dúsítási eljárás párhuzamosan és egymástól függetlenül folyt, bár ugyanabból az eredeti biogáz reaktor elfolyó közösségből indult. Ez arra utal, hogy a dúsítási folyamat reprodukálhatóan megvalósítható és viszonylag stabil mikroba közösséget hoz létre az alkalmazott szelekciós nyomás. Az

azonosított négy leggyakoribb törzsnek még a relatív abundanciája is nagyon hasonló volt (14. ábra).



14. ábra. A legmeghatározóbb törzsek és a hozzájuk köthető DNS szekvenciák abundanciájának %-os értéke AD1-ben és AD2-ben a szekvenálás és kiértékelés alapján.

A *T. thermosaccharolyticum*, korábbi nevén *Clostridium thermosaccharolyticum* (Collins et al., 1994) egy anaerob, termofil, szacharolitikus baktérium. Alakja pálca, terminális, kerek spórát képez. A sejtek egyesével, néha párban fordulnak elő, motilisek. Optimum növekedési hőmérséklete 55-60 °C (McCoy & McClung, 1935). Igen alaposan tanulmányozott cellulolitikus törzs, számos izolátumát leírták már, mint például a *T. thermosaccharolyticum* NOI-1-t, amelyet talajból izoláltak és *Hungateiclostridium thermocellummal* ko-kultúrában hidrogén fermentációra használtak (Chim Tong et al., 2014). A hőforrás iszapjából izolált *T. thermosaccharolyticum* W16 izolátum (Ren et al., 2008) kukoricaszárat bontott és használt fel hidrogén termelésre (Cao et al., 2009), illetve glükózból és xilózból állított elő hidrogént (Zhang et al., 2011). Az elefántürülékből izolált *T. thermosaccharolyticum* KKKU-ED1 kevert xilóz/arabinóz szubsztrátból termelt biohidrogént (Saripan & Reungsang, 2013), a *T. thermosaccharolyticum* TERI S7 törzset pedig olajtározó csőrendszeréből izolálták (Singh et al., 2014). *H. thermocellum*-mal ko-kultúrában kukoricaszárból termeltek hidrogént (Li & Liu, 2012). Zhao és mtsai. (2014) gombával előkezelt kukoricaszárból állítottak elő hidrogént *T. thermosaccharolyticum* M18 törzs segítségével. Luo és mtsai. (2011) kétféle lépésben vizsgálták a hidrogén és metántermelést. A mikrobiális közösségek vizsgálata azt mutatta, hogy a hidrogéntermelő reaktorokban a domináns baktérium a *T. thermosaccharolyticum*-mal

mutatott egyezést, míg a metántermelő reaktorokban *H. thermocellum*-mal mutatott hasonlóságot a törzs. Egy pálmaolaj üzem szennyvizével táplált biohidrogén reaktorból izolált törzs a *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (O-Thong et al., 2008). Liu és mtsai. (2008) rothadt szalmából izolálták a *T. thermosaccharolyticum* GD17 és *H. thermocellum* JN4 törzseket. Ko-kultúrában számos természetes szubsztrátból képesek voltak hidrogént termelni, többek között kukoricacső- és kukoricaszár porból. Ueno és mtsai. (2001b) komposztból dúsított termofil hidrogéntermelő mikroba közösséget vizsgáltak és PCR-DGGE analízis segítségével azt találták, hogy a cellulózból történő hidrogén termelésben számos mikroba törzs részt vesz, mint a *T. thermosaccharolyticum*, *H. thermocellum* és *Clostridium cellulosi*.

A *Cd. subterraneus*, korábban *Thermoanaerobacter subterraneus*, egy termofil, anaerob, Gram-pozitív, pálca alakú baktérium, amelyet egy olajmezőről származó vízmintából izoláltak Franciaországban. Hőmérsékleti és pH optimuma 65 °C, illetve pH 7,5; 40-75 °C és pH 6-8,5 között képes szaporodni. Laterális flagellumokkal rendelkezik, de nem motilis. Spóra nem figyelhető meg viszont hőtűrő képességgel rendelkezik. Számos szénhidrátot fermentál: fruktóz, glükóz, galaktóz, laktóz, maltóz, mannóz, xilóz, ribóz, mannitol, cellobióz, piruvát, melibióz, keményítő és xilán; ecetsav, L-alanin, tejsav, hidrogén és szén-dioxid keletkezik termékként. A tioszulfátot és elemi ként szulfiddá redukálja. Típustörzse a *Cd. subterraneus* subsp. *subterraneus* (Fardeau et al., 2000). *Cd. subterraneus*-ként azonosították egy termofil hidrogéntermelő konzorcium tagját, olykor a *T. thermosaccharolyticum*-mal együtt (Kongjan et al., 2010; Yokoyama et al., 2009; Yokoyama et al., 2007; C. Zhao et al., 2009).

A *Tr. pseudethanolicus* E39, eredetileg *Clostridium thermohydrosulfuricum* E39, később *Thermoanaerobacter ethanolicus* E39, Zeikus és mtsai. izolálták a Yellowstone Nemzeti Park, Octopus Spring forrásából. A sejtek pálca alakúak, és terminális, kerek spórát képeznek. Sejtfala Gram-pozitív. A sejtek mozgékonyak, a tioszulfátot H₂S-é redukálja. Fermentálja a xilózt, cellobiózt, keményítőt, glükózt, maltózt és szacharózt. Nem figyelhető meg növekedés H₂/CO₂ alatt. A hőmérsékleti optimuma 65 °C (Onyenwoke et al., 2007). Alkalmas jelölt lehet konszolidált biokezeléshez (consolidated bioprocessing) (Hemme et al., 2011). A consolidated bioprocessing (CBP) egy olyan rendszer, amelyet a lignocellulóz alapú bioetanol előállításban alkalmaznak. Ez a folyamat a celluláz termelést, cellulóz lebontást, hexóz és pentóz fermentációt egyetlen bioreaktorban egyesíti, így maximalizálja az energia- és költségmegtakarítást (Lin et al., 2011). Rothasztott szennyvíziszapból hőkezelés után nyert extrém-termofil biohidrogén termelő kultúra meghatározó/domináns törzsét *Tr. pseudethanolicus*-ként azonosították (Hasyim et al., 2011). *H. thermocellum*-mal ko-kultúrában

fokozta a bioetanol hozamot cellulózból (He et al., 2011). A kevert, A7 névvel jelölt kultúra, melyet egy mexikói olajmezőről izoláltak, tartalmazta a *Tr. pseudethanolicus* törzset is. Az A7 kevert kultúra szén-dioxidot, etanolt, ecetsavat, kis mennyiségű acetont és metánt is termelt (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) (Castorena-Cortés et al., 2012).

A *R. cellulolyticum*ot először Petitdemange és mtsai. (1984) izolálták és jellemezték komposztból. Anaerob, Gram-pozitív, egyenes vagy enyhén hajlott pálcák, amelyek szferikus terminális spórát képeznek. A sejtek peritrich flagellumok segítségével képesek a helyváltoztatásra. 25-45 °C között képes szaporodni, az optimum hőmérséklete 32-35 °C. Képes hasznosítani a galaktózt, mannózt, ribózt, arabinózt, cellobiózt, cellulózt, fruktózt, glükózt és xilózt. Szén-dioxidot, hidrogént, ecetsavat, etanolt, tejsavat és hangyasavat állít elő cellulózból. A *R. cellulolyticum* is rendelkezik egy extracelluláris multienzim komplexszel, amit celluloszómának neveznek. A törzs széles körben kutatott, a cellulóz hidrolízis enzimátikus és metabolikus szempontjából és a mezofil cellulolitikus clostridiumok modell organizmusának tekinthető (Desvaux, 2005). Peng és mtsai. (2014) *R. cellulolyticum*ot használtak szalma anaerob lebontásának bioaugmentálására. A kezelés eredményeként a szalma metánkihozatala 13%-kal nőtt. Egy termofil két szakaszos szűrő ágyas (leach bed) biogáz reaktor cellulolitikus biofilmjében a *R. cellulolyticum* volt az egyik domináns faj (Rademacher et al., 2012), bár ez a mikroba mezofil, a jelek szerint képes elviselni a termofil körülményt is. Ko-kultúrában *Clostridium acetobutylicum*-mal, *R. cellulolyticum*-ot használtak konszolidált biokezelésre (Salimi & Mahadevan, 2013).

5.2.2 AD1 és AD2 cellulózbontó konzorciumok stabilitásának ellenőrzése, újraszekvenálása, read-alapon végzett metagenomikai elemzése

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy AD1 és AD2 konzorciumok mikroba összetétele stabil, a két, -80 °C-on tárolt konzorciumot átlagosan 6 havonta átoltottuk, frissítettük. Az így tárolt és folyamatosan a kísérletekben felhasznált konzorciumokat ismételt metagenom analízisnek vetettük alá 4 év múlva, 2018-ban. A szekvenálás után kapott contigok számát és átlagos méretét, illetve a readok számát és átlagos hosszát az alábbi táblázat tartalmazza (5. táblázat).

	Readok száma	Átlagos hossz bp	Contigok száma	Átlagos méret nt
AD1 2018	386922	269,1	3987	2213
AD2 2018	405513	267,84	2981	3108

5. táblázat. A második szekvenálás után kapott contigok és readok száma és átlagos mérete

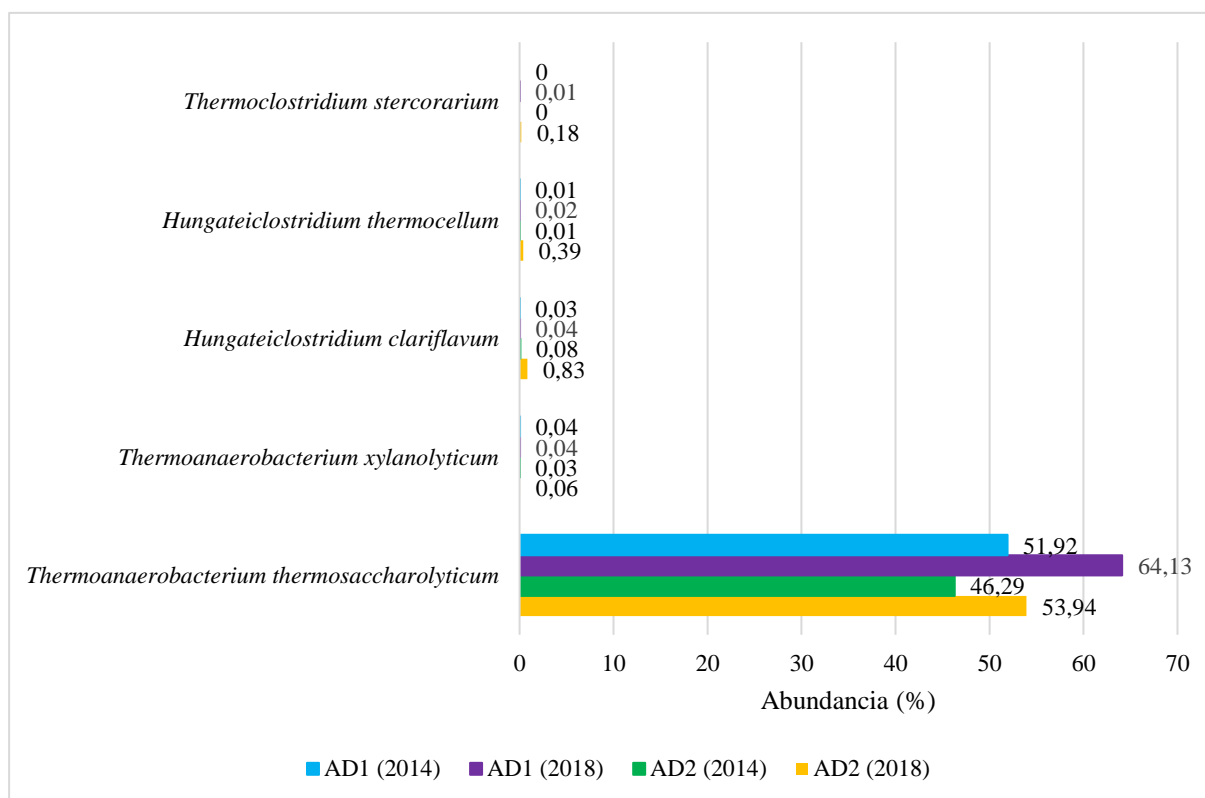
Ezeket a korábbiakkal lényegében azonos Ion Torrent PGM módszerrel elvégzett szekvenálási eredményeket már az időközben kifejlesztett és a szakirodalomban sokkal megbízhatóbbnak tartott Kraken szoftver (Wood & Salzberg, 2014) és RefSeq adatbázis (O’Leary et al., 2016) felhasználásával értékeltük ki. A bioinformatikai műveleteket kiegészítettük a korábbi, 2014-ben nyert nyers szekvenciaadatok újra kiértékelésével a módszerek jobb összehasonlíthatósága érdekében. A Kraken egy olyan szoftver, amelynek a pontossága összehasonlítható a legjobb szekvencia meghatározó módszerekkel, és amelynek a sebessége messze felülmúlja mind az osztályozó és az abundancia becslő programokét manapság (Wood & Salzberg, 2014). Lindgreen és mtsai. (2016) több metagenom analízáló programot hasonlítottak össze, amelyben vizsgálták a pontosságot és a sebességet. Köztük volt az MG-RAST és Kraken is. Megállapították, hogy a fajsztíntű azonosítás a Kraken esetén sokkal pontosabb, mint az MG-RAST használatával.

A 15. ábra és 16. ábrán mutatom be az első, 2014. évben végzett szekvenálás újra kiértékelte és a második szekvenálás (2018) eredményeit. Az AD1 és AD2-t felépítő rendek a *Thermoanaerobacterales*, illetve *Clostridiales* rend. A 15. ábrán látható hogyan oszlanak meg a rendek a különböző mintákban. Megfigyelhetjük, hogy mindkét konzorciumnál a *Thermoanaerobacterales* rend a domináns, illetve a nem meghatározott szekvenciák aránya is magas, viszont a második szekvenálásra a *Thermoanaerobacteralesek* aránya nőtt, a nem meghatározott csökkent. A *Clostridiales* rend képviselői alacsony abundanciával vesznek részt a konzorciumok felépítésében, viszont AD2 esetén növekedés figyelhető meg.



15. ábra. Az AD1 és AD2-t felépítő rendek aránya abundancia %-ban

A legabundánsabb faj a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* lett, ez nem változott a korábbi kiértékeléshez képest. Viszont a kisebb abundanciával jelen levő további jellemző fajok megváltoztak a Krakennel végzett kiértékelésben. Az így kapott adatok alapján a következő fajok jellemezték még a munkám során feldúsított cellulózbontó konzorciumokat: *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Hungateiclostridium clariflavum*, *Hungateiclostridium thermocellum* és *Thermoclostridium stercorarium*. A 2014-es és 2018-as szekvenálás között a *T. thermosaccharolyticum* esetén az AD1 és AD2 konzorciumokban is megfigyelhető, hogy az abundancia értékek megemelkedtek. A *T. xylanolyticum* értékei nem változtak. A *H. clariflavum* és *H. thermocellum* az AD2 második szekvenálásában már magasabb abundanciát mutatnak. A *Tc. stercorarium* a 2018-as szekvenálás során jelent meg a mintákban.



16. ábra. AD1 és AD2 legabundánsabb 5 faja a Kraken kiértékelés alapján.

A *H. clariflavum* (korábbi nevén *Clostridium clariflavum*) egy termofil, anaerob, cellulózbontó mikroorganizmus, egy cellulózbontó metanogén bioreaktor iszapjából izolálták. A sejtek egyenes vagy enyhén hajlott pálcák, Gram-pozitív, nem motilis, kerek, szubterminális spórát képeznek. Cellulóz vagy cellobióz tartalmú agaron halványsárga kerek kolóniákat képez. Növekedési hőmérséklete 45-65 °C között van, optimuma 55-60 °C. pH tartománya 6-8, pH 7,5-ös optimummal. Egyedüli szén- és energiaforrása a cellulóz és cellobióz. Fermentációs termékei közé tartozik a hidrogén, szén-dioxid, ecetsav, tejsav, etanol és kis mennyiségben hangyasav (Shiratori et al., 2009). A *H. clariflavum* képes bontani a hemicellulózt, egy környezeti izolátuma pedig a xilózt is felhasználta szénforrásként (Izquierdo et al., 2014).

A *Tc. stercorarium* (korábbi nevén *Clostridium stercorarium*), egy anaerob, termofil, cellulózbontó baktérium, növényi maradványokat tartalmazó komposztból izolálták. A sejtek Gram-pozitív egyenes pálcák, motilisek, peritrich flagellumaik vannak, ovális, terminális endospórát képeznek. Optimum növekedési hőmérséklete 65 °C. Képes szénforrásként hasznosítani a cellobiózt, cellulózt, eszkulint, glükózt, szalicint, arabinózt, galaktózt, glikogént, laktózt, maltózt, mannózt, melibiózt, ramnózt, ribózt és xilózt. Fermentációs termékei közé

tartozik a hidrogén, szén-dioxid, etanol, ecetsav és tejsav (Madden, 1983). Genom szekvenciáját 2013-ban publikálták (Poehlein et al., 2013).

A *H. thermocellum* (korábbi nevén *Clostridium thermocellum*) egy Gram-pozitív, termofil, anaerob, cellulózbontó baktérium. A cellulóz, cellobióz, xilóz és hemicellulóz lebontására és hasznosítására szakosodott baktérium, amelynek eredményeként ecetsav, tejsav, hangyasav, etanol, szén-dioxid és hidrogén képződhet (Béguin, Millet, & Aubert, 1992; McBee, 1954). A *H. thermocellum* a ma ismert egyik leghatékonyabb lignocellulóz biomassa bontó mikroorganizmus. A hatékony cellulóz bontásban celluláz enzimek játszanak szerepet, amelyek szabad enzimekből és celluloszóma rendszerekből állnak. A baktérium a sejtfalhoz kapcsolt celluloszómákon kívül rendelkezik szabad, nem sejtfal kapcsolt celluloszóma rendszerrel is (Xu et al., 2016). A *H. thermocellum* képes a CO₂ megkötésére és formáttá alakítására a redukív C1 anyagcsere útvonalon keresztül (Xiong et al., 2016).

A *T. xylanolyticum* egy termofil, anaerob, xilán bontó baktérium, amelyet a Yellowstone Nemzeti Parkból (USA) izoláltak. Gram-negatív, spórát képez, a sejtek egyedül vagy párosan előforduló motilis pálcák. 5-7,5-ös pH-n szaporodik, optimuma pH 6. Optimális hőmérséklete 60 °C, de 45-70 °C-ig képes szaporodni. A tioszulfátot elektronakceptorként használja, és elemi kénre redukálja, amely a sejtekben és a tápoldatban lerakódik. A törzs jól nő xilánon és keményítőn, de nem képes bontani a cellulózt. Nő maltózon, laktózon, szacharózon, cellobiózon, glükózon, xilózon, galaktózon, mannózon, fruktózon, arabinózon, ramnózon, maltózon, piruváton és mannitolon. Fermentációs termékei közé tartozik az ecetsav, etanol, hidrogén és szén-dioxid is (Lee et al., 1993).

