

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Bakteriális partner által elősegített alga hidrogéntermelési technológia fejlesztése és optimalizálása

Kazincziné Hupp Bettina

Témavezető:

Dr. Maróti Gergely

Növénybiológiai Intézet

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola

Növénybiológiai Tanszék

SZTE TTIK



2024

Szeged

1. Bevezetés

Korunk globális ökológiai problémái közé tartozik a klímaváltozás jelensége, amelyért az emberi beavatkozások mintegy 80%-ban tehetőek felelőssé (Das és Veziroğlu, 2001). A társadalom növekvő energiaigénye, a népességnövekedés, valamint a fosszilis energiaforrásokkal kapcsolatos aggodalmak miatt elengedhetetlenné válik az energiarendszerünk átalakítása. A fosszilis energiaforrásokkal kapcsolatos bizonytalanságok az erőforrások készleteinek gyors kimerüléséből, illetve az ehhez kapcsolódó gazdasági és politikai konfliktusokból erednek (Hall és mtsai., 2003). A fosszilis erőforrásokból származó energia (kőolaj, földgáz és szén) korlátozott, ezen felül az energiaforrások feltárása, feldolgozása és felhasználása jelentős környezeti hatásokat gyakorol a Földre (Pimentel, 1991).

A jelenlegi tudásunk alapján a megújuló energiaforrásokra való áttérés lehetőséget ad egy fenntarthatóbb energiarendszer kialakításához (Das és Veziroğlu, 2001). A megújuló erőforrások előnyös tulajdonságaik (olcsó, környezetbarát és nagy mennyiségben megtalálható) miatt nagy fontossággal bírnak. A legfőbb megújuló energiaforrásaink a vízenergia, a szélenergia, a napenergia és a geotermikus energia, melyek a Föld természeti erőforrásai.

A megújuló energiaforrások tekintetében a napenergia az egyik legfontosabb. A Nap a legnagyobb természetes erőforrás a Föld számára, energiájának hatékony hasznosítása a földi élet alapja. A napenergia elsődleges formái a hő és a fény, amelyek különböző módon képesek átalakulni és elnyelődni a környezetben. Ezen átalakulások némelyike megújuló energiaforrásokat eredményez, mint például a biomassa (Panwar és mtsai., 2011). A Napból érkező energia hasznosításának két módja van: az aktív és a passzív energiatermelés. Aktív napenergia felhasználás során a Napból érkező energia felfogására és felhasználására egy berendezést használunk, mint például napelemet, vagy napkollektort (Panwar és mtsai., 2011). Passzív energia felhasználás során elsősorban kivitelezési és tervezési megoldásokkal hasznosítjuk a napenergiát, például az épület kialakításával, vagy alkalmazott építőanyagok alkalmazásával (Correia és mtsai., 2022). A napenergiához kapcsolódó technológiák segítenek megoldani az emberiség előtt álló kihívásokat.

Ezen túlmenően, fontos megjegyezni, hogy a napenergia hidrogénné konvertálható. A hidrogén a világegyetem legnagyobb mennyiségében előforduló legegyszerűbb és legkönnyebb kétatomos eleme. Egyedülálló tulajdonságai miatt sok szempontból megfelelő megújuló energiaforrásként szolgálhat (Das és Veziroğlu, 2001; Han és Shin, 2004; Lee és mtsai., 2008;

Lin és mtsai., 2008; Suzuki, 1982). Nem radioaktív, nem toxikus és nem üvegházhatású gáz, valamint elége során víz keletkezik, ami ártalmatlan az emberre és a környezetre (Das és Veziroğlu, 2001; Suzuki, 1982). A hidrogén égése (122 KJ/g) körülbelül 2.75-szor hatékonyabb, mint a szénhidrogén üzemanyagoké. Ennélfogva a hidrogén a legmagasabb fűtőértékkel rendelkezik, amely 3042 cal/m³ (Lay és mtsai., 1999).

A hidrogén megközelítőleg 99%-a fosszilis tüzelőanyagokból származik, amelyek jelentős légszennyezést okoznak (Das és Veziroğlu, 2001). Emiatt szükség van olyan módszerek kifejlesztésére, amelyek a megújuló energiaforrásokra épülnek, és lehetővé teszik a környezetbarát hidrogéntermelést. Az egyik ígéretes megközelítés a zöldség felhasználása, mivel a fotoszintézis során rendkívül hatékonyan képesek hidrogént előállítani.