Az cellulózbontók, mint a *H. thermocellum*, specializálódtak és nagyon hatékonyak a kristályos cellulóz lebontásában. Habár a *H. thermocellum* termel hemicellulózbontó enzimeket is, a felszabaduló cukrokat (xilóz) nem használja fel szénforrásként. A hemicellulázok szerepe úgy tűnik inkább az, hogy hidrolizálják a hemicellulózt, amibe a cellulóz mikrofibrillumok beágyazódnak és így a cellulózt hozzáférhetővé teszik a cellulázok számára. A konzorciumban lévő kísérő baktériumok hasznosíthatják a felszabadult cukrokat (Zverlov et al., 2010).

Egy másik termofil cellulózbontó baktérium, amely úgy tűnik, hogy a hemicellulóz bontására specializálódott a *Tc. stercorarium*. Ez a baktérium abban különbözik a *H. thermocellum*-tól, hogy csak két cellulolitikus exoenzimet szekretál, egy endo- és egy exoglukanázt. Ezek a cellulázok nem szerveződnek celluloszómákba mint a *H. thermocellum* esetén. Zverlov és mtsai. (2010) számos olyan természetes forrásból vettek mintát, ahol növényi biomassa-lebontás történik. Ezek között voltak olyanok, amelyek mezofil és termofil biogáz

üzemekből származtak. A kevert bakteriális kultúrákat kukorica- és fűsilón dúsították. Megfigyelték, hogy magasabb hőmérsékleten (60 °C) lényegesen hatékonyabban fejlődő kultúrákat izoláltak. A 16S rRNS szekvenciaanalízis eredményeként kapott szekvenciák a cellulózbontó *C. cellulosi*-hoz és *H. thermocellum*-hoz mutattak nagyfokú hasonlóságot. A kevert kultúrából sikeresen izolálták a *H. thermocellum*-ot tiszta kultúraként is. Vizsgálták a kultúra felülúszójában lévő cellulózkötő fehérjét. A fehérjék nagy része *H. thermocellum* eredetű volt, illetve egyetlen más baktériumtól származó fehérjét sikerült azonosítaniuk, a *Tc. stercorarium* egyik cellulázát. Korábbi tanulmányokból kiderül, hogy a *H. thermocellum* és *Tc. stercorarium* gyakran előforduló baktériumpáros, rendszerint részt vesznek a növényi biomassza természetes bomlása során a cellulóz és hemicellulóz lebontásában. A *H. thermocellum* nagy hatékonysággal képes lebontani és felhasználni a cellulózt, míg a hemicellulózt a celluloszóma mellékaktivitásaként bontja. Mindkét baktérium a clostridiális fermentáció tipikus végtermékeit termeli: etanol, tejsav, ecetsav, vajsav és egyéb rövid láncú termékeket a szén-dioxidon és hidrogéneken felül. Ezek a termékek jól illenek a szintrofikus és acetogén baktériumokra jellemző szubsztrátok közé, ahogyan az acetotróf és hidrogenotróf metanogének számára is hasznosíthatóak.

Az AD1 és AD2 közösségek 4 évvel később elvégzett ismételt szekvenálása és a korábbi szekvenciaadatok más bioinformatikai módszerekkel történt kiértékelése határozottan arra utal, hogy egyrészt a feldúsított „stabil” mikroba konzorciumok összetétele, aránya kismértékben ugyan, de változik a tárolás és sokszori átoltás során. Másrészt a kiértékeléssel kapcsolatos megfigyelések felhívják a figyelmet arra, hogy a metagenom vizsgálatokban kritikus lépés a hibás szekvenciákat kiszűrő, a maradék adathalmazt kiértékelő és taxonómiaileg elemző bioinformatikai eszköz használata. Esetünkben az új szoftver részben eltérő adatokat és következtetéseket szolgáltatott a korábbi nyers szekvenálási adatok ismételt kiértékelése során is. Megnyugtató lehet azonban, hogy a 4 év után megismételt AD1 és AD2 közösség összetételének modernebb bioinformatikai módszerekkel végzett elemzése és az újraszekvenálás eredményei összhangban voltak egymással. Ez arra utal, hogy elsősorban nem a mikroba közösség összetétel változott dramatikusan a több éves tárolás során, hanem a szekvenciaadatok értékelő bioinformatikai módszerek. Ugyanakkor ez a megfigyelés azt a fontos üzenetet közvetíti, hogy nagyon körültekintően kell általában eljárni a metagenom szekvenálások elemzése és értelmezése során, különösen az összetett rendszerek esetében (Campanaro et al., 2018; Zhang et al., 2019).

5.2.3 A szekvenálási adatok genom-alapon végzett kiértékelése.

Bármelyik megközelítés (genom alapú, read alapú) sikere függ a mikrobiális közösség összetételétől és összetettségétől, a szekvenálás mélységétől, az adatmennyiség méretétől és az elérhető számítógépes erőforrástól. Ajánlott mindkét megközelítést alkalmazni a szekvenanciaanalízishez, mivel kiegészítik és megerősítik egymást. A 6. táblázat összefoglalja a kétféle megközelítés főbb jellemzőit (Quince et al., 2017).

	Összeszerelésen alapuló analízis	Read alapú analízis
Sokoldalúság	Teljes genomokat össze lehet állítani vele, de csak az összeállításhoz és bineléshez elegendő lefedettséggel rendelkező organizmusoknál.	Egy összetett képet adhat a közösség működéséről vagy szerkezetéről, de ez csak a readok azon részén alapszik, amelyeket referencia adatbázisokhoz lehet térképezni.
Közösség összetettsége	Összetett közösségekben csak a genomok töredékét lehet összeilleszteni.	Az elegendő szekvencia mélységgel és referencia adatbázis lefedettséggel rendelkező komplex közösségeket is tudja kezelni.
Újdonság	Képes teljesen új, megszekvenált rokon fajjal nem rendelkező organizmusok genomját megfejteni.	Nem képes olyan organizmusokat azonosítani, amelyek közeli rokon fajainak genomja nem ismert.
Számítógépes/számítási megterhelés	Számítási szempontból költséges összeszerelést, térképezést és binelést igényel.	Hatékonyan elvégezhető, lehetővé teszi a nagyméretű meta-analíziseket.
Genom-kapcsolt anyagcsere	Teljesen összeszerelt genomokon keresztül filogenetikai kapcsolatot tud kialakítani az anyagcserét illetően, még új változatok esetén is.	Általában csak a közösség együttes anyagcseréjét tudja meghatározni, és filogenetikai kapcsolatot csak az ismert referencia genomok kontextusában lehet meghatározni.
Manuális ellenőrzés	Manuális kurálásra van szükség a pontos bineléshez és scaffoldhoz és a hibás összeszerelés felismeréséhez.	Általában nem igényel manuális kurálást, de a használt referencia genomok kiválasztása emberi ellenőrzést igényelhet.
Integrálás a mikrobiális genomikával	Az összeszerelt genomok betáplálhatóak a tiszta, tenyésztett izolátumok genomanalíziséhez tervezett mikrobiális genomikai folyamatokba.	A kapott jellemzés közvetlenül nem hasonlítható össze a tiszta, tenyésztett izolátumokból származó genomokkal.

6. táblázat. Genom alapú és read alapú vizsgálatok erősségei és gyengeségei

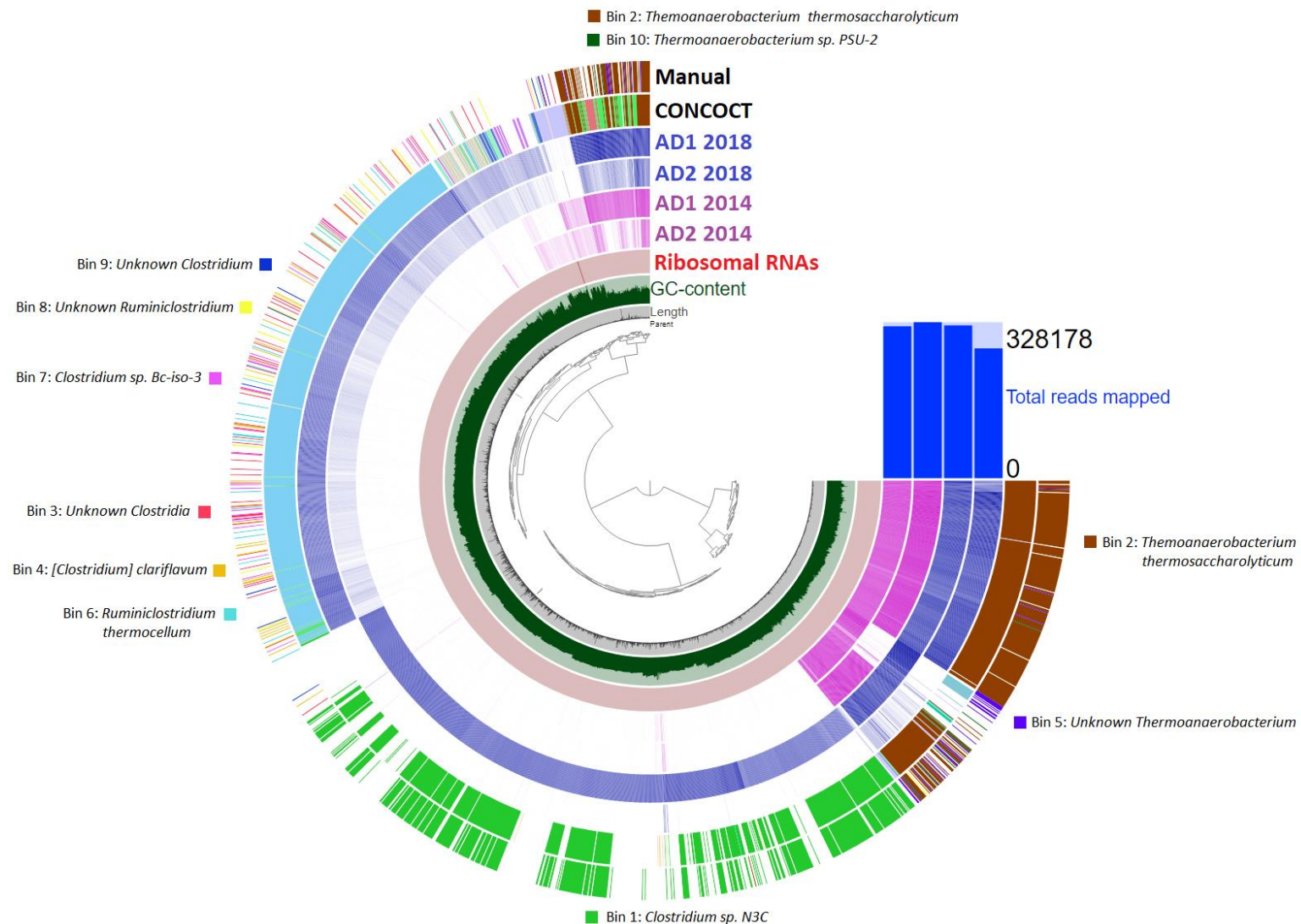
A genom alapú kiértékelés eredményeit a 7. táblázat és 17. ábra mutatja be.

Binek	Taxonómia	Teljes méret	Kontigok száma	Teljesség	Kontamináció
Bin 1	<i>Clostridium</i> sp. N3C	2,67 Mb	399	83,45%	2,88%
Bin 2	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	1,18 Mb	351	46,04%	5,04%
Bin 3	Unknown Clostridia	345,00 Kb	49	4,94%	0,00%
Bin 4	[<i>Clostridium</i>] <i>clariflavum</i>	183,80 Kb	31	3,70%	0,00%
Bin 5	Unknown <i>Thermoanaerobacterium</i>	151,44 Kb	38	3,60%	0,00%
Bin 6	<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>	210,60 Kb	27	29,50%	0,00%
Bin 7	<i>Clostridium</i> sp. Bc-iso-3	156,95 Kb	27	16,55%	0,00%
Bin 8	Unknown <i>Ruminiclostridium</i>	104,48 Kb	19	2,88%	0,00%
Bin 9	Unknown <i>Clostridium</i>	52,82 Kb	8	0,72%	0,00%
Bin 10	<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. PSU-2	34,41 Kb	10	1,23%	0,00%

7. táblázat. A sikeresen összeillesztett binek

A legnagyobb teljességgel (83,45%) az 1. bint (*Clostridium* sp. N3C) sikerült összeépíteni. Szinte kizárólag a 2018-as AD2 konzorciumra jellemző ez a faj (17. ábra). A *Clostridium* sp. N3C-t egy termofil biogáz fermentorból izolálták Németországban, amelynek a szubsztrátja siló kukorica, sertés- és marhatrágya, illetve árpa volt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/972903459>). A 2. bint *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*ként azonosítottuk és a 17. ábra alapján legalább két binre különül. Ez azt jelzi, hogy legalább két eltérő törzse jelen van a konzorciumokban. Jia és mtsai. (2018) munkájukban vizsgáltak egy több, mint két éve 55 °C-on működő cellulózbontó metanogén dúsított kultúrát. Metagenomikai és metatranszkriptomikai vizsgálatokat is végeztek. A metagenomok összeszerelése és binelése után a kultúrát felépítő egyik fajt *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*ként azonosították. A 4. bin *Clostridium clariflavum*, mai nevén *Hungateiclostridium clariflavum*, egy cellulózbontó mikroorganizmus, az előző fejezetben már említettem. A 6. bin *Ruminiclostridium thermocellum*, korábban *Clostridium thermocellum*, termofil cellulózbontó mikroorganizmus, a korábbi fejezetekben szintén szóba került. A cellulolitikus *Clostridium* sp. Bc-iso-3-at (Bin 7) egy svéd biogáz fermentorból izolálták. A 16S rRNS gén analízise alapján a legközelebbi rokon törzs a *Hungateiclostridium thermocellum* DSM 2360 96%-os szekvencia azonossággal (Sun & Schnürer, 2016). A 8. bin szintén egy *Ruminiclostridium* fajhoz tartozik. Bergey rendszerbakteriológia kézikönyvének a Firmicutes törzsről szóló 2009-es második kiadásában Ludwig és mtsai. (2009) javasolták a *Clostridiales* renden belül egy új család, a monofiletikus *Ruminococcaceae* család létrehozását, ebbe a családba sorolták át a cellulózbontó képességgel rendelkező *Clostridium* fajokat. Yutin és Galperin 2013-as munkájukban (Yutin & Galperin, 2013) javasolták a *Ruminococcaceae* családba tartozó fajok besorolását az új

Ruminiclostridium nemzetségbe. A *Ruminiclostridium* nemzetség tagjai képesek szubsztrátként használni a cellulózt, xilánt és/vagy cellobiózt és ezekből főként ecetsavat, etanolt, hidrogént és szén-dioxidot, továbbá tejsavat, propionsavat, vajsavat és egyéb termékeket állítanak elő. Típus törzsnek a *Ruminiclostridium thermocellum*-ot (korábban *Clostridium thermocellum*, ma *Hungateiclostridium thermocellum*) választották. Mivel ez a leírás nem felelt meg a bakteriológiai szabályzatnak, ez a nevezéktan hivatalosan nem vált elfogadottá. Zhang és mtsai. (2018) a *Clostridium* III csoportba tartozó 12 fajt és 3 mostanában jellemzett *Clostridium* fajt vizsgálták meg. Munkájukban ezeket a fajokat négy új nemzetségbe, nevezetesen *Hungateiclostridium* gen. nov., *Thermoclostridium* gen. nov., *Ruminiclostridium* gen. nov. és *Pseudoclostridium* gen. nov. sorolták, amelyek az új, *Hungateiclostridiaceae* családhoz tartoznak. Meg kell jegyeznünk, hogy az új *Ruminiclostridium* nemzetség (7 faj) nem egyezik meg a Yutinék által javasolt *Ruminiclostridium* nemzetséggel (22 faj). A *Thermoanaerobacterium* sp. PSU-2-t (Bin 10) egy termofil hidrogén termelő reaktorból izolálták, amelyet egy pálma olaj üzemből származó szennyvízzel tápláltak. Gram-pozitív, pálca alakú, spóra képző, termofil hidrogén termelő baktérium. Az összehasonlító genomanalízis kimutatta, hogy a PSU-2 törzs 94% genomszekvencia-hasonlóságot mutat a *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11-gyel (O-Thong et al., 2017).



17. ábra. A kapott binek előfordulása az egyes mintákban. Az ábra belsejében látható egy dendrogram (amely a contigok csoportosítását mutatja), a belső körben látható a contigok hossza, GC tartalma, majd kifelé haladva a minták, illetve az automata és manuális binelés eredményei.

A cellulóz után a hemicellulóz a növényi szövetek másik fontos összetevője. A hemicellulóz fő alkotóeleme a xilán, amely hatékony lebontásához számos enzim szinergisztikus működésére van szükség. Ezek az enzimek az endo- β -1,4-xilanáz (EC 3.2.1.8) GH5, 8, 10, 11, 30, 43, 51, 98, β -xilozidáz (EC 3.2.1.37) GH1, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116, 120, α -L-arabinofuranozidáz (EC 3.2.1.55) GH2, 3, 43, 51, 54, 62, 155, α -glükuronidáz (EC 3.2.1.139) GH4, 67, xilán α -1,2-glükuronidáz (EC 3.2.1.131) GH67, 115 és acetil xilán észteráz (EC 3.2.1.72) CE1-7, 12, 15 (szénhidrát észteráz - carbohydrate esterases - CE) ("www.cazy.org,") (Jia et al., 2014). Az egyes binekben megtalált szénhidrátbontó enzim géneket a 8. táblázat mutatja, ezeket a fenti felsorolásban félkövér betűvel emeltem ki. Tehát a genomcentrikus metagenom elemzéssel a glikozid hidrolázok széles választékát sikerült kimutatni a binekben. Megjegyzendő, hogy a Bin 6 (*Ruminiclostridium thermocellum*), 8 (*Ruminiclostridium*), és 9 (*Clostridium*) esetében ugyan nem találtam GH vagy CE géneket (8. táblázat), de ez nem jelenti azt, hogy ők nem rendelkeznek ilyen hidrolizáló enzimekkel, hiszen közzismert, hogy a *Ruminiclostridium* és *Clostridium* törzsek cellulózbontásra képesek. A „hiányzó” GH/CE enzimek magyarázata valószínűleg ezeknek a bineknek az alacsony teljességében (7. táblázat) keresendő: ezek összetartozó géneket tartalmaznak, de nem az adott mikroba teljes genomját és véletlenszerűen nem került bele GH/CE gén. Ez a megfigyelés egyben arra is felhívja a figyelmet, hogy a genom-alapon végzett elemzés során csak a pozitív találatokat szabad értékelni, mivel a binek általában hiányosak ezért előfordulhat, hogy nem találunk benne bizonyos géneket. Érdekes példa erre a *Ruminiclostridium thermocellum* - Bin 6, amelynek 29,5% lefedettsége azt mutatja, hogy a mikroba genomjának harmadát tartalmazza, mégsem találtam benne GH/CE géneket. Ezzel szemben a jóval alacsonyabb teljességgel rendelkező Bin 3 (Unknown Clostridia), 4 (*Clostridium clariflavum*), 5 (Unknown *Thermoanaerobacterium*), 10 (*Thermoanaerobacterium* sp. PSU-2) hiányos génkészlete tartalmazott ilyen szekvenciákat. A lignocellulóz anaerob lebontásában fontos szerepük van a GH5 és 48 családba tartozó enzimeknek (Sun et al., 2016). Xia és mtsai. (2013) egy termofil cellulózbontó iszap metagenomikai vizsgálatát végezték, hogy megállapítsák a mikroba közösség összetételét és szénhidrátbontó enzimeket kódoló géneket keressenek. A talált gének nagy része a GH2,3 és 9 családba tartozott. A CAZy-k szubsztrátfüggőek, a cellulózbontó kultúrák dúsításához és izolálásához α -cellulózt használtam szubsztrátként, amely a természetes lignocellulóz tartalmú biomasszához viszonyítva nem túl komplex szerkezetű. Ezzel is magyarázható, hogy az általam talált GH gének közül egyik sem kódol a GH9 és 48 családba tartozó enzimet.

Binek	Taxonómia	GH és CE gének								
Bin 1	<i>Clostridium</i> sp. N3C	GH3	GH10							
Bin 2	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	GH1	GH2	GH3	GH4	GH5	GH10	GH39	GH43	CE7
Bin 3	Unknown Clotridia	GH3								
Bin 4	[<i>Clostridium</i>] <i>clariflavum</i>	CE7								
Bin 5	Unknown <i>Thermoanaerobacterium</i>	GH1	GH10	GH67						
Bin 7	<i>Clostridium</i> sp. Bc-iso-3	GH2								
Bin 10	<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. PSU-2	GH1								

8. táblázat. Az egyes binekben előforduló cellulóz és hemicellulóz bontásra utaló szénhidrát bontó enzimek, GH - glikozid hidroláz, CE - szénhidrát észteráz (sárga: hemicelluláz aktivitás, zöld: celluláz és hemicelluláz aktivitás)

Glikozid hidroláz 1 család: A leggyakoribb ismert enzimek ebben a glikozid hidroláz családban a β -glükozidáz és β -galaktozidáz: jellemzően mindkét aktivitás ugyanazon a reakció helyen belül található. Más, gyakran talált aktivitás a 6-foszfo- β -glükozidáz és 6-foszfo- β -galaktozidáz, β -mannozidáz, β -D-fukozidáz és β -glükuronidáz. A GH1 család enzimjei széles körben elterjedtek az élőlényeken belül. (“www.cazypedia.org,”).

Glikozid hidroláz 2 család: A leggyakoribb enzim ebben a családban a β -galaktozidáz, β -glükuronidáz, β -mannozidáz, exo- β -glükozaminidáz és növényekben a mannozilglikoprotein endo- β -mannozidáz. Ezek az enzimek az élőlények széles körében előfordulnak, de a baktériumokban a leggyakoribbak. Ennek a családnak a legismertebb enzimje az *E. coli* (lacZ) β -galaktozidáz, a lac operon alkotóeleme (“www.cazypedia.org,”).

Glikozid hidroláz 3 család: A glikozid hidroláz 3 családba jelenleg exo-működésű β -D-glükozidázok, α -L-arabinofuranozidázok, β -D-xilopiranozidázok, N-acetil- β -D-glükózaminidázok (glikozid hidrolázok) és N-acetil- β -D-glükózaminid foszforilázok tartoznak. Széles körben elterjed a baktériumokban, gombákban és növényekben. A GH3 család enzimjei számos funkcióval rendelkeznek, beleértve a cellulóz tartalmú biomassza lebontását, növényi és bakteriális sejtfal átalakítását, energiametabolizmust és patogének elleni védekezést. Legtöbb esetben az enzimeknek kettős vagy széles szubsztrát-specifitásuk van a monoszacharidokra, a kötés helyzetére és a szubsztrátlánc hosszára vonatkozóan. A GH3 glikozid hidrolázok egy glikozil egységet távolítanak el a szubsztrát nem redukáló végéről (“www.cazypedia.org,”).

Glikozid hidroláz 4 család: Ennek a családnak a glikozid hidrolázai nagyrészt bakteriális eredetűek, de nemrég az archea taxonban is kimutatták őket. Ez a család α -glükozidázokat, α -galaktozidázokat, α -glükuronidázokat, 6-foszfo- α -glükozidázokat és 6-foszfo- β -

glükózidázokat tartalmaz. A GH1-hez hasonlóan néhány enzim a foszforilált szubsztrátokat részesíti előnyben a nem foszforiláltakkal szemben. A GH4 sajátossága mind az α - mind a β -glükózidázok jelenléte. Egy egyéni enzim azon képességét, hogy képes hidrolizálni természetes szubsztrátok különböző anomer konfigurációját, más glükózid hidroláz családban eddig még nem fedezték fel. A GH4 enzimek voltak az elsők, amelyek esetében kimutatták, hogy a katalitikus aktivitásukhoz szükségük van NAD^+ és kétértékű fémionokra és néhány esetben redukált környezetre (“www.cazypedia.org,”).

Glikózid hidroláz 5 család: A GH5 az egyik legnagyobb glikózid hidroláz család. Korábban celluláz A családnak nevezték, egy sor specificitás ismert már ebben a családban, nevezetesen endoglükánázok (cellulázok) és endomannanázok, valamint exoglükánázok, exomannanázok, β -glükózidázok és β -mannózidázok. Az egyéb aktivitású enzimek közé tartozik az 1,6-galaktanáz, 1,3-mannanáz, 1,4-xilanáz, endoglikoceramidáz, valamint nagy specificitású xiloglükánázok. A GH5 család enzimjei széles körben megtalálhatóak az archeák, baktériumok és eukarióták, különösen a gombák és növények között. Az első GH5 családba tartozó enzim, amelynek megfejtették a háromdimenziós szerkezetét a *H. thermocellum* CelC endoglükánáza volt (“www.cazypedia.org,”).

Glikózid hidroláz 10 család: Habár a család néhány glikózid hidroláza endo-1,3- β -xilanáz aktivitást mutat, az enzimek többsége endo-1,4- β -xilanáz. Az utóbbiból néhány korlátozott aktivitást mutat aril cellobiozidokon, de cellulózon nem (“www.cazypedia.org,”).

Glikózid hidroláz 39 család: Ez a glikózid hidroláz család főleg kétféle enzimaktivitású enzimből áll: β -xilozidáz és α -L-iduronidáz. Mindkét enzim ekvatoriális glikózid kötéseket hasít: az ' α ' megjelölés az α -iduronidázban a szénhidrátokra használt sztereokémiai megjelölés következménye, amelyben az α/β megjelölés azonos D/L megjelöléssel, amelyet a hexopiránózokban C5-nél a sztereokémia határoz meg. A β -xilozidáz aktivitáson felül, az ekvatoriális kötést hasító β -glükózidáz, β -galaktozidáz és xilanáz aktivitást is azonosítottak egy GH39 családba tartozó enzimmél. Ennek a családnak az enzimjei megtalálhatóak baktériumokban és eukariótákban, habár 11 GH39 családba tartozó enzim vélt kódoló génszekvenciájáról számoltak be a CAZy adatbázisban, amelyek archea eredetűek. Az ismert β -xilozidáz enzimek, amelyek enzimaktivitását kísérletesen kimutatták, mind mikrobiális eredetű, míg az α -L-iduronidáz enzimek mind metazoa eukarióta eredetűek. A legalaposabban tanulmányozott β -xilozidáz a *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* β -xilozidáza (“www.cazypedia.org,”).

Glikozid hidroláz 67 család: Ennek a családnak a glikozid hidrolázai α -glikuronidáz aktivitást mutatnak. Az enzimek a xilóz C2-OH kapcsolt glükuronsavat célozzák a xilooligoszacharidok nem redukáló végén. Az enzimek 4-O-metil-D-glükuronsav oldalláncokat előnyben részesítik. Az oligoszacharid hossza nem befolyásolja a reakciósebességet, amely azt mutatja, hogy az enzim csak az uronsavval és a kapcsolódó xilózzal lép kölcsönhatásba. Ezek az enzimek nem távolítanak el glükuronsavat a xilán belső régióiról. Az enzimek általában intracellulárisak vagy membránkapcsoltak, amely azt mutatja, hogy terminális szerepet játszanak a xilooligoszacharidok oldalláncainak eltávolításában, ezáltal ezek a gazda β -xilozidázai számára hozzáférhetővé válnak ("www.cazy.org,").

Szénhidrát észteráz 7 család: A szénhidrát észterázok (carbohydrate esterases - CE) a szubsztituált szacharidok de-O vagy de-N-acilezését katalizálják. Mivel egy észter = sav + alkohol, a szénhidrát észterázok számára a szubsztrátokat két osztályba sorolhatjuk: az egyik, amelyikben a cukor játssza a „sav” szerepét, például a pektin metil észterek és a másik, amelyikben a cukor alkoholként viselkedik, mint például az acetilált xilán. Számos lehetséges reakciómechanizmus vehet részt: A leggyakoribb a Ser-His-Asp katalitikus triád által katalizált deacetiláció, amely analóg a klasszikus lipáz és szerin proteáz működésével, de más mechanizmusok, mint például a Zn^{2+} katalizált deacetiláció néhány családban dominál ("www.cazy.org,").

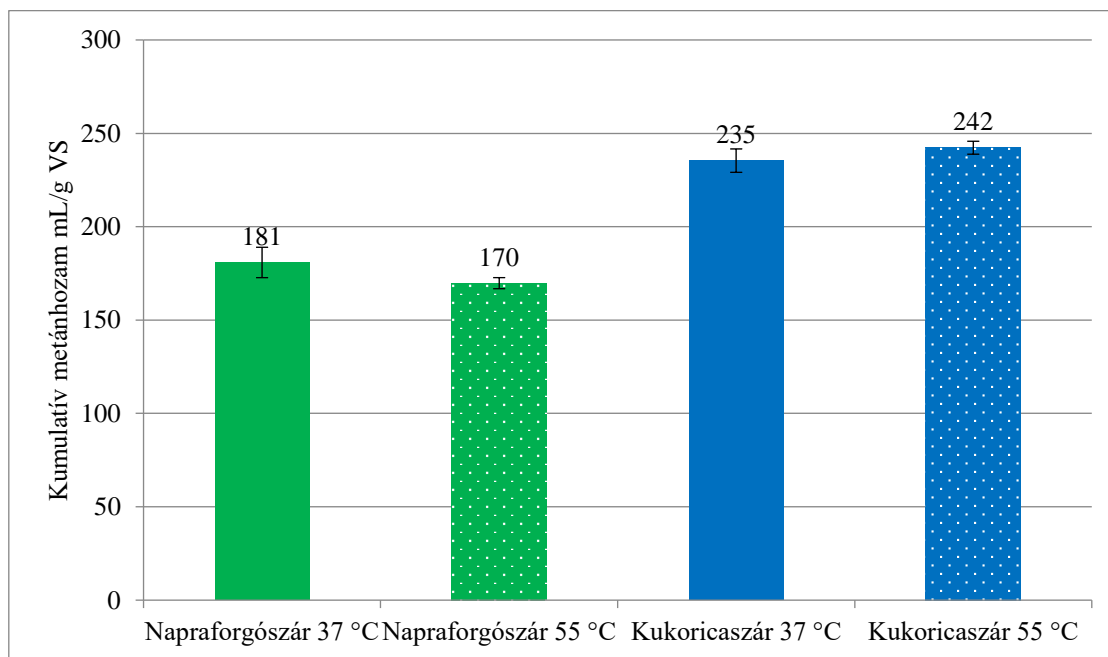
A szekvenciák read alapú vizsgálata során a Kraken által azonosított 5 faj, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Hungateiclostridium clariflavum*, *Hungateiclostridium thermocellum* és *Thermoclostridium stercorarium*, közül a genom alapú vizsgálat egyértelműen megerősítette a *T. thermosaccharolyticum*, *H. clariflavum* és *H. thermocellum* jelenlétét a konzorciumokban. A read alapon azonosított *T. xylanolyticum* 94%-os hasonlóságot mutat a *Thermoanaerobacterium* sp. PSU-2-vel, tehát ennek a törzsnek a jelenléte is valószínűsíthető. A bin 7 *Clostridium* sp. Bc-iso-3 szintén a *H. thermocellum*-hoz mutat nagyfokú hasonlóságot. A binelés eredménye megerősít és kiegészíti a read alapú kiértékelés eredményeit, a két megközelítéssel azonosított mikrobák jól beleillenek a hatékony lignocellulóz hidrolízisről alkotott képbe.

5.3 Kukorica- és napraforgószár fermentációja mezofil és termofil hőmérsékleten

A kukorica- és napraforgószár nagy mennyiségben keletkező mezőgazdasági melléktermék, általános kémiai összetétele a 9. táblázatban látható.

	Napraforgó szár ^a	Napraforgó szár ^b	Napraforgó szár ^c	Kukorica szár ^d	Kukorica szár ^d	Kukorica szár ^c
TS (% nedves tömeg)	94	96,4	-	94	94	-
VS (%)	88 ^e	89,4 ^e	-	87,4 ^g	90 ^g	-
Cellulóz (%)	34 ^f	25,1 ^f	31	41,2 ^g	40 ^g	37,5
Hemicellulóz (%)	20,8 ^f	11,6 ^f	15,6	28,1 ^g	28 ^g	22,4
Lignin (%)	29,7 ^{f,h}	32,5 ^{f,h}	29,2 ^h	8,72 ^{g,i}	9 ^{g,i}	17,6 ^h

9. táblázat. Napraforgó- és kukoricaszár kémiai összetétele: *a* (Monlau et al., 2012) *b* (Monlau et al., 2015), *c* (Sawatdeenarunat et al., 2015), *d* (Croce et al., , 2016), *e* - % nedves tömeg, *f* - % VS, *g* - % TS, *h* - Klason lignin, *i* - savdetergens lignin



18. ábra. Napraforgó- és kukoricaszár kumulatív metánkihozatala mezofil és termofil hőmérsékleten. 181±8, 170±3, 235±3, 242±3 mL/g VS (azonos szubsztrátnál $p>0,05$, eltérő szubsztrát esetén $p<0,05$).

A felhasznált kukoricaszár C/N aránya 47,1 volt. TS és VS tartalma 93,2% illetve 90,6%. A napraforgószár TS és VS tartalma 89,9% illetve 93,8%, a C/N aránya 41. A további kísérletekben felhasznált oltóiszap egy mezofil biogáz üzemből származott (Zöldforrás Kft., Szeged), melyet, ha 55 °C-on használtam, előtte ehhez a hőmérséklethez akklimatizáltam. Az általam vizsgált napraforgó- és kukoricaszár metánkihozatalában nem volt szignifikáns különbség mezofil és termofil hőmérsékleten (18. ábra). Viszont a kukoricaszár mindkét hőmérsékleten magasabb metánhozamot mutatott. A két szubsztrát C/N arányában nincs nagy különbség, a kukoricaszár esetén ez az érték 47, míg a napraforgószárnál 41. A különbség oka a két alapanyag eltérő összetétele lehet. A napraforgószár magasabb lignin tartalma lehet az alacsonyabb metánhozam oka (9. táblázat).

Antonopoulou és mtsai. (2010) a vizsgált napraforgó hulladék metánpotenciálját 240 mL CH₄/g VS-ben határozták meg. Monlau és mtsai. (2012) napraforgószár hétféle termokémiai előkezelését vizsgálták. Az előkezeletlen napraforgószár metánhozama 192±2 mL CH₄/g VS volt, míg a leghatékonyabbnak az 55 °C-on 4% NaOH-dal 24 óráig végzett előkezelés bizonyult 259±6 mL CH₄/g VS hozammal. Később a napraforgószár egyszakaszos metán, illetve kétszakaszos hidrogén/metántermelését vizsgálták lúgos előkezeléssel, illetve előkezelés nélkül. A félfolyamatos fermentációk alatt a metánhozam 152±4 és 150±3,5 mL CH₄/g VS volt az egy- illetve kétszakaszos rendszerben, az előkezeléssel ezek az értékek 191±3 és 196±3 mL CH₄/g VS-re nőttek. Ez 26% és 29% hozamnövekedést jelent az egyszakaszos, előkezelés nélküli értékhez képest (Monlau et al., 2015).

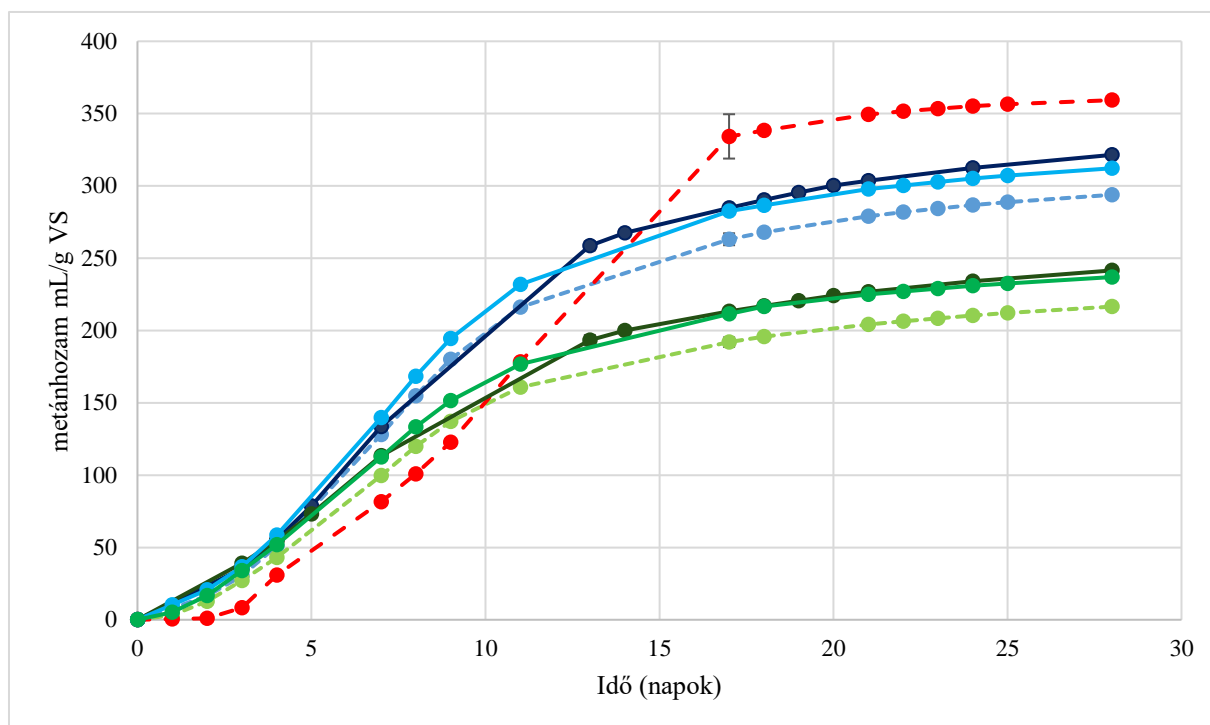
Zhang és mtsai. (2014) a kukoricaszár anaerob lebontásához egy új bionikus reaktort készítettek, amely a növényevő állatok bendőjét szimulálja. Az így kialakított reaktorról a kumulatív biogáz hozam 256,5 mL/g VS volt, amelynek 52,2% és 63,3% között változott a metán tartalma. Egy másik munkában kukoricaszár fermentációját bioaugmentálták egy ecetsav típusú fermentációra képes baktériummal, az *Acetobacteroides hydrogenigenes*-szel. Az *A. hydrogenigenes* 10 v/v%-os beoltásban 19-23%-kal növelte a metánhozamot amely így 258,1 mL/g kukoricaszár lett a kontroll 209,3 mL/g kukoricaszár értékéhez képest (Zhang et al., 2015). Papa és mtsai. (2015) kezeletlen kukoricaszár fermentációjának biometán potenciál értéke 271±2 dm³/kg dm volt. Zhong és mtsai. (2011) munkájuk során a kezeletlen kukoricaszár metánpotenciálját 136 mL_NCH₄/g TS állapították meg, míg mások kezeletlen kukoricaszár metánhozama esetén 143,8 mL/g VS értékről számoltak be (Li et al., 2015). Schroyen és mtsai. (2015) munkájukban a kukoricaszár biometán-potenciálját 192–288 NL/kg VS értékek között

határozták meg. Hu és mtsai. (2015) kezeletlen kukoricaszár fermentációja esetén $166 \pm 5 \text{ mL}_N \text{ CH}_4/\text{g VS}$ metánhozam értéket kapták.