2. Célkitűzések

Számos energiahordozó között nagy jelentőséget bír a hidrogén, mint tiszta, alternatív és megújuló energiaforrás. Jelenleg számos olyan módszer létezik, amely egy alga törzs és egy mikroorganizmus együttes alkalmazásán alapulva biohidrogént képes előállítani. Jelen dolgozat a keményítő alapú mikroalga ko-kultúrák hidrogéntermelésének tulajdonságaira és a bakteriális partner kapcsolatára fókuszál. Ezek alapján célul tűztük ki:

1. A Mosonmagyaróvári Alga Kultúra Gyűjteményből a 2 leghatékonyabb biomassza termelésre képes hidrogéntermelő *Chlorella* törzs közül az alga-baktérium ko-kultúra hidrogéntermelésének vizsgálatára legalkalmasabb alga törzs kiválasztását.
2. A HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Biokémiai Intézetéből a 3 leghatékonyabb keményítóbontó *Bacillus* törzs közül a hidrogéntermelést, valamint az alga biomassza hozamot leginkább elősegítő bakteriális partner meghatározását.

A hidrogéntermelés tanulmányozására a *Chlamydomonas reinhardtii* alga törzset modellrendszernek tekintjük. Kísérleteink alapján a leghatékonyabb biomassza termelő alga törzsnek a *Chlorella* sp. MACC-360-at, valamint a leginkább elősegítő bakteriális partnernek a *Bacillus amyloliquefaciens* törzset választottuk. Ezek alapján célul tűztük ki:

3. A *Chlorella* sp. MACC-360 és a *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 kultúrához mesterségesen hozzáadott *Bacillus amyloliquefaciens* bakteriális partner hatásának vizsgálatát az algakultúrák sejtszám változásaira, a keményítóbontó képességekre, a hidrogéntermelésekre és az oxigénszint változásokra.
4. Az axénikus és az alga-baktérium ko-kultúrák állandó és folyamatos hidrogéntermelésének tanulmányozását a különböző hidrogéntermelési módszerek kombinációiban történő alkalmazásában.
5. A *Chlorella* sp. MACC-360 - *Bacillus amyloliquefaciens* ko-kultúra állandó és folyamatos hidrogéntermelésének fejlesztését acetátmentes tápoldatban a keményítóbontó képesség és az alga-baktérium arány meghatározása alapján.

3. Anyagok és módszerek

Kísérleteink első felében az LB tápoldatban felnevesztett bakteriális partnereket (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides* és *Bacillus cereus*) és a TAP tápoldatban felnevesztett legjobb biomassza hozammal rendelkező *Chlorella* algakultúrákat (*Chlorella* sp. MACC-38 és *Chlorella* sp. MACC-360) MM tápoldatba oltottuk át. Az alga-baktérium kultúrákat MM tápoldatból szintetikus szennyvízbe oltottuk át, és 4 napig növesztettük.

Kísérleteink második felében az LB tápoldatban felnevesztett *Bacillus amyloliquefaciens* bakteriális partnert és a TAP tápoldatban felnevesztett *Chlorella* sp. MACC-360 és *C. reinhardtii* cc124 algakultúrákat keményítőmentes, illetve keményítő tartalmú TAP, illetve TP tápoldatokba oltottuk át, és 7 napig növesztettük.

Az alga-baktérium ko-kultúrákat számos módszerrel vizsgáltuk meg. A légtér hidrogén és oxigén szintjeinek változásait **gázkromatográfiával** követtük. **Luna-FL Sejtszámlálót** és **Quantom Tx™ Mikrobiális Sejtszámlálót** alkalmazva követtük az alga-baktérium ko-kultúrák sejtszám változásait. Az alga-baktérium ko-kultúrák biomassza változásait **precíziós mérleg** segítségével mértük meg. A klorofill és a keményítő tartalom meghatározását **fluoreszcencia mérésekkel** követtük nyomon. A tápoldatok minőség és mennyiségbeli változásainak vizsgálatához **Hidex mikrolemez-leolvasót** és **pH mérőt** alkalmaztunk. **Fluoreszcens és pásztázó elektronmikroszkópos** vizsgálatokat alkalmazva figyeltük meg az alga-baktérium ko-kultúrák morfológiáját, megjelenését és exopoliszacharid termelését.

Az összes grafikont, számítást és statisztikai elemzést a GraphPad Prism szoftver 8.0 Windows PC-hez verzió segítségével végeztük el. Minden adatot egytényezős varianciaanalízisnek (ANOVA) vetettünk alá. Minden elemzésnél 5%-os statisztikai szignifikancia szintet állítottunk be.