Ezek alapján az irodalmi adatok alapján az általam mért metánhozamok megfelelnek az elvárt értékeknek mind a napraforgó- mind a kukoricaszár esetén.

5.4 Bioaugmentáció és előkezelés hatásának összehasonlítása: *Ruminiclostridium cellulolyticum*

Bioaugmentáció során a baktériumokat a fermentáció összeállításakor hozzáadtam az oltóiszaphoz (Zöldforrás Kft., Szeged) és szubsztráthoz. Az előkezelés ettől abban tért el, hogy a felnövesztett baktérium kultúrát először hozzáadtam a szubsztráthoz és együtt inkubáltam őket négy napig anaerob körülmények között, mielőtt az oltóiszappal indítottam a fermentációt. A *R. cellulolyticum* a mezofil cellulózbontás modellorganizmusa. Az általam végzett bioaugmentációs és előkezelési kísérletek eredményét a 19. ábra mutatja be. A bioaugmentáció és előkezelés hatása között (statisztikailag) nincs különbség sem a kukoricaszár sem a napraforgósár esetén. A kukoricaszár kumulatív metánhozama a bioaugmentációval, illetve előkezeléssel 6-9%-kal emelkedett. A napraforgósár metánhozama bioaugmentációval, illetve előkezeléssel 9-12%-kal emelkedett. Peng és mtsai. (2014) búzaszalma fermentációját bioaugmentálták *R. cellulolyticummal*. A vizsgálathoz két stratégiát alkalmaztak, amelyből a 2. stratégia lényegében egy előkezelés volt. A bioaugmentáció hatására 13%-kal, az előkezelés hatására 7,6%-kal emelkedett a metánhozam. Ezek az értékek hasonlóak az általam megfigyelt metánhozam növekedéssel. Mivel az adataim alapján az előkezelés és bioaugmentáció között nincs szignifikáns különbség, illetve Pengék a bioaugmentációt találták hatékonyabbnak, ezért a *R. cellulolyticum*-mal végzett szubsztrát előkezelés felesleges lépés. Az előkezelés elhagyása gazdaságilag előnyös, mivel az előkezeléshez szükség van egy anaerob tartályra, ahol a folyamat végbemegy. (Ennél a kísérletnél már az új gázzáró fecskendőt használtam a mérésekhez, az előző ábrához képest magasabb metánhozamok valószínűleg ennek köszönhetőek.)



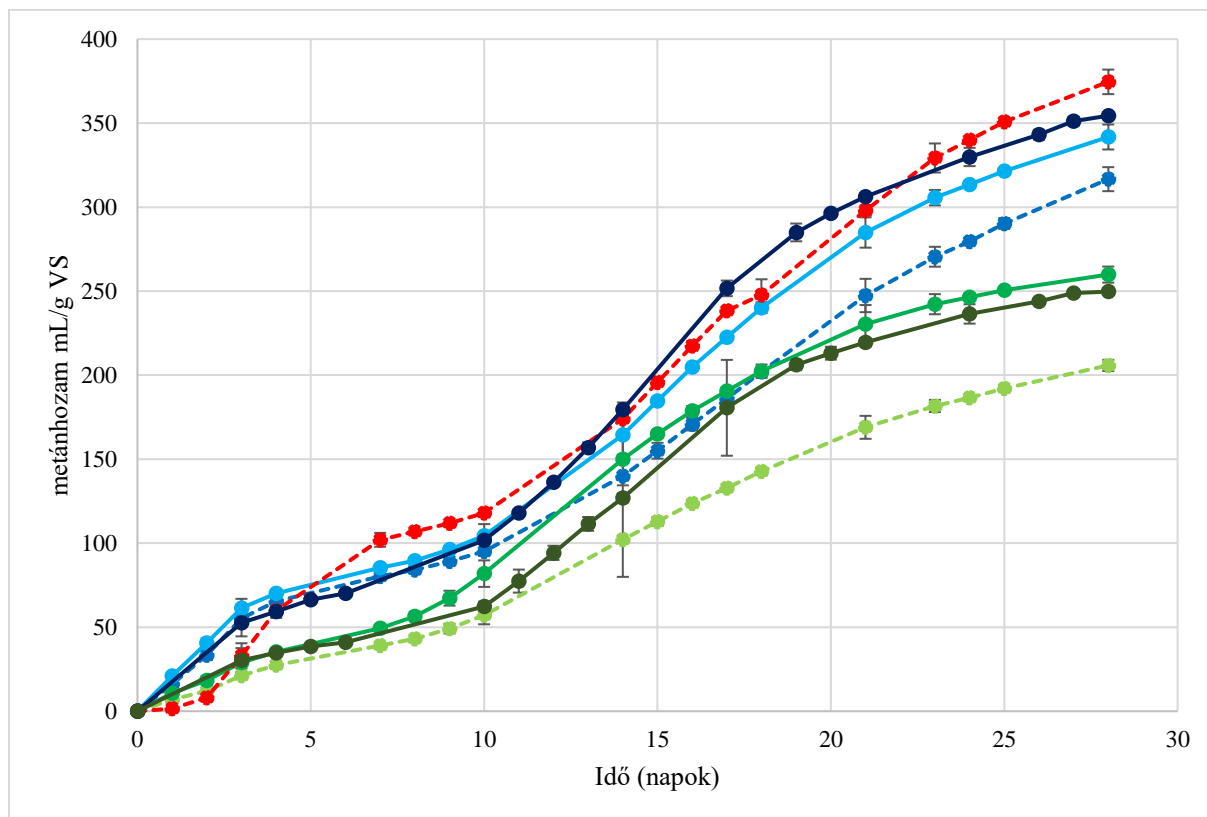
19. ábra. Napraforgó- és kukoricaszár fermentációjának bioaugmentációja és előkezelése *R. cellulolyticum*mal. Kukoricaszár (kék, szaggatott vonal) 294 ± 2 , *R. cellulolyticum* bioaugmentált kukoricaszár (világoskék) 313 ± 7 , *R. cellulolyticum* előkezelt kukoricaszár (sötétkék) 321 ± 5 , napraforgósár (zöld, szaggatott vonal) 216 ± 5 , *R. cellulolyticum* bioaugmentált napraforgósár (zöld) 236 ± 0 , *R. cellulolyticum* előkezelt napraforgósár (sötétzöld) 242 ± 8 , α -cellulóz (piros, szaggatott vonal) 368 ± 17 mL/g VS ($p > 0,05$ a bioaugmentáció és előkezelés között, $p < 0,05$ a csak biomasszát tartalmazó és kezelt fermentorok esetén).

5.5 Bioaugmentáció és előkezelés hatásának összehasonlítása:

Hungateiclostridium thermocellum

Bioaugmentáció során a baktériumokat a fermentáció összeállításakor hozzáadtam az oltóiszaphoz (Zöldforrás Kft., Szeged) és szubsztráthoz. Előkezelés itt is azt jelenti, hogy a felnövesztett baktérium kultúrát együtt inkubáltam a szubsztráttal négy napig mielőtt hozzáadtam az oltóiszapot. A *H. thermocellum* az egyik legjobban kutatott termofil cellulózbontó mikroorganizmus, bioaugmentációs képességéről több publikáció is tanúskodik. A kísérleteim során kapott eredményeket a 20. ábra mutatja. A 20. ábra kukoricaszár kumulatív metánhozama a bioaugmentációval, illetve előkezeléssel 8-12%-kal emelkedett. A napraforgósár metánhozama bioaugmentációval, illetve előkezeléssel 26% illetve 21%-kal emelkedett. Ezek között az értékek között sem a kukoricaszár, sem a napraforgósár esetén nincs szignifikáns különbség, tehát nincs szükség a szubsztrátok előkezelésére, bioaugmentációval is elérhető a kívánt hatás. Ez ipari alkalmazhatóság szempontjából fontos,

mert az anaerob lebontás folyamata egy lépésben elvégezhető, nincs szükség két szakaszos rendszerre.



20. ábra. Napraforgó- és kukoricaszár fermentációjának bioaugmentációja és előkezeltése *H. thermocellum*mal. Kukoricaszár (kék, szaggatott vonal) 317 ± 21 , *H. thermocellum* bioaugmentált kukoricaszár (kék) 342 ± 14 , *H. thermocellum* előkezelt kukoricaszár (sötétkék) 354 ± 18 , napraforgószár (zöld, szaggatott vonal) 206 ± 19 , *H. thermocellum* bioaugmentált napraforgószár (zöld) 260 ± 25 , *H. thermocellum* előkezelt napraforgószár (sötétzöld) 250 ± 26 , α -cellulóz (piros, szaggatott vonal) 375 ± 10 mL/g VS. A két lépcsős görbéért az oltóiszap tehető felelőssé. A benne található mikrobáknak több időre volt szükségük, hogy alkalmazkodjanak a körülményekhez ($p > 0,05$ a bioaugmentáció és előkezelés között, $p < 0,05$ a csak biomasszát tartalmazó és kezelt fermentorok esetén).

Az általam megfigyelt értékek már elérik az irodalomban is közölt metánhozam növekedés mértékét. Lü és mtsai. (2013) *Chlorella vulgaris* mikroalga fermentációját bioaugmentálták *H. thermocellum*mal 0%, 1%, 5% és 10 v/v%-ban, így 17-24%-kal nőtt a metánhozam. Ecem Öner és mtsai. (2018) a *H. thermocellum*ot 0%, 5%, 10%, 15% és 20 v/v%-ban használták marhatrágya és búzaszalma kofermentációjának bioaugmentációjára. A leghatékonyabban a 20%-os fermentorban emelkedett a metánhozam, 39%-kal a kontrollhoz képest. Tsapekos és mtsai. (2017) búzaszalmát, illetve búzaszalma és marhatrágya kofermentációját bioaugmentálták *H. thermocellum*mal. A szalma monosubsztrátként való használata esetén 34%-kal emelkedett a metánhozam, 221 mL CH₄/g VS-ről 296 mLCH₄/g VS-re. Aydin (2016) *Haematococcus pluvialis* mikroalga anaerob lebontását bioaugmentálta *H.*

thermocellum-mal. A fermentor beoltásához használt eltérő baktérium mennyiségek 18-38%-kal növelték a képződő metán mennyiségét, a 15 v/v%-os bizonyult a leghatékonyabbnak.

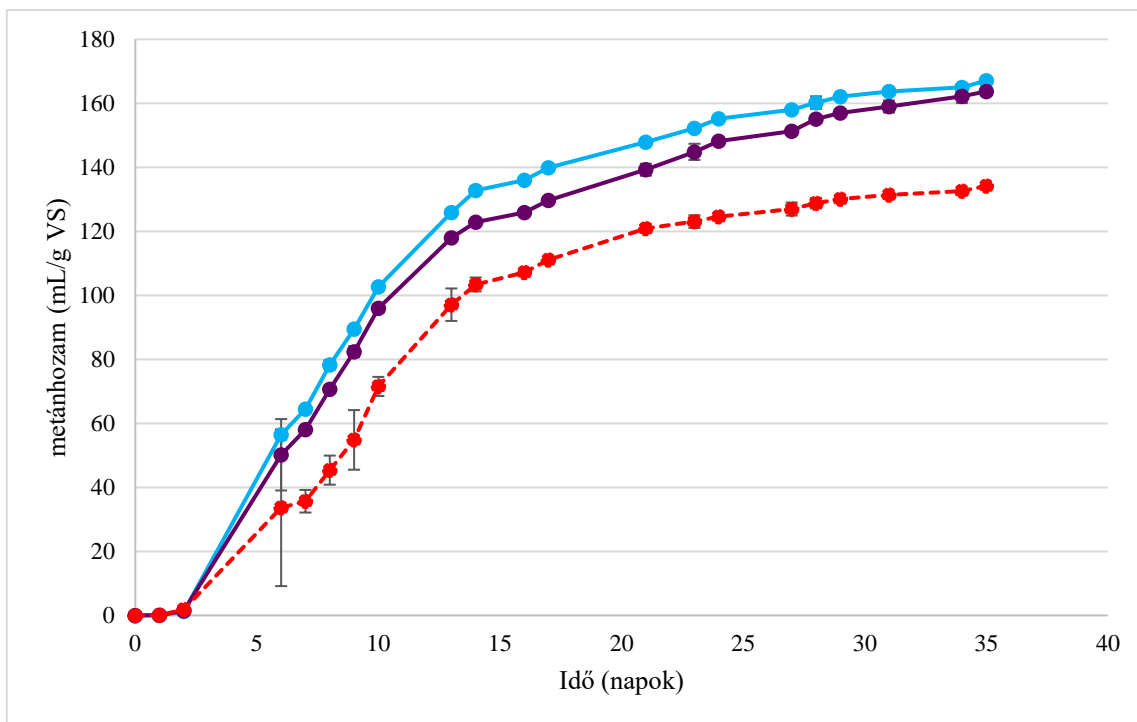
	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> (mL metán/g VS)	<i>Hungateiclostridium thermocellum</i> (mL metán/g VS)
kukoricaszár	294 (82%)	317 (85%)
bioaugmentált kukoricaszár	312 (87%)	342 (91%)
előkezelt kukoricaszár	321 (89%)	354 (95%)
napraforgószár	217 (60%)	206 (55%)
bioaugmentált napraforgószár	237 (66%)	260 (69%)
előkezelt napraforgószár	242 (67%)	250 (67%)
α -cellulóz	359 (100%)	375 (100%)

10. táblázat. 19. ábra-20. ábra- metánhozam értékei (zárójelben az α -cellulózból keletkezett metánhozamhoz viszonyított százalékos értékek vannak).

Mindkét cellulolitikus baktériumnál megfigyeltem, hogy a napraforgószár metánhozamát képes volt nagyobb mértékben fokozni, mint a kukoricaszár esetén (10. táblázat). Ez azt jelzi, hogy hatékonyan képesek bontani a magasabb lignintartalmú szubsztrátot.

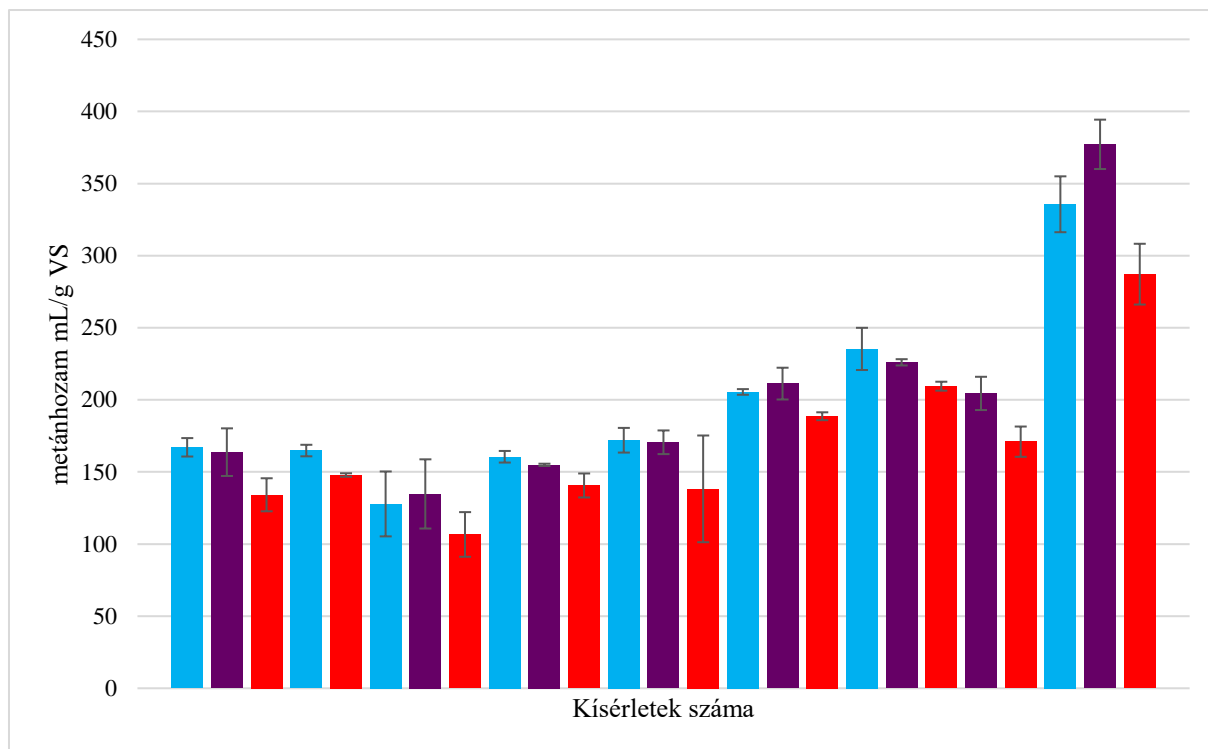
5.6 Az AD1 és AD2 kevert kultúrák bioaugmentációs hatása

Az izolált cellulózbontó konzorciumok augmentációs képességének vizsgálatához szubsztrátként kukoricaszárat használtam. A mechanikai előkezelés csökkenti a szubsztrát szemcseméretét és kristályosságát és növeli a baktériumok számára hozzáférhető felületet (Nanda et al., 2014). Egy tanulmányban például a silózott réti fű mechanikai előkezelése 8-25%-kal növelte a metánhozamot (Tsapekos et al., 2015). Kísérleteimben a fermentorokhoz adott kultúráknak pozitív hatásuk volt a gázhozamra. A mikrobák növesztéséhez használt tápoldat lehetséges hozzájárulásának hatását a megnövekedett biogáz hozamra szintén vizsgáltam. Az eredmények bizonyították, hogy a magasabb biogáz hozam a fermentorba juttatott AD1 és AD2 konzorciumok mikrobáinak tulajdonítható. A 21. ábra egy tipikus kísérleti eredményt mutat be. Habár a két dúsított konzorciumot külön kezeltem, nagyon hasonló bioaugmentációs viselkedést mutattak, a metánhozamot 22-24%-kal fokozták. Az ábrán megfigyelhető metánhozam 167, 164 és 134 mL az AD1, AD2 bioaugmentációjával, illetve a kontroll esetében.



21. ábra. AD1 (kék) 167 ± 6 és AD2 (lila) 164 ± 17 augmentációs hatása a biogáz fermentációra a kontroll kukoricaszárhoz (piros) 134 ± 11 mL/g VS hasonlítva. Számos esetben a hibásávok (standard szórás) kisebbek, mint a szimbólumok (három párhuzamos minta középértéke). ($p < 0,05$).

Számos bioaugmentációs kísérletet elvégeztem AD1 és AD2-vel. Ezek egy részének eredményeit mutatja be a 22. ábra. Ezen eredmények vizsgálatával megállapítottam, hogy AD1 $17 \pm 6\%$ -kal, míg AD2 $19 \pm 8\%$ -kal képes fokozni a metánhozamot.



22. ábra: AD1 és AD2 bioaugmentációs hatásai. A kék oszlopok jelzik az AD1 kumulatív metánhozamait, a lila oszlopok az AD2-höz tartozó értékek, a piros oszlopok pedig az adott szubsztrátból bioaugmentáció nélkül keletkező értékek ($p < 0,05$).

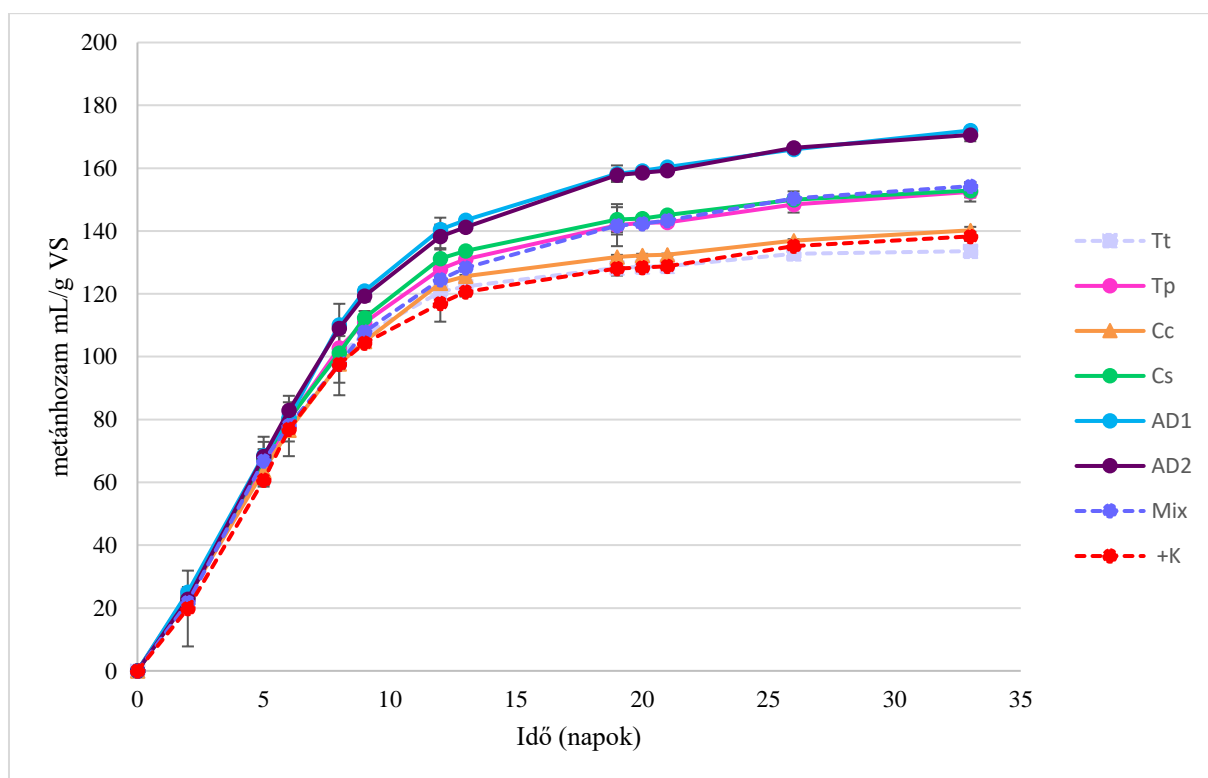
Korábbi tanulmányokban (Hua et al., 2016; Kinet et al., 2015; Tuesorn et al., 2013; Yuan et al., 2016, 2014; Zhang et al., 2011) számos kísérletet tettek, hogy a cellulózban gazdag szubsztrátok lebontását elősegítsék és bioaugmentációval növeljék a biogáz/biométánhozamot. A legrelevánsabb eredményeket, vagyis ahol termofil, anaerob kevert kultúrákat alkalmaztak, és amelyek fokozták a biogáz hozamot és/vagy kinetikát, illetve a kísérleti körülményeket a 11. táblázat összegezi. A publikált eredményeket nehéz pontosan összehasonlítani az általam közöltekkel. Az eltérő adatokból és a különböző kísérleti elgondolások ellenére a biogáz hozamra vonatkozó adatok és a bioaugmentáció foka a nem augmentált kontrollokhoz viszonyítva informatív lehet. Világos és nem meglepő a táblázat adataiból, hogy a biogáz hozam erősen eltér a felhasznált szubsztráttól függően és a százalékos növekedés is változó ezekben a tanulmányokban. A 164 mL CH₄/g VS hozam, amit a kukoricaszárból elértem és a biometánhozam növekedés (22-24%) amit AD1 és AD2-vel történő bioaugmentáció eredményezett úgy tűnik, hogy a figyelemre méltó eredmények körébe tartozik. A táblázatban felsorolt, dúsított termofil bioaugmentációs konzorciumokat felépítő taxonómiai csoportok a legtöbb esetben gyengén vannak azonosítva. Mindazonáltal figyelemre méltó, hogy a *Thermoanaerobacterales* és *Clostridiales* rend képviselőit gyakran azonosították a dúsított kultúrák kulcsszereplőiként.

Eredet	Taxonómiai kategória	Körülmények	Szubsztrát	Maximális bioaugmentáció termofil körülmények között	Referencia
MC3F-ből (lignocellulóz bontó mikroba konzorcium)	genus <i>Clostridium</i> , <i>Thermoanaerobacterium</i> , család <i>Rhodocyclaceae</i>	mezofil (37 °C) és termofil (50 °C), fakultatív anaerob	sertéstrágya	145 mL CH ₄ /g VS hozam; 10% növekedés	(Tuesorn et al., 2013)
komposzt	nem teljesen jellemzett, tartalmaz <i>Clostridium straminisolvens</i> CSK1, <i>Clostridium</i> sp. FG4b, <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. törzs M1-3, <i>Brevibacillus</i> sp. M1-5, és <i>Bordetella</i> sp.M1-6	termofil (50 °C), anaerob	lignocellulóz lakossági szilárd hulladékból gyapot szár rohadt kukorica siló	221 mL CH ₄ /g VS hozam; 125,5% növekedés 118 mL CH ₄ /g VS hozam; 136,4% növekedés 304 mL biogáz /g VS; 74.7% növekedés	(Hua et al., 2016; Yuan et al., 2016, 2014)
komposzt	<i>Clostridia</i> osztály	termofil (55 °C), anaerob	lignocellulóz szubsztrát	101 mL CH ₄ /g VS hozam; 12% növekedés	(Kinet et al., 2015)
talaj	<i>Thermoanaerobacterium</i> , <i>Thermanaerovibrio</i> , <i>Clostridium</i> és sok azonosítatlan, nem tenyésztett	termofil (55 °C)	kasszava (manióka) maradvány/ hulladék	259,5 mL CH ₄ /g VS hozam; 96,63% növekedés	(Zhang et al., 2011)

11. táblázat. Termofil lignocellulózbontó kevert kultúrák és a publikált bioaugmentációs képességük.

Érdekes kérdés az, hogy vajon ezek a törzsek és esetleg azok, amelyek mennyisége alacsonyabb, mint az 1%-os küszöb érték, milyen mértékben járulnak hozzá a bioaugmentációs hatáshoz, ha egyáltalán hozzájárulnak. Ennek a vizsgálatához, a négy legabundánsabb baktérium típus törzsét megvásároltam a német törzsgyűjteményből és a forgalmazó által ajánlott tápoldatukban növesztettem őket. Miután centrifugálással eltávolítottam a felneveléshez használt tápoldatot, $1-3 \times 10^8$ sejt/mL koncentrációjú sejtszuszpenziót használtam a bioaugmentációhoz, kukoricaszárat használva szubsztrátként. Az eredményeket a 23. ábra szemlélteti, a kontroll fermentorok a szubsztráton és oltóiszapon (Zöldforrás Kft.,

Szeged) kívül nem tartalmaztak hozzáadott mikrobákat, a Mix az 5.2.1 felyezetben feltüntetett relatív abundancia százalékok arányában tartalmazta a négy baktérium törzset. A *T. thermosaccharolyticum*, kontroll, *R. cellulolyticum*, *Tr. pseudethanolicus*, *C. subterraneus*, Mix, AD2 és AD1 esetén a metánhozam 134, 138, 140, 153, 153, 154, 171 és 172 mL/g VS, amelyek azt jelzik, hogy a négy baktérium törzs, illetve a keveréküknek a biogáz reaktorokhoz történő hozzáadása legtöbb esetben növelte a metánhozamot. Meglepő módon, a *T. thermosaccharolyticum*, a konzorcium legnagyobb mennyiségben jelenlevő tagja és a *R. cellulolyticum* egyedül nem mutatott jelentős növekedést a biometán-termelésben. A másik két abundáns törzs és a négy faj keveréke jobban teljesített. Fontos megjegyezni, hogy sem az egyedi tiszta kultúrák, sem a keverékük nem volt olyan hatékony, mint az eredeti közösségek, AD1 és AD2. Ez azt sugallja, hogy az alacsony számban jelen lévő baktériumok aktívan hozzájárulnak a pozitív hatáshoz. A négy legnagyobb mennyiségben jelen lévő törzs alkotja a teljes mikrobiális biomassza 64,3% (AD1) illetve 69,6%-át (AD2).



23. ábra. AD1 (kék) 172 ± 9 , AD2 (sötétlila) 171 ± 8 , *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (lila négyzet, szaggatott vonal) 134 ± 2 , *Caldanaerobacter subterraneus* (zöld) 153 ± 7 , *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* (magenta) 152 ± 17 , *Ruminiclostridium cellulolyticum* (narancssárga háromszög) 140 ± 6 és a keverékük (kék, szaggatott vonal) 154 ± 10 hatása a nem augmentált kukoricaszárhoz (piros, szaggatott vonal) 138 ± 37 mL/g VS hasonlítva. A szimbólumok három párhuzamos minta átlag értékét ábrázolják és a hibaszávok a standard szórást jelzik; $p < 0,05$ kivéve a *T. thermosaccharolyticum* és *R. cellulolyticum* esetén.

A bioaugmentációs kísérletekből látszik, hogy a megfelelő mikroba vagy konzorcium kiválasztásánál figyelembe kell vennünk a fermentálni kívánt szubsztrátot is. Az amelyik az egyik lignocellulóz tartalmú alapanyag esetén hatékonyan fokozza a gázhozamot nem feltétlenül teljesít ugyanúgy egy eltérő tulajdonságú és összetételű alapanyag esetén.

5.7 Eredmények jelentősége

A FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) adatbázisából és Scarlat és mtsai. munkájából (Scarlat et al., 2010) megbecsülhetjük a kukorica- és napraforgó termesztéskor keletkező hulladék mennyiségét, amely aránya a terméshez képest 0,9-1,2 illetve 2,2-3. Ezen kívül a mezőgazdasági hulladékok bioenergia előállításra használható mennyiségének becslésekor figyelembe kell vennünk, hogy bizonyos hányadukra szükség van a termőföldek szerves anyag tartalmának fenntartásában és az erózió elleni védelemben. Továbbá a gombatermesztésben is használhatják, illetve állatok, például szarvasmarha, ló és szamár számára alom lehet. Ezeknek a figyelembe vételével úgy becsülhetjük, hogy a keletkező kukorica- és napraforgószár 50% használható fel bioenergia termelésre (Scarlat et al., 2010). Mindezzel számolva, a 2012-2016 közötti öt éves periódus átlaga alapján Magyarországon évente $3,7 \times 10^6$ tonna kukoricaszárát és 2×10^6 tonna napraforgószárát lehetne felhasználni biogáz termelésre (12. táblázat).

Kukorica 2012-2016 átlag	Melléktermék mennyisége (t)	50%-os kihasználhatóság (t)	szerves szárazanyag tartalom (t)	metán potenciál (x10 ⁶ m ³)	metán potenciál (x10 ⁶ kg)	energia tartalom (x10 ⁶ MJ)	energia tartalom (x10 ⁶ kWh)
Magyarország	7 323 488	3 661 744	3 090 512	943	676	34 091	9 470
Európa	118 794 191	59 397 095	50 131 149	15 303	10 972	552 991	153 608
Világ	1 049 729 799	524 864 899	442 985 975	135 223	96 955	4 886 524	1 357 368
Napraforgó 2012-2016 átlag	Melléktermék mennyisége (t)	50%-os kihasználhatóság (t)	szerves szárazanyag tartalom (t)	metán potenciál (x10 ⁶ m ³)	metán potenciál (x10 ⁶ kg)	energia tartalom (x10 ⁶ MJ)	energia tartalom (x10 ⁶ kWh)
Magyarország	4 044 672	2 022 336	1 704 829	360	258	13 010	3 614
Európa	86 398 749	43 199 375	36 417 073	7 690	5 514	277 908	77 197
Világ	116 750 005	58 375 003	49 210 127	10 392	7 451	375 535	104 315

12. táblázat. Kukorica és napraforgó termesztése során keletkező hulladék mennyisége, metán potenciálja és energia tartalma 2012-2016 között Magyarországon, Európában és a világon (FAOSTAT)

A bioaugmentációs kísérletekben a kezeletlen szubsztrátok metánhozama a kukoricaszár esetén 294-317 mL/g VS, a napraforgószár esetén 206-217 mL/g VS között változott. Ezeknek az értékeknek az átlagából és a korábban megbecsült, éves átlagban Magyarországon keletkező kukorica- és napraforgószár mennyiségéből kiszámítható a biometán potenciáljuk. Az átlagértékeket korrigálva a szerves szárazanyag tartalommal a $3,7 \times 10^6$ tonna kukoricaszárból és 2×10^6 tonna napraforgószárból $3,1 \times 10^6$ tonna, illetve $1,7 \times 10^6$ tonna szerves szárazanyag keletkezik. Kukoricaszár esetén $943 \times 10^6 \text{ m}^3$, napraforgószár esetén $360 \times 10^6 \text{ m}^3$ a teljes metánpotenciál, amely kinyerhető lenne ezekből a mezőgazdasági hulladékokból. Ezek energia tartalma 9470 GWh, illetve 3614 GWh-nak felel meg, együttesen 13 084 GWh-át tesznek ki (12. táblázat). Magyarország lakossági elektromos energia fogyasztása átlagosan 10 683 GWh volt egy évben ugyanezen 5 éves időszak alatt. Tehát a kukorica- és napraforgószár metán formájában kinyerhető energiatartalma fedezné a magyar háztartások éves energiaigényét.

5.8 Összefoglalás

- Sikeresen adaptáltam a termofil, természetes biogáz termelő rendszert α -cellulóz szubsztráthoz.
- A feldúsított cellulóz bontó mikrobák biogáz hozamra gyakorolt hatása elérte a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* hatását.
- A dúsítási lépés után két kevert cellulózbontó kultúrát izoláltam (AD1 és AD2).
- A cellulózbontó konzorciumok metagenom analízise azt mutatta, hogy a meghatározó rendek a *Thermoanaerobacterales* és *Clostridiales*.
- A konzorciumok tárolási stabilitásának vizsgálatára 4 év elteltével újabb szekvenálást végeztem, illetve a korábbi szekvenciaadatokat is újra kiértékeltem. A meghatározó rendek továbbra is a *Thermoanaerobacterales* és *Clostridiales* lettek, viszont a legnagyobb mennyiségben jelen lévő baktérium kivételével (*T. thermosaccharolyticum*) az alacsonyabb számban jelen lévők megváltoztak, ami származhatott a bioinformatikai módszerek eltéréséből is.
- A genom-alapon végzett kiértékelés során 10 bint sikerült összeépíteni, ezek megerősítették a read-alapon végzett kiértékelés eredményeit.

- A kukoricaszár mezofil és termofil körülmények között is magasabb biogáz hozamot eredményezett, mint a napraforgószár.
- A cellulózbontó mikrobákkal végzett bioaugmentáció és előkezelés hasonló mértékben fokozta a metánhozamot.
- AD1 és AD2-vel végzett bioaugmentáció 22-24%-kal növelte a metánhozamot, a tiszta törzsek, illetve keverékük nem érte el ezt az értéket.
- A Magyarországon keletkező kukorica- és napraforgószár metánpotenciálja alapján ezek a mezőgazdasági melléktermékek képesek lennének fedezni a hazai háztartások éves energiaigényét.