4. Eredmények

Eredményeim alapján a feltett kérdésekre az alábbi válaszokat tudom megfogalmazni:

1. Teszteltük a három természetes bakteriális partner (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides* és *Bacillus cereus*) hatását a *Chlorella* sp. MACC-38 és *Chlorella* sp. MACC-360 sejtszám növekedésére, exopoliszacharid és hidrogéntermelésére. Az eredmények alapján a *Chlorella* sp. MACC-38 algakultúra magasabb biomassza hozama ellenére, a *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra produkált magasabb napi hidrogén mennyiséget, ha együtt növesztettük valamelyik *Bacillus* bakteriális partnerrel.
2. A bakteriális partnerek jelenléte elengedhetetlen volt a hidrogéntermelés beindításához a *Chlorella* fajok esetében, mivel önállóan nem voltak képesek a hidrogéntermelésre. Mindkét algakultúra a legnagyobb mennyiségű hidrogént *B. amyloliquefaciens* baktérium partnerrel együtt növesztve termelte, míg a legkevesebb hidrogént a *B. cereus* baktérium partner jelenlétében. A legstabilabb és legfenntarthatóbb napi hidrogéntermelést, a *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra *B. cereus* bakteriális partner jelenlétében produkálta.

A hidrogéntermelés tanulmányozására a *Chlamydomonas reinhardtii* algatörzset modellrendszernek tekintjük. Kísérleteink alapján a leghatékonyabb biomassza termelő algatörzsnak a *Chlorella* sp. MACC-360-at, valamint a leginkább elősegítő bakteriális partnernek a *Bacillus amyloliquefaciens* törzset választottuk.

Az elvégzett kísérletek alapján az alábbi eredményeket állapítottam meg:

3. Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét alga előnyben részesítette az acetát molekulát, mint a keményítő makromolekuláit és annak származékait TAP tápoldatban. Az acetát megváltoztatja a keményítő fizikai-kémiai tulajdonságát, emiatt az amilóz és amilopektin

láncok hidrolizálódnak. Ennek hatására az axénikus *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra képes volt felhasználni a keményítő lebontásából származó elektronokat, míg a *C. reinhardtii* cc124 nem tudta hasznosítani ilyen körülmények között. Egyik axénikus algatörzs sem tudta lebontani a keményítőt TP tápoldatban. Azonban a *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra képes volt keményítőt fogyasztani TP tápoldatban, amikor a bakteriális partnert adtuk hozzá. A bakteriális partner önmagában nem képes a hidrogéntermelésre egyik tápoldatban sem. A bakteriális partner jelenléte elengedhetetlen volt a *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra hidrogéntermelésének növelésére. TAP tápoldatban a legnagyobb hidrogéntermelést a *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra esetében 8 g/L keményítőt koncentrációban figyeltük meg, míg *C. reinhardtii* cc124 algakultúra esetében 16 g/L keményítőt tartalmazó tápoldatban. A bakteriális partner hozzáadása nem növelte jelentősen a *C. reinhardtii* cc124 algakultúra hidrogéntermelését sem TAP, illetve sem TP tápoldatban (keményítővel kiegészítve vagy anélkül).

4. Acetát tartalmú TAP tápoldatokban, az összes axénikus és alga-baktérium ko-kultúra (*C. reinhardtii* cc124 és *Chlorella* sp. MACC-360) képes volt a hidrogéntermelésre az 504 órás (21 napos) kísérlet végéig mind keményítő jelenlétében, mind keményítő nélkül. A kísérlet végéig a *C. reinhardtii* cc124 algakultúrákban alacsony mennyiségű, míg *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúrákban magasabb mennyiségű hidrogén termelődött keményítővel kiegészített, illetve keményítőtmentes TAP tápoldatokban is. A hozzáadott bakteriális partner erősen fokozta a *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra hidrogéntermelését, de a hozzáadott keményítő mennyisége nem serkentette tovább a hidrogéntermelést. Acetátmentes TP tápoldatban, a *C. reinhardtii* cc124 algakultúra nem volt képes hosszú távon a stabil hidrogéntermelésre. Az axénikus *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra csak akkor tudott hidrogént termelni, amikor együtt növesztettük *B. amyloliquefaciens* partnerrel (a kiinduló baktériumkultúra 3×10^5 sejt/mL kultúra) és a tápoldatot kiegészítettük keményítővel. Sajnos a keletkezett hidrogén mennyisége meglehetősen alacsony volt, és 288 óra (12 nap) múlva az algasejtek leálltak a hidrogéntermeléssel.
5. A kiinduló baktériumkultúra 3×10^5 sejt/mL kultúra sejtszámát megemeltük a 2,5-szeresére, míg az axénikus algakultúra kezdeti sejtszámát nem változtattuk. A *Chlorella* sp. MACC-360 algakultúra állandó, magas és folyamatos hidrogéntermelésre volt képes 8 g/L keményítővel kiegészített TP tápoldatban.