6 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Prof. Kovács L. Kornélnak és Dr. Bagi Zoltánnak a szakmai irányításukat, a dolgozat elkészítéséhez adott tanácsaikat és hogy lehetőséget adtak ezen dolgozat elkészüléséhez. Köszönettel tartozom az SZTE Biotechnológiai Tanszék vezetőjének, Dr. Rákhely Gábornak, aki biztosította számomra a lehetőséget, hogy munkámat a tanszéken végezhessem el. Hálával tartozom Dr. Wirth Rolandnak a DNS izolálásban és a metagenomikai adatok kiértékelésében nyújtott segítségéért. Továbbá köszönöm az SZTE Biotechnológiai Tanszéken dolgozó kollégák segítségét, akik nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

7 Irodalomjegyzék

- Ács, N., Bagi, Z., Rákhely, G., Minárovics, J., Nagy, K., & Kovács, K. L. (2015). Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. *Bioresource Technology*, 186, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.098>
- Ahring, B. K., Sandberg, M., & Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(3), 559–565. <https://doi.org/10.1007/BF00218466>
- Albertsen, M., Hugenholtz, P., Skarshewski, A., Nielsen, K. L., Tyson, G. W., & Nielsen, P. H. (2013). Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nature Biotechnology*, 31(6), 533–538. <https://doi.org/10.1038/nbt.2579>
- Alneberg, J., Bjarnason, B. S., de Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., ... Quince, C. (2014). Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods*, 11(11), 1144–1146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3103>
- Alneberg, J., Bjarnason, B. S., De Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., ... Quince, C. (2014). Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods*, 11(11), 1144–1146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3103>
- Alves, M. M., Mota Vieira, J. A., Alvares Pereira, M., Pereira, A., & Mota, M. (2001). Effect of Lipids and Oleic Acid on Biomass Development in Anaerobic Fixed-Bed Reactors. Part I: Biofilm Growth and Activity. *Water Research*, 35(1), 255–263.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., & Ahring, B. K. (1993). A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: Focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(2), 159–166. <https://doi.org/10.1002/bit.260420203>
- Angelidaki, I., Irini, Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., & Stams, A. J. M. (2011). *Biomethanation and its potential. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 494). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>
- Angly, F. E., Felts, B., Breitbart, M., Salamon, P., Edwards, R. A., Carlson, C., ... Rohwer, F. (2006). The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biology*, 4(11), 2121–2131. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040368>
- Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F., & Amann, R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, 1(6), 517–523. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00065.x>
- Antonopoulou, G., Stamatelatos, K., & Lyberatos, G. (2010). Exploitation of rapeseed and sunflower residues for methane generation through anaerobic digestion: the effect of pretreatment. *Chemical Engineering Transactions*, 20(January 2016), 253–258. <https://doi.org/10.3303/CET1020043>
- Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6), 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>
- Aydin, S. (2016). Enhancement of microbial diversity and methane yield by bacterial bioaugmentation through the anaerobic digestion of *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5631–5637. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7501-0>
- Bagi, Z., Ács, N., Bálint, B., Horváth, L., Dobó, K., Perei, K. R., ... Kovács, K. L. (2007). Biotechnological intensification of biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2), 473–482. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1009-6>

- Barker, H. A. (1956). *Bacterial fermentations*. New York, Wiley,. Retrieved from <https://www.biodiversitylibrary.org/item/31026>
- Batstone, D. J., Keller, J., Newell, R. B., & Newland, M. (2000). Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. I: Model development. *Bioresource Technology*, 75(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00018-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00018-3)
- Béguin, P., Millet, J., & Aubert, J. P. (1992). Cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*: From manure to molecular biology. *FEMS Microbiology Letters*, 100(1–3), 523–528. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90256-N](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90256-N)
- Berry, D., Mahfoudh, K. Ben, Wagner, M., & Loy, A. (2011). Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7846–7849. <https://doi.org/10.1128/AEM.05220-11>
- Bond, T., & Templeton, M. R. (2011). History and future of domestic biogas plants in the developing world. *Energy for Sustainable Development*, 15(4), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2011.09.003>
- Boone, D. R., Whitman, W. B., & Rouvière, P. (1993). Diversity and Taxonomy of Methanogens. In J. G. Ferry (Ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics* (pp. 35–80). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2391-8_2
- Brady, A., & Salzberg, S. L. (2009). Phymm and PhymmBL: Metagenomic phylogenetic classification with interpolated Markov models. *Nature Methods*, 6(9), 673–676. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1358>
- Bruni, E., Jensen, A. P., & Angelidaki, I. (2010). Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology*, 101(22), 8713–8717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.108>
- Burrell, P. C., O’Sullivan, C., Song, H., Clarke, W. P., & Blackall, L. L. (2004). Identification, Detection, and Spatial Resolution of *Clostridium* Populations Responsible for Cellulose Degradation in a Methanogenic Landfill Leachate Bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2414–2419. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2414-2419.2004>
- Buswell, A. M., & Boruff, C. S. (1933). Mechanical Equipment for Continuous Fermentation of Fibrous Materials. *Industrial and Engineering Chemistry*, 25(2), 147–149. <https://doi.org/10.1021/ie50278a008>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P. G., Zhu, X., & Angelidaki, I. (2018). Taxonomy of anaerobic digestion microbiome reveals biases associated with the applied high throughput sequencing strategies. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20414-0>
- Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D. J., Guo, W., Liu, B., ... Zhao, Q. (2009). Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7182–7188. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.009>
- Carlsson, M., Lagerkvist, A., & Morgan-Sagastume, F. (2012). The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management*, 32(9), 1634–1650. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.04.016>
- Castorena-Cortés, G., Zapata-Peñasco, I., Roldán-Carrillo, T., Reyes-Avila, J., Mayol-Castillo, M., Román-Vargas, S., & Olguín-Lora, P. (2012). Evaluation of indigenous anaerobic microorganisms from Mexican carbonate reservoirs with potential MEOR application. *Journal of*

- Petroleum Science and Engineering*, 81, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2011.12.010>
- Chandra, R., Takeuchi, H., & Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(3), 1462–1476. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.11.035>
- Chen, T. H., & Day, D. L. (1986). Effects of temperature change on the stability of thermophilic fermentation of swine manure. *Agricultural Wastes*, 16(4), 313–317. [https://doi.org/10.1016/0141-4607\(86\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0141-4607(86)90061-2)
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Chimpong, S., Tachaapaikoon, C., Sornyotha, S., Pason, P., Waeonukul, R., Kosugi, A., & Ratanakhanokchai, K. (2014). Symbiotic Behavior during Co-culturing of *Clostridium thermocellum* NKP-2 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* NOI-1 on Corn Hull. *BioResources*, 9(2), 2471–2483. <https://doi.org/10.15376/biores.9.2.2471-2483>
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., ... Farrow', J. A. E. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations, (May), 812–826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
- D. T. Hill. (1982). A Comprehensive Dynamic Model for Animal Waste Methanogenesis. *Transactions of the ASAE*, 25(5), 1374–1380. <https://doi.org/10.13031/2013.33730>
- Demirel, B., & Scherer, P. (2011). Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy*, 35(3), 992–998. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.022>
- Desvaux, M. (2005). *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 741–764. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.003>
- Dick, G. J., Andersson, A. F., Baker, B. J., Simmons, S. L., Thomas, B. C., Yelton, A. P., & Banfield, J. F. (2009). Open Access Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures, 10(8). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-8-r85>
- Dohm, J. C., Lottaz, C., Borodina, T., & Himmelbauer, H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 36(16). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn425>
- Ecem Öner, B., Akyol, Ç., Bozan, M., Ince, O., Aydin, S., & Ince, B. (2018). Bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* to enhance the anaerobic biodegradation of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource Technology*, 249(October 2017), 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.040>
- Edwards, R. A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D. M., ... Rohwer, F. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-57>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., ... Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Ellabban, O., Abu-rub, H., & Blaabjerg, F. (2014). Renewable energy resources : Current status , future prospects and their enabling technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 748–764. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.113>
- Eren, A. M., Esen, C., Quince, C., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Delmont, T. O.

- (2015). Anvi'o : an advanced analysis and visualization platform for ' omics data, 1–29. <https://doi.org/10.7717/peerj.1319>
- Fardeau, M. L., Magot, M., Patel, B. K. C., Thomas, P., Garcia, J. L., & Ollivier, B. (2000). *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from oilfield water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2141–2149. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2141>
- Ferris, M. J., Muyzer, G., & Ward, D. M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 340–346. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.340-346.1996>
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., & Randerson, J. T. (1998). Primary Production of the Biosphere : Integrating Terrestrial and Oceanic Components, 281(July), 237–241.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays, 71(7), 4117–4120. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117>
- Fischer, J. R., Iannotti, E. L., & Porter, J. H. (1984). Anaerobic digestion of swine manure at various influent solids concentrations. *Agricultural Wastes*, 11(3), 157–166. [https://doi.org/10.1016/0141-4607\(84\)90042-8](https://doi.org/10.1016/0141-4607(84)90042-8)
- Gao, L., Wang, F., Gao, F., Wang, L., Zhao, J., & Qu, Y. (2011). Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* JU-A10 for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102(17), 8339–8342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.033>
- Gerardi, M. H. (2003). *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. Vasa. <https://doi.org/10.1002/0471468967>
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., ... Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), 1355–1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Goberna, M., Insam, H., & Franke-Whittle, I. H. (2009). Effect of biowaste sludge maturation on the diversity of thermophilic bacteria and archaea in an anaerobic reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2566–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.02260-08>
- Gomez-Alvarez, V., Teal, T. K., & Schmidt, T. M. (2009). Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *ISME Journal*, 3(11), 1314–1317. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.72>
- Goodwin, S., Gurtowski, J., Ethe-Sayers, S., Deshpande, P., Schatz, M. C., & McCombie, W. R. (2015). Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. *Genome Research*, 25(11), 1750–1756. <https://doi.org/10.1101/gr.191395.115>
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carre, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5(10). [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hansen, K. H., Angelidaki, I., & Ahring, B. K. (1998). Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. *Water Research*, 32(1), 5–12. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00201-7)

- Hasyim, R., Imai, T., Reungsang, A., & O-Thong, S. (2011). Extreme-thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated digested sewage sludge culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8727–8734. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.079>
- He, P. J. (2010). Anaerobic digestion: An intriguing long history in China. *Waste Management*, 30(4), 549–550. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.01.002>
- He, Q., Hemme, C. L., Jiang, H., He, Z., & Zhou, J. (2011). Mechanisms of enhanced cellulosic bioethanol fermentation by co-cultivation of *Clostridium* and *Thermoanaerobacter* spp. *Bioresource Technology*, 102(20), 9586–9592. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.098>
- Hemme, C. L., Fields, M. W., He, Q., Deng, Y., Lin, L., Tu, Q., ... Zhou, J. (2011). Correlation of genomic and physiological traits of *Thermoanaerobacter* species with biofuel yields. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7998–8008. <https://doi.org/10.1128/AEM.05677-11>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Hill, D. T., Cobb, S. A., & Bolte, J. P. (1987). Using Volatile Fatty Acid Relationships To Predict Anaerobic Digester Failure. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 30(2), 496–501. <https://doi.org/10.13031/2013.31977>
- Hill, D. T., & Holmberg, R. D. (1988). Long chain volatile fatty acid relationships in anaerobic digestion of swine waste. *Biological Wastes*, 23(3), 195–214. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(88\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0269-7483(88)90034-1)
- Hobson, P. N., Bousfield, S., Summers, R., & Kirsch, E. J. (1974). Anaerobic digestion of organic matter. *C R C Critical Reviews in Environmental Control*, 4(1–4), 131–191. <https://doi.org/10.1080/10643387409381614>
- Hodkinson, B. P., & Grice, E. A. (2015). Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Advances in Wound Care*, 4(1), 50–58. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0542>
- Holmes, D. E., & Smith, J. A. (2016). Biologically Produced Methane as a Renewable Energy Source. In S. Sariaslani & G. B. T.-A. in A. M. Michael Gadd (Eds.) (Vol. 97, pp. 1–61). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.09.001>
- <https://webstore.iea.org/world-energy-balances-2018>. (n.d.). Retrieved from <https://webstore.iea.org/world-energy-balances-2018>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/972903459>. (n.d.). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/972903459>
- Hu, Y., Pang, Y., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., ... Li, X. (2015). Promoting anaerobic biogasification of corn stover through biological pretreatment by liquid fraction of digestate (LFD). *Bioresource Technology*, 175, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.088>
- Hua, B., Dai, J., Liu, B., Zhang, H., Yuan, X., Wang, X., & Cui, Z. (2016). Pretreatment of non-sterile, rotted silage maize straw by the microbial community MC1 increases biogas production. *Bioresource Technology*, 216, 699–705. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.001>
- Huang, J., Mendoza, B., Daniel, J. S., Nielsen, C. J., Rotstajn, L., & Wild, O. (2013). Anthropogenic and Natural Radiative Forcing. In Intergovernmental Panel on Climate Change (Ed.), *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (pp. 659–740). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.018>
- Huse, S. M., Huber, J. A., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Welch, D. M. (2007). Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*, 8(7), 1–9.

<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r143>

- Huson, D. H., Mitra, S., Ruscheweyh, H., Weber, N., & Schuster, S. C. (2011). Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Research*, 21(9), 1552–1560. <https://doi.org/10.1101/gr.120618.111>
- Hwang, S., Lee, Y., & Yang, K. (2001). Maximization of acetic acid production in partial acidogenesis of swine wastewater. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(5), 521–529. <https://doi.org/10.1002/bit.10068>
- Imelfort, M., Parks, D., Woodcroft, B. J., Dennis, P., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2014). GroopM: An automated tool for the recovery of population genomes from related metagenomes. *PeerJ*, 2014(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.603>
- Izquierdo, J. A., Pattathil, S., Guseva, A., Hahn, M. G., & Lynd, L. R. (2014). Comparative analysis of the ability of *Clostridium clariflavum* strains and *Clostridium thermocellum* to utilize hemicellulose and untreated plant material. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0136-4>
- Jaenicke, S., Ander, C., Bekel, T., Bisdorf, R., Dröge, M., Gartemann, K. H., ... Goesmann, A. (2011). Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014519>
- Jarvis, Å., Nordberg, Å., Jarlsvik, T., Mathisen, B., & Svensson, B. H. (1997). Improvement of a grass-clover silage-fed biogas process by the addition of cobalt. *Biomass and Bioenergy*, 12(6), 453–460. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)00015-9)
- Jia, X., Mi, S., Wang, J., Qiao, W., Peng, X., & Han, Y. (2014). Insight into Glycoside Hydrolases for Debranched Xylan Degradation from Extremely Thermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*, 9(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106482>
- Jia, Y., Ng, S. K., Lu, H., Cai, M., & Lee, P. K. H. (2018). Genome-centric metatranscriptomes and ecological roles of the active microbial populations during cellulosic biomass anaerobic digestion. *Biotechnology for Biofuels*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1121-0>
- Jin, T., & Kim, J. (2018). What is better for mitigating carbon emissions – Renewable energy or nuclear energy? A panel data analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91(April), 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.022>
- Jünemann, S., Kleinbölting, N., Jaenicke, S., Henke, C., Hassa, J., Nelkner, J., ... Stoye, J. (2017). Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. *Journal of Biotechnology*, 261(August), 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.012>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- Kang, D. D., Froula, J., Egan, R., & Wang, Z. (2015). MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*, 3(8), e1165. <https://doi.org/10.7717/peerj.1165>
- Karlin, S., Mrázek, J., & Campbell, A. M. (1997). Compositional biases of bacterial genomes and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 179(12), 3899–3913. <https://doi.org/10.1128/jb.179.12.3899-3913.1997>
- Kaspar, H. F., & Wuhrmann, K. (1978). Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(1), 1–7. <https://doi.org/10.1128/aem.36.1.1-7.1978>
- Kelley, D. R., & Salzberg, S. L. (2010). Clustering metagenomic sequences with interpolated Markov

- models. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-544>
- Kim, M., Lee, K.-H., Yoon, S.-W., Kim, B.-S., Chun, J., & Yi, H. (2013). Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era. *Genomics & Informatics*, 11(3), 102. <https://doi.org/10.5808/gi.2013.11.3.102>
- Kinet, R., Destain, J., Hiligsmann, S., Thonart, P., Delhalle, L., Taminiau, B., ... Delvigne, F. (2015). Thermophilic and cellulolytic consortium isolated from composting plants improves anaerobic digestion of cellulosic biomass: Toward a microbial resource management approach. *Bioresource Technology*, 189, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.010>
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., & Conrad, R. (2003). Quantitative Detection of Methanotrophs in Soil by Novel. *Society*, 69(5), 2423–2429. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2423>
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B., & Angelidaki, I. (2010). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(5), 899–908. <https://doi.org/10.1002/bit.22616>
- Korem, T., Zeevi, D., Suez, J., Weinberger, A., Avnit-Sagi, T., Pompan-Lotan, M., ... Segal, E. (2015). Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. *Science*, 349(6252), 1101–1106. <https://doi.org/10.1126/science.aac4812>
- Kougias, P. G., & Angelidaki, I. (2018). Biogas and its opportunities — A review. *Frontiers in Environmental Science*, 12(June 2018), 1–22.
- Kovács, K. L., Ács, N., Kovács, E., Wirth, R., Rákhely, G., Strang, O., ... Bagi, Z. (2013). Improvement of Biogas Production by Bioaugmentation. *BioMed Research International*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/482653>
- Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. A., Gartemann, K. H., Krömeke, H., Neuweiger, H., ... Goesmann, A. (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology*, 136(1–2), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.06.003>
- Kuhad, R. C., & Singh, A. (1993). Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13(2), 151–172. <https://doi.org/10.3109/07388559309040630>
- Kulski, J. K. (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*, 3–60. <https://doi.org/10.5772/61964>
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 12(1), 118–123. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x>
- Lang, K., Schuldes, J., Klingl, A., Poehlein, A., & Daniel, R. (2015). New Mode of Energy Metabolism in the Seventh Order of Methanogens as Revealed by Comparative Genome Analysis of “ Candidatus Methanoplasma termitum ,” 81(4), 1338–1352. <https://doi.org/10.1128/AEM.03389-14>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, 9(4), 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lebuhn, M., Hanreich, A., Klocke, M., Schlüter, A., Bauer, C., & Pérez, C. M. (2014). Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe*, 29, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.006>
- Lee, L. L., Crosby, J. R., Rubinstein, G. M., Laemthong, T., Bing, R. G., Straub, C. T., ... Kelly, R. M. (2020). The biology and biotechnology of the genus Caldicellulosiruptor: recent developments in ‘Caldi World.’ *Extremophiles*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00792-019->

- Lee R. Lynd, Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, I. S. P. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>
- Lee, H. V., Hamid, S. B. A., & Zain, S. K. (2014). Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Lee, Y. E., Jain, M. K., Lee, C., & Zeikus, J. G. (1993). Taxonomic Distinction of Saccharolytic Thermophilic Anaerobes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(2), 41–51. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-41>
- Leng, L., Yang, P., Singh, S., Zhuang, H., Xu, L., Chen, W. H., ... Lee, P. H. (2018). A review on the bioenergetics of anaerobic microbial metabolism close to the thermodynamic limits and its implications for digestion applications. *Bioresource Technology*, 247(September), 1095–1106. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.103>
- Lerouxel, O., Cavalier, D. M., Liepman, A. H., & Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.009>
- Li, Jianghao, Zhang, R., Siddhu, M. A. H., He, Y., Wang, W., Li, Y., ... Liu, G. (2015). Enhancing methane production of corn stover through a novel way: Sequent pretreatment of potassium hydroxide and steam explosion. *Bioresource Technology*, 181, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.050>
- Li, Jing, Yuan, H., & Yang, J. (2009). Bacteria and lignin degradation. *Frontiers of Biology in China*, 4(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s11515-008-0097-8>
- Li, Q., & Liu, C.-Z. (2012). Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(14), 10648–10654. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.115>
- Li, Y., Park, S. Y., & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>
- Lin, L., Song, H., Tu, Q., Qin, Y., Zhou, A., Liu, W., ... Xu, J. (2011). The Thermoanaerobacter glycobioime reveals mechanisms of pentose and hexose co-utilization in bacteria. *PLoS Genetics*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002318>
- Lindgreen, S., Adair, K. L., & Gardner, P. P. (2016). An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Nature Publishing Group*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19233>
- Liu, F. H., Wang, S. B., Zhang, J. S., Zhang, J., Yan, X., Zhou, H. K., ... Zhou, Z. H. (2009). The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 952–966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04064.x>
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4516–4522. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4516-4522.1997>
- Liu, Y., Yu, P., Song, X., & Qu, Y. (2008). Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 2927–2933.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.04.004>

- Liu, Z. (2015). *Global Energy Interconnection*. Elsevier Science. Retrieved from https://books.google.hu/books?id=T_MQCgAAQBAJ
- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (1998). Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2691–2696. <https://doi.org/10.1128/aem.64.7.2691-2696.1998>
- Lü, F., Ji, J., Shao, L., & He, P. (2013). Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-92>
- Lu, X. (2014). *Biofuels: From Microbes to Molecules*. (X. Lu, Ed.). Caister Academic Press.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes. In *Systematic Bacteriology* (pp. 1–13). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_1
- Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 102(18), 8700–8706. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.012>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Madden, R. H. (1983). Isolation and Characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., Cellulolytic Thermophile. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(4), 837–840. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-837>
- Martin-Ryals, A., Schideman, L., Li, P., Wilkinson, H., & Wagner, R. (2015). Improving anaerobic digestion of a cellulosic waste via routine bioaugmentation with cellulolytic microorganisms. *Bioresource Technology*, 189, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.069>
- Massé, D. I., & Droste, R. L. (2000). Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 34(12), 3087–3106. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00064-6)
- McBee, R. H. (1954). The characteristics of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, 67(4), 505–506.
- McCoy, E., & McClung, L. S. M. (1935). Studies on anaerobic bacteria VI. *Archiv Für Mikrobiologie*, 6(1–5), 230–238.
- Mechichi, T., & Sayadi, S. (2005). Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, 40(1), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.050>
- Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7(1), 11257. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Merlin Christy, P., Gopinath, L. R., & Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>
- Meyer, F., Paarmann, D., D’Souza, M., Olson, R., Glass, E., Kubal, M., ... Rohwer, F. (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 386. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9->

- Meynell, P.-J. (1978). *Methane: Planning a Digester*. New York: Schocken Books.
- Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2012). Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology*, 120, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.040>
- Monlau, F., Kaparaju, P., Trably, E., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2015). Alkaline pretreatment to enhance one-stage CH₄ and two-stage H₂/CH₄ production from sunflower stalks: Mass, energy and economical balances. *Chemical Engineering Journal*, 260, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.108>
- Moore, G. E. (2006). Cramming more components onto integrated circuits, Reprinted from *Electronics*, volume 38, number 8, April 19, 1965, pp.114 ff. *IEEE Solid-State Circuits Society Newsletter*, 11(3), 33–35. <https://doi.org/10.1109/N-SSC.2006.4785860>
- Morris, J. G. (1975). The Physiology of Obligate Anaerobiosis. In A. H. Rose & D. W. B. T.-A. in M. P. Tempest (Eds.) (Vol. 12, pp. 169–246). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60282-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60282-9)
- Mösche, M., & Jördening, H. J. (1999). Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. *Water Research*, 33(11), 2545–2554. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00490-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00490-4)
- Mulat, D. G., Huerta, S. G., Kalyani, D., & Horn, S. J. (2018). Enhancing methane production from lignocellulosic biomass by combined steam-explosion pretreatment and bioaugmentation with cellulolytic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1025-z>
- Mutschlechner, M., Illmer, P., & Wagner, A. O. (2015). Biological pre-treatment: Enhancing biogas production using the highly cellulolytic fungus *Trichoderma viride*. *Waste Management*, 43, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.05.011>
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Nakamura, K., Oshima, T., Morimoto, T., Ikeda, S., Yoshikawa, H., Shiwa, Y., ... Kanaya, S. (2011). Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Research*, 39(13). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr344>
- Nanda, S., Mohammad, J., Reddy, S. N., Kozinski, J. A., & Dalai, A. K. (2014). Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4(2), 157–191. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0097-z>
- Nielsen, H. B., Uellendahl, H., & Ahring, B. K. (2007). Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy*, 31(11–12), 820–830. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.04.004>
- Nkemka, V. N., Gilroyed, B., Yanke, J., Gruninger, R., Vedres, D., McAllister, T., & Hao, X. (2015). Bioaugmentation with an anaerobic fungus in a two-stage process for biohydrogen and biogas production using corn silage and cattail. *Bioresource Technology*, 185, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.100>
- O-Thong, S., Khongkliang, P., Mamimin, C., Singkhala, A., Prasertsan, P., & Birkeland, N. K. (2017). Draft genome sequence of *Thermoanaerobacterium* sp. strain PSU-2 isolated from thermophilic hydrogen producing reactor. *Genomics Data*, 12, 49–51. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.02.012>

- O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2008). Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1204–1214. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.015>
- O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- O’Sullivan, C., Burrell, P. C., Clarke, W. P., & Blackall, L. L. (2007). A survey of the relative abundance of specific groups of cellulose degrading bacteria in anaerobic environments using fluorescence in situ hybridization. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1332–1343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03362.x>
- Onyenwoke, R. U., Kevbrin, V. V., Lysenko, A. M., & Wiegel, J. (2007). *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* sp. nov., a thermophilic heterotrophic anaerobe from Yellowstone National Park. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2191–2193. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65051-0>
- Osborn, A. M., Moore, E. R. B., & Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), 39–50. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00081.x>
- Pap, B., Györkei, Á., Boboescu, I. Z., Nagy, I. K., Biró, T., Kondorosi, É., & Maróti, G. (2015). Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresource Technology*, 177, 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.021>
- Papa, G., Rodriguez, S., George, A., Schievano, A., Orzi, V., Sale, K. L., ... Simmons, B. A. (2015). Comparison of different pretreatments for the production of bioethanol and biomethane from corn stover and switchgrass. *Bioresource Technology*, 183, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.121>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM : assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates , single cells , and metagenomes, 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.Freely
- Peng, X., Börner, R. A., Nges, I. A., & Liu, J. (2014). Impact of bioaugmentation on biochemical methane potential for wheat straw with addition of *Clostridium cellulolyticum*. *Bioresource Technology*, 152, 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.067>
- Perera, F. (2018). Pollution from fossil-fuel combustion is the leading environmental threat to global pediatric health and equity: Solutions exist. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph15010016>
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J., & Gaudin, C. (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a Cellulolytic, Mesophilic: Species from Decayed Grass. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(2), 155–159. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-2-155>
- Pind, P. F., Angelidaki, I., & Ahring, B. K. (2003). Dynamics of the anaerobic process: Effects of volatile fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(7), 791–801. <https://doi.org/10.1002/bit.10628>
- Poehlein, A., Zverlov, V. V., Daniel, R., Schwarz, W. H., & Liebl, W. (2013). Complete Genome Sequence of *Clostridium stercorarium* subsp. *stercorarium* Strain DSM 8532, a Thermophilic Degradar of Plant Cell Wall Fibers. *Genome Announc*, 1(2), e0007313. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00073-13>

- Quaiser, A., Zivanovic, Y., Moreira, D., & López-García, P. (2011). Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *ISME Journal*, 5(2), 285–304. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.113>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Corrigendum: Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(12), 1211. <https://doi.org/10.1038/nbt1217-1211b>
- Rademacher, A., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Schönberg, M., Szczepanowski, R., Goesmann, A., ... Klocke, M. (2012). Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), 785–799. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01265.x>
- Rehm, H.-J., & Reed, G. (1999). *Environmental Processes I*. (H. -J. Rehm & G. Reed, Eds.), *Biotechnology Second Edition* (Vol. 11A). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527620944>
- Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D. J., Guo, W., & Zhu, Y. (2008). Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated Thermoanaerobacterium ihermosaccharolyticum W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6124–6132. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.107>
- Richards, B. K., Cummings, R. J., Jewell, W. J., & Herndon, F. G. (1991). High solids anaerobic methane fermentation of sorghum and cellulose. *Biomass and Bioenergy*, 1(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(91\)90051-D](https://doi.org/10.1016/0961-9534(91)90051-D)
- Rodriguez, C., Alaswad, A., Benyounis, K. Y., & Olabi, A. G. (2016). Pretreatment techniques used in biogas production from grass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.02.022>
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Salimi, F., & Mahadevan, R. (2013). Characterizing metabolic interactions in a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. *BMC Biotechnology*, 13(1), 95. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-95>
- Sapci, Z. (2013). The effect of microwave pretreatment on biogas production from agricultural straws. *Bioresource Technology*, 128, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.094>
- Saripan, A. F., & Reungsang, A. (2013). Biohydrogen production by Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KCU-ED1: Culture conditions optimization using xylan as the substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 6167–6173. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.130>
- Sawatdeenarunat, C., Surendra, K. C., Takara, D., Oechsner, H., & Khanal, S. K. (2015). Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 178, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.103>
- Scarlat, N., Martinov, M., & Dallemand, J. F. (2010). Assessment of the availability of agricultural crop residues in the European Union: Potential and limitations for bioenergy use. *Waste Management*, 30(10), 1889–1897. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.04.016>
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., ... Goesmann, A. (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology*, 136(1–2), 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.008>

- Schnürer, A., & Jarvis, Å. (2018). *Microbiology of the Biogas process*.
- Schroyen, M., Vervaeren, H., Vandepitte, H., Van Hulle, S. W. H., & Raes, K. (2015). Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential. *Bioresource Technology*, 192, 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.051>
- Sharon, I., Morowitz, M. J., Thomas, B. C., Costello, E. K., Relman, D. A., & Banfield, J. F. (2013). Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization. *Genome Research*, 23(1), 111–120. <https://doi.org/10.1101/gr.142315.112>
- Shiratori, H., Sasaya, K., Ohiwa, H., Ikeno, H., Ayame, S., Kataoka, N., ... Ueda, K. (2009). *Clostridium clariflavum* sp. nov. and *Clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(7), 1764–1770. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.003483-0>
- Shrestha, S., Fonoll, X., Khanal, S. K., & Raskin, L. (2017). Biological strategies for enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass during anaerobic digestion: Current status and future perspectives. *Bioresource Technology*, 245(June), 1245–1257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.089>
- Siebert, I., & Banks, C. (2005). The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry*, 40(11), 3412–3418. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.025>
- Singh, J., Suhag, M., & Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*, 117, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
- Singh, S., Sarma, P. M., & Lal, B. (2014). Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* TERI S7 from oil reservoir flow pipeline. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(9), 4206–4214. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.179>
- Strazzer, G., Battista, F., Garcia, N. H., Frison, N., & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, 226(May), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>
- Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002>
- Strous, M., Kraft, B., Bisdorf, R., & Tegetmeyer, H. E. (2012). The binning of metagenomic contigs for microbial physiology of mixed cultures. *Frontiers in Microbiology*, 3(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00410>
- Sun, L., Liu, T., Müller, B., & Schnürer, A. (2016). The microbial community Structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of Straw and cellulose in batch tests. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0543-9>
- Sun, L., & Schnürer, A. (2016). Draft Genome Sequence of the Cellulolytic Strain *Clostridium* sp. Bc-iso-3 Isolated from an Industrial-Scale Anaerobic Digester. *Genome Announcements*, 4(5), e01188-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01188-16>
- Sung, S., & Liu, T. (2003). Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere*, 53(1), 43–52. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00434-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00434-X)
- Taub, M. A., Corrada Bravo, H., & Irizarry, R. A. (2010). Overcoming bias and systematic errors in next generation sequencing data. *Genome Medicine*, 2(12). <https://doi.org/10.1186/gm208>

- Teeling, H., & Glöckner, F. O. (2012). Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis-A bioinformatic perspective. *Briefings in Bioinformatics*, 13(6), 728–742. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs039>
- Tsapekos, P., Kougias, P. G., & Angelidaki, I. (2015). Biogas production from ensiled meadow grass; effect of mechanical pretreatments and rapid determination of substrate biodegradability via physicochemical methods. *Bioresource Technology*, 182, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.025>
- Tsapekos, P., Kougias, P. G., Vasileiou, S. A., Treu, L., Campanaro, S., Lyberatos, G., & Angelidaki, I. (2017). Bioaugmentation with hydrolytic microbes to improve the anaerobic biodegradability of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource Technology*, 234, 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.043>
- Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Petrova, E. V., & Netrusov, A. I. (2012). Biogas production by microbial communities via decomposition of cellulose and food waste. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(4), 377–384. <https://doi.org/10.1134/S0003683812040126>
- Tuesorn, S., Wongwilaiwalin, S., Champreda, V., Leethochawalit, M., Nopharatana, A., Techkarnjanaruk, S., & Chaiprasert, P. (2013). Enhancement of biogas production from swine manure by a lignocellulolytic microbial consortium. *Bioresource Technology*, 144, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.013>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2001a). Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s002530100760>
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2001b). Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(4), 555–562. <https://doi.org/10.1007/s002530100806>
- van Brakel, J. (1980). *The Ignis Fatuus of Biogas. Small-scale anaerobic digesters ("biogas plants"): a critical review of the pre-1970 literature*. Delft: Delft University Press.
- Van De Werken, H. J. G., Verhaart, M. R. A., VanFossen, A. L., Willquist, K., Lewis, D. L., Nichols, J. D., ... Kengen, S. W. M. (2008). Hydrogenomics of the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6720–6729. <https://doi.org/10.1128/AEM.00968-08>
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., ... Smith, H. O. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66–74. <https://doi.org/10.1126/science.1093857>
- Wang, Q., Kuninobu, M., Ogawa, H. I., & Kato, Y. (1999). Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 16(6), 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00016-1)
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., & Meng, L. (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, 33(5), 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.007>
- Wei, Y., Zhou, H., Zhang, J., Zhang, L., Geng, A., Liu, F., ... Yan, X. (2015). Insight into Dominant Cellulolytic Bacteria from Two Biogas Digesters and Their Glycoside Hydrolase Genes. *PLOS ONE*, 10(6), e0129921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129921>

- Weiland, P. (2010). Biogas production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 849–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
- Weiß, S., Tauber, M., Somitsch, W., Meincke, R., Müller, H., Berg, G., & Guebitz, G. M. (2010). Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite. *Water Research*, 44(6), 1970–1980. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.048>
- Westerholm, M., Moestedt, J., & Schnürer, A. (2016). Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy*, 179, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.06.061>
- Wilke, A., Glass, E. M., Bischof, J., Braithwaite, D., Souza, M. D., Gerlach, W., ... Desai, N. (2014). MG-RAST Manual, 132.
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-41>
- Wirth, R., Lakatos, G., Böjti, T., Maróti, G., Bagi, Z., Kis, M., ... Kovács, K. L. (2015). Metagenome changes in the mesophilic biogas-producing community during fermentation of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, 215, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.396>
- Wohlt, J. E., Frobish, R. A., Davis, C. L., Bryant, M. P., & Mackie, R. I. (1990). Thermophilic methane production from dairy cattle waste. *Biological Wastes*, 32(3), 193–207. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(90\)90048-W](https://doi.org/10.1016/0269-7483(90)90048-W)
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
- www.cazy.org. (n.d.). Retrieved from www.cazy.org
- www.cazypedia.org. (n.d.). Retrieved from www.cazypedia.org
- Xia, Y., Ju, F., Fang, H. H. P., & Zhang, T. (2013). Mining of Novel Thermo-Stable Cellulolytic Genes from a Thermophilic Cellulose-Degrading Consortium by Metagenomics. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053779>
- Xie, W., Wang, F., Guo, L., Chen, Z., Sievert, S. M., Meng, J., ... Xu, A. (2011). Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *ISME Journal*, 5(3), 414–426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.144>
- Xiong, W., Lin, P. P., Magnusson, L., Warner, L., Liao, J. C., Maness, P.-C., & Chou, K. J. (2016). CO₂-fixing one-carbon metabolism in a cellulose-degrading bacterium *Clostridium thermocellum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 13180–13185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605482113>
- Xu, Q., Resch, M. G., Podkaminer, K., Yang, S., Baker, J. O., Donohoe, B. S., ... Bomble, Y. J. (2016). Dramatic performance of *Clostridium thermocellum* explained by its wide range of cellulase modalities. *Science Advances*, 2(2), e1501254. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501254>
- Yan, X., Geng, A., Zhang, J., Wei, Y., Zhang, L., Qian, C., ... Zhou, Z. (2013). Discovery of (hemi-) cellulase genes in a metagenomic library from a biogas digester using 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18), 8173–8182. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4927-5>
- Yang, F., Zeng, X., Ning, K., Liu, K. L., Lo, C. C., Wang, W., ... Xu, J. (2012). Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME Journal*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.71>

- Yang, X., Chockalingam, S. P., & Aluru, S. (2013). A survey of error-correction methods for next-generation sequencing. *Briefings in Bioinformatics*, 14(1), 56–66. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs015>
- Yokoyama, H., Ohmori, H., Waki, M., Ogino, A., & Tanaka, Y. (2009). Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(1), 64–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.09.010>
- Yokoyama, H., Waki, M., Moriya, N., Yasuda, T., Tanaka, Y., & Haga, K. (2007). Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2), 474–483. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0647-4>
- Yuan, X., Ma, L., Wen, B., Zhou, D., Kuang, M., Yang, W., & Cui, Z. (2016). Enhancing anaerobic digestion of cotton stalk by pretreatment with a microbial consortium (MC1). *Bioresource Technology*, 207, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.037>
- Yuan, X., Wen, B., Ma, X., Zhu, W., Wang, X., Chen, S., & Cui, Z. (2014). Enhancing the anaerobic digestion of lignocellulose of municipal solid waste using a microbial pretreatment method. *Bioresource Technology*, 154, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.090>
- Yutin, N., & Galperin, M. Y. (2013). Genomics update A genomic update on clostridial phylogeny : Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia, 15, 2631–2641. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12173>
- Zhang, J., Guo, R. B., Qiu, Y. L., Qiao, J. T., Yuan, X. Z., Shi, X. S., & Wang, C. S. (2015). Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*, 179, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.022>
- Zhang, K., Ren, N. Q., Cao, G. L., & Wang, A. J. (2011). Biohydrogen production behavior of moderately thermophile *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 under different gas-phase conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14041–14048. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.056>
- Zhang, L., Loh, K. C., Lim, J. W., & Zhang, J. (2019). Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 100(July 2018), 110–126. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.10.021>
- Zhang, M., Zhang, G., Zhang, P., Fan, S., Jin, S., Wu, D., & Fang, W. (2014). Anaerobic digestion of corn stovers for methane production in a novel bionic reactor. *Bioresource Technology*, 166, 606–609. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.067>
- Zhang, Q., He, J., Tian, M., Mao, Z., Tang, L., Zhang, J., & Zhang, H. (2011). Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. *Bioresource Technology*, 102(19), 8899–8906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.061>
- Zhang, X., Tu, B., Dai, L. R., Lawson, P. A., Zheng, Z. Z., Liu, L. Y., ... Cheng, L. (2018). *Petroclostridium xylanilyticum* gen. Nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster iii members into four novel genera in a new hungateiclostridiaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(10), 3197–3211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002966>
- Zhao, C., O-Thong, S., Karakashev, D., Angelidaki, I., Lu, W., & Wang, H. (2009). High yield simultaneous hydrogen and ethanol production under extreme-thermophilic (70 °C) mixed culture environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5657–5665. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.057>