5. Summary

Based on my results, I can formulate the following answers to the posed questions:

1. The effects of three natural bacterial partners (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides* és *Bacillus cereus*) were tested on the biomass, exopolysaccharide and the hydrogen production of *Chlorella* sp. MACC-38 és *Chlorella* sp. MACC-360. Based on the algal-bacterial investigations, despite the higher biomass yield of *Chlorella* sp. MACC-38 algae culture, the *Chlorella* sp. MACC-360 algae culture produced a higher daily amount of hydrogen when grown together with one of the *Bacillus* bacterial partners.
2. The presence of bacterial partners was essential for the initiation of hydrogen production in the case of *Chlorella* species, as they were not able to produce hydrogen independently. Both algae cultures produced the largest amount of hydrogen when grown together with the bacterial partner *B. amyloliquefaciens*, while the least amount of hydrogen was produced in the presence of the bacterial partner *B. cereus*. The most stable and sustainable daily hydrogen production was produced by the algae culture *Chlorella* sp. MACC-360 in the presence of the bacterial partner *B. cereus*.

To study hydrogen production, we consider the algal strain *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system. Based on our experiments, we chose *Chlorella* sp. MACC-360 as the most efficient biomass-producing algal strain, and *Bacillus amyloliquefaciens* strain as the most helpful bacterial partner.

Based on the experiments conducted, I have determined the following results:

3. In general, we can say that clear differences were observed the using of acetate over the starch macromolecule and its derivatives in TAP medium. Acetate changes the physico-chemical properties of starch, causing hydrolyze of the amylose and amylopectin chains. As a result of this the pure *Chlorella* sp. MACC-360 culture was able to utilize electrons from starch degradation in the presence of acetate, while *C. reinhardtii* cc124 culture did not use it. None of the pure algal strains were able to degrade starch in TP medium. However, *Chlorella* sp. MACC-360 culture was able to consume starch in TP medium when

the bacterial partner was added. The bacterial partner is not capable of hydrogen production in all medium. Nevertheless, the presence of the bacterial partner was essential for *Chlorella* sp. MACC-360 culture to increase hydrogen production. *Chlorella* sp. MACC-360 culture has the highest hydrogen production in TAP medium with 8 g/L starch, while in the case of the *C. reinhardtii* cc124 culture, it was observed in a medium containing 16 g/L starch. The addition of the bacterial partner did not significantly increase the hydrogen production of the *C. reinhardtii* cc124 culture either in TAP or TP medium (with or without starch).

4. In TAP medium, all axenic and algal-bacterial co-cultures (*C. reinhardtii* cc124 and *Chlorella* sp. MACC-360) were able to produce hydrogen until the end of the 504-hour (21-day) experiment both in the presence of starch and without starch. By the end of the experiment, a low amount of hydrogen was produced in *C. reinhardtii* cc124 algae cultures, while a higher amount was produced in *Chlorella* sp. MACC-360 algae cultures, both in starch-supplemented and starch-free TAP medium. The added bacterial partner strongly enhanced the hydrogen production of the *Chlorella* sp. MACC-360 algal culture, but the amount of added starch did not further stimulate hydrogen production. In TP medium, the *C. reinhardtii* cc124 algal culture was not able to produce stable hydrogen in the long term. The axenic *Chlorella* sp. MACC-360 algae culture could produce hydrogen only when it was grown together with the partner *B. amyloliquefaciens* (starting bacterial culture 3×10^5 cells/mL culture) and the medium was supplemented with starch. Unfortunately, the amount of hydrogen produced was quite low, and after 288 hours (12 days) the algal cells stopped producing hydrogen.
5. The starting bacterial culture 3×10^5 cells/mL culture was increased to 2,5 times, while the initial cell number of the axenic algae culture was not changed. *Chlorella* sp. MACC-360 algal culture was capable of constant, high and continuous hydrogen production in TP medium supplemented with 8 g/L starch.

6. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10084726

Referált folyóiratokban megjelent közlemények

(A *-gal jelölt közlemények közvetlenül kapcsolódnak a Ph.D. értekezéshez)

***Hupp, B.**; Pap, B.; Farkas, A.; Maróti, G. Development of a Microalgae-Based Continuous Starch-to-Hydrogen Conversion Approach. *Fermentation* **2022**, 8, 294, doi