- Zhao, L., Cao, G.-L., Wang, A.-J., Ren, H.-Y., Zhang, K., & Ren, N.-Q. (2014). Consolidated bioprocessing performance of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* M18 on fungal pretreated cornstalk for enhanced hydrogen production. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 178. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0178-7>
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42(1), 35–53. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>
- Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Sun, S., Qiao, W., & Xiao, M. (2011). Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresource Technology*, 102(24), 11177–11182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.077>
- Zhou, Q., Su, X., & Ning, K. (2014). Assessment of quality control approaches for metagenomic data analysis. *Scientific Reports*, 4(4), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep06957>
- Zverlov, V. V., Hiegl, W., Köck, D. E., Kellermann, J., Köllmeier, T., & Schwarz, W. H. (2010). Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. *Engineering in Life Sciences*, 10(6), 528–536. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000059>

8 Összefoglaló

A mai társadalmunk nagyban függ az energiától, ezért az energiaválságnak komoly hatása van a gazdaságra is. Az utóbbi években a szükséges energiamennyiség gyorsan emelkedett a világ növekvő népességének és jómódjának köszönhetően; 1990 és 2016 között több mint kétszeresére emelkedett a világ energiafogyasztása. A világ teljes energiaigényének több mint 84%-át a nem megújuló fosszilis energiahordozók látják el, mint például a szén, kőolaj és földgáz. Ezeknek korlátozottak a kitermelhető készleteik és káros hatással vannak a környezetre, mivel felhasználásuk során üvegházhatású gázokat juttatunk a légkörbe. A megújuló energiahordozók (geotermikus energia, vízenergia, napenergia, szélenergia és biomassza) végső forrása a Nap. Alkalmas technológiákkal ezeket a természeti erőforrásokat elektromos árammá, hővé és üzemanyaggá lehet alakítani. A megújuló energiahordozók a jelenlegi globális energiaszükséglet háromezerszereséről képesek lennének gondoskodni. Világszerte majdnem minden ország érdekelt az új, tiszta és megújuló energia utánpótlás keresésében. Az elmúlt évtizedekben a biomassza energetikai hasznosítására irányuló kutatási törekvések főként a biodízelre és bioetanolra összpontosítottak. Ezek az első generációs bioüzemanyagok élelmiszernövényekből készülnek, mint például a kukorica, cukornád és pálmaolaj, és lehetséges alternatívának tűntek a világ benzin és dízel függőségének enyhítésére. Azonban, közvetve az élelmiszer árak növekedését okozták és így hozzájárultak a globális élelmiszer válsághoz. Ezért a második generációs bioüzemanyagok előállítása, ahol lehetőleg az egész biomasszát átalakítják elengedhetetlen ahhoz, hogy jelentősen növeljük a fenntartható, megújuló energia részarányát. A biogáz, amely a megújuló nyersanyagok anaerob lebontása során keletkezik, az egyik nagyon ígéretes alternatívája lehet a fosszilis-eredetű energiának. Az utóbbi időben, a lignocellulóz tartalmú biomassza, azaz a mezőgazdasági hulladékok és energianövények, egyre több figyelmet kapnak, mint megfelelő nyersanyag energia és különféle termékek előállítására. A lignocellulóz tartalmú biomassza bőségesen elérhető nyersanyagforrás. A lignocellulóz tartalmú biomassza elsődlegesen cellulózból, hemicellulózból és ligninből áll, ezek együttesen egy nagyon ellenálló szerkezetet hoznak létre. Ennélfogva, a lignocellulóz hidrolízise gyakran válik a sebességmeghatározó lépéssé a hasznosítás során. A növényi anyagból előállított metánban lévő energia a fotoszintézis során megkötött és mikroorganizmusok által biogázzá átalakított napenergia. Az így keletkező metán ezért szén-dioxid neutrálisnak tekinthető. A biogáz anaerob körülmények között keletkezik és főként metánból (55–70%) és szén-dioxidból (30–45%) áll. Az anaerob fermentáció folyamán, egy komplex, baktériumokat, gombákat és metanogén archeákat tartalmazó mikrobiális

közösség a szerves anyagokat négy fő metabolikus lépésben biogázzá alakítja. A biogázból tisztított biometán betáplálható a földgázhálózatba, sűrítve vagy cseppfolyósítva pedig üzemanyagként hasznosítható minden olyan területen, ahol ma fosszilis földgázt használunk.

A lignocellulóz hatékony hasznosításához szükség van kellő mennyiségű és aktivitású cellulózbontó mikroba jelenlétére a biogáz termelő közösségen belül. Dolgozatomban célul tűztam ki különböző cellulóz tartalmú szubsztrátok anaerob fermentációját, a fermentáció hatékonyságának fokozását, betekintést nyerni a cellulóz lebontásban résztvevő mikrobák világába.

Vizsgáltam, hogy a termofil, természetes biogáz termelő konzorcium képes-e adaptálódni az egyre nagyobb mennyiségben bevitt cellulóz tartalmú szubsztráthoz. A folyamat során monitoroztam a fermentorok megfelelő működését: mértem a keletkező biogáz mennyiségét, a fermentációs folyadék pH értékét, illékony zsírsav tartalmát és a β -glükozidáz enzimaktivitást, amely a cellulóz hidrolíziséről tanúskodik. Kontrolként glükózt használtam szénforrásként, mivel a cellulóz lánc glükóz monomerekből áll és a β -glükozidáz enzim aktivitásának hatására szintén glükóz molekulák szabadulnak fel.

Az adaptáció első szakaszában a glükózzal táplált fermentorokban az illékony zsírsavak közül a propionsav koncentrációja a metanogén mikrobák számára gátló küszöbérték fölé emelkedett, de láthatólag nem volt hatással sem a pH-ra sem a biogáz termelésre. Ez azt mutatja, hogy a rendszer jó pufferkapacitással rendelkezett.

Az adaptáció sikerének ellenőrzéséhez felhasználtam egy cellulózbontó baktériumot, a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, amelyet csoportunk már korábban sikeresen használt bioaugmentációs kísérletekben. Az adaptált (dúsított) konzorcium biogáz hozama (463 ± 4 mL/g VS) a kísérleti hibán belül meghaladta a nem-adaptált de cellulózbontó mikrobával kiegészített konzorcium biogáz hozamát (456 ± 21 mL/g VS) (11. ábra), illetve a cellulóz 1 gramm szerves szárazanyagra vonatkoztatott biogáz hozama a második szakaszban (463 ± 4 mL) 52%-kal meghaladta az első szakasz 304 ± 26 mL értékét (8. ábra), így ez is arra utal, hogy az adaptáció sikeres volt.

Sikeresen létrehoztam két termofil cellulózbontó közösséget ugyanabból a termofil biogáz effluensből kiindulva. A két konzorciumot AD1 és AD2-nek neveztem el. Az újgenerációs DNS szekvenálás felfedte az AD1 és AD2-ben megtalálható fő taxonokat és a legnagyobb számban jelenlévő fajokat. Korábbi kutatási eredményekkel megegyezően, a *Thermoanaerobacterales* és *Clostridiales* rend tagjai fontos szerepet játszanak a termofil lignocellulóz lebontásban. A korábbi tanulmányokban a lignocellulózbontó kultúrák jellemzésére használt módszerek nem tették lehetővé a konzorcium tagjainak faj szintű

azonosítását vagy relatív mennyiségi meghatározását a közösségben. Az eredményeim ezért új ismeretekkel bővítették a cellulóz bontás megismerésére törekvő kutatásokat. A két izolált konzorcium legnagyobb mennyiségben jelenlévő tagjainak összetétele és biológiai aktivitása nagyon hasonló. Az MG-RAST-tal végzett kiértékelés eredményeként a négy legabundánsabb törzs a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* és *Ruminiclostridium cellulolyticum*. Szintén azonosítottam számos alacsonyabb számban előforduló fajt. Ezen a szinten AD1 és AD2 között felfedezhető néhány különbség.

Az AD1 és AD2 stabilitásának vizsgálatához 4 évi gyakori használat és ismételt lefagyasztás után újra megszekvenáltattuk a két konzorciumból származó genomi DNS-t és a korábbi szekvenálásból származó eredményeket is újra kiértékeltek. A read-alapon végzett metagenomikai elemzéshez használt kiértékelő program, a Kraken, megváltoztatta a konzorciumok összetételét a korábbi eredményekhez képest. Az AD1 és AD2-t felépítő rendek a *Thermoanaerobacterales*, illetve *Clostridiales* rend, megegyeztek a korábban megfigyelttel. A legdominánsabb faj továbbra is a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* maradt, viszont a további, alacsonyabb abundanciával jelen lévő fajok a *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Hungateiclostridium clariflavum*, *Hungateiclostridium thermocellum* és *Thermoclostridium stercorarium* lettek, ami elsősorban a bioinformatikai kiértékelésnek és eltérő referencia adatbázisoknak tudható be. Az, hogy a két szekvenálás között nem tapasztalható nagy eltérés, a konzorciumok stabilitására utal. Elvégeztük az adatok genom-alapú kiértékelését is. Ezzel a módszerrel 10 bint sikerült összeilleszteni. Az azonosított binek között szerepel a *T. thermosaccharolyticum*, *H. clariflavum* és a *H. thermocellum* is. Ezek az eredmények is alátámasztják a read-alapú vizsgálat eredményeit. Megvizsgáltam az egyes binekben előforduló szénhidrátbontó enzimeket, amelyek a cellulóz és hemicellulóz hidrolízisben részt vesznek. Számos glikozid hidrolázt sikerült kimutatni, mint a GH1-5, GH10, GH39, GH43, GH67 és a szénhidrát észteráz 7 családot, amely a hatékony xilán lebontásban fontos.

A kukoricaszár mellett a napraforgószár is egy jelentős mezőgazdasági melléktermék. A két szubsztrát biometán potenciáljában eltérés tapasztalható, a napraforgószár metánhozama alacsonyabb mind mezofil, mind termofil körülmények között. Ennek a magyarázata az eltérő kémiai összetétel lehet, a kukoricaszár lignin tartalma alacsonyabb a napraforgószáréhoz képest. A szubsztrátok fermentációjának elősegítése cellulózbontó törzsekkel (*R. cellulolyticum* és *H. thermocellum*) végzett előkezeléssel, illetve bioaugmentációval sikeres volt, az előkezelés és bioaugmentáció között nem volt szignifikáns különbség. Ennek alapján felesleges egy plusz

lépésben előkezelní a szubsztrátot, elegendő a fermentorba juttatni a cellulózbontó baktériumokat, ami a folyamat szempontjából költséghatékonyabb. Érdekes módon a napraforgószár esetén gyorsabb metántermelés figyelhető meg 37 °C-on és 55 °C-on egyaránt. Ez azt jelzi, hogy a felhasznált cellulózbontó törzsek hatékonyan képesek bontani a magasabb lignin tartalmú szubsztrátot.

A fizikailag előkezelt kukoricaszár anaerob fermentációjának bioaugmentációja AD1 és AD2-vel 22-24%-kal növelte a kukoricaszár metánhozamát. Az MG-RAST-tal azonosított, legnagyobb mennyiségben előforduló törzsek tiszta kultúráival végzett bioaugmentációja sikeres volt. Azonban, a négy leggyakoribb törzs keveréke, amely a baktériumokat az izolált közösségnek megfelelő arányokban tartalmazta, nem érte el ugyanazt az augmentációs hatást, mint az AD1 és AD2. Ez arra utalhat, hogy a mikrobiális közösségek alacsonyabb számban jelen levő képviselői is hozzájárulnak a hozam növekedéshez. Tehát, a mikrobiális törzsek hozzájárulása az összteljesítményhez és a biológiai aktivitása eltérhet a relatív abundanciájuktól.

Statisztikai és irodalmi adatok segítségével megbecsültem a Magyarországon elérhető kukorica- és napraforgószár mennyiségét, amelyet biogáz fermentációhoz felhasználhatnánk. Az általam mért paraméterek felhasználásával kiszámítottam, hogy ebből mennyi metán állítható elő, illetve ennek mennyi az energiatartalma. A becslések alapján Magyarországon az éves szinten keletkező kukorica- illetve napraforgószár mezőgazdasági hulladékokból előállítható metán energiatartalma együttesen 13 084 GWh, amely képes fedezni a magyar háztartások éves energia igényét.

9 Summary

Modern society depends on energy to a great extent; therefore, energy crisis has serious effect on the economy too. Energy-requirement has grown rapidly in recent years, due to rising world population and affluence: between 1990 and 2016, the world energy consumption has more than doubled. More than 84% of the world's total energy demand is supported by non-renewable fossil resources, such as coal, oil and natural gas. These energy carriers are not only limited in supply but also have adverse effects on the environment due to the emission of greenhouse gases into the atmosphere. The ultimate source of renewable energy carriers (geothermal, water, solar, wind energy and biomass) is the Sun. With suitable technologies, these natural resources can be converted into electricity, heat and fuel. The renewable energy carriers could cover the current global energy need more than 3000 times. During the last decades, the biomass-based research efforts have focused mainly on bioethanol and biodiesel production. These first-generation biofuels are made from food or feed crops; hence they have contributed to the global food crisis.

The production of second-generation biofuels by the conversion of whole plants to biofuels, is essential. Biogas, which is generated in the anaerobic decomposition (AD) of organic materials, is one of the most promising alternatives to fossil energy. Lignocellulosic biomass, e.g., agricultural wastes and residues and energy plants, receive increasing attention as suitable materials to produce energy and various products. Purified biomethane can be fed into the natural gas grid, compressed or condensed biomethane can be used as fuel or raw material in every field where natural gas is used today. Methane originating from AD can be considered carbon neutral. Lignocellulose is comprised of cellulose, hemicellulose and lignin, together these create a very recalcitrant structure. Hence, the hydrolysis of lignocellulose frequently becomes the rate limiting step in AD. Biogas contains primarily methane (55–70%) and carbon-dioxide (30–45%). In AD a complex microbial community involving Bacteria, Archaea and Fungi breaks down the organic matter, which is organized into a microbial food chain.

For efficient utilization of the recalcitrant lignocellulose, the appropriate degrading microbes are indispensable in the biogas producing community. In this Thesis my aim was to study the AD of various cellulosic substrates to augment the fermentation efficiency and get a picture of the microbes taking part in cellulose degradation in AD.

First, I examined whether the natural biogas producing consortium was able to adapt to the increasing amount of cellulose containing substrate. The volume of the produced biogas,

pH value, volatile fatty acid (VFA) content and β -glucosidase enzyme activity were routinely measured. Glucose was used as “control” carbon source. In the first stage of adaptation, the reactors fed with glucose exhibited increased VFA production, i.e., propionic acid, which exceeded the inhibitory threshold for methanogens, but it influenced neither the pH nor the biogas production. This suggested a good buffer capacity of the system. In separate comparative experiments the cellulose degrading bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* was employed, which had been successful in related bioaugmentation experiments in our team earlier. The biogas yield of the adapted (enriched) consortium (463 ± 4 mL/g VS) was in the range of yields of the non-adapted samples supplemented with *C. saccharolyticus* (456 ± 21 mL/g VS) (Figure 11.). In the second stage, the biogas yield from cellulose (463 ± 4 mL mL/g VS) was 52% higher than the yield in the first stage (304 ± 26 mL mL/g VS) (Figure 6.), which also indicates the success of adaptation.

Two thermophilic cellulose degrading enrichment consortia were isolated from the same thermophilic biogas effluent, they were named as AD1 and AD2. Next generation DNA sequencing revealed the main orders and most abundant species. The orders *Thermoanaerobacterales* and *Clostridiales* played important roles in the thermophilic lignocellulose degradation. Based on the evaluation with MG-RAST software the four most abundant species were *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* and *Ruminiclostridium cellulolyticum* in both AD1 and AD2. Several additional community members were identified, which were present in much lower abundances. Differences were recognized between AD1 and AD2 at this level.

To test the stability of AD1 and AD2 upon long term storage, samples, which were kept frozen at -80 °C and thawed several times in a period of 4 years, were re-sequenced. This time the Kraken software package was used to evaluate the read-based metagenomic data sets. At the taxonomic resolution level of orders, AD1 and AD2 looked the same as 4 years earlier, i.e. the main components belonged in the orders *Thermoanaerobacterales* and *Clostridiales*. The most abundant species, i.e. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, did not change either. However, the other predominant species in both AD1 and AD2 were *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Hungateiclostridium clariflavum*, *Hungateiclostridium thermocellum* and *Thermoclostridium stercorarium*. Observing the discrepancies between the metagenomics analyses, the data-sets obtained 4 years earlier have been re-evaluated too. The results corroborated that the communities probably did not change

much and the differences were likely due to the use of distinct sequencing protocols, evaluation software and databases in the studies, which were 4 years apart.

The overall similarities between the enriched community structures suggest a considerable and stable preservation of the AD1 and AD2 consortia in time. Further, the genome-based taxonomic evaluation of the data was also carried out. This method 10 bins could be assembled, among them were *T. thermosaccharolyticum*, *H. clariflavum* and *H. thermocellum*. These results corroborated the conclusions of the read-based analysis. Numerous glycoside hydrolase enzyme families, such as GH1-5, GH10, GH39, GH43, GH67 and carbohydrate esterase family 7, were also identified in the genome-based evaluations.

Corn stover and sunflower stalk, two agricultural by-products generated in huge quantities, were tested for their biogas potential in bioaugmentation and pretreatment experiments using *R. cellulolyticum* and *H. thermocellum*. All treatment combinations were successful, although there was no significant difference between the beneficial effects of bioaugmentation and pretreatment. It seems therefore unnecessary to pretreat the lignocellulosic substrates, which is more costly than bioaugmentation.

Bioaugmentation of the anaerobic fermentation of mechanically pretreated corn stover with AD1 and AD2 increased the methane yield by 22-24%. Bioaugmentation experiments with pure cultures of most abundant strains identified with MG-RAST were successful. But the mixture of the four most abundant strains, in the ratio based on the isolated communities, did not reach the augmentation effects of AD1 and AD2. This indicated the importance of the low abundant members of the communities in the AD process.

Using the publicly available data, I estimated the average yields of corn stover and sunflower stalk in Hungary, which could be exploited for biogas production. When the results obtained in this Thesis were included in the calculations, the amount of methane and its energy content were projected, which is 13 084 GWh per year. This can cover the annual energy needs of the Hungarian households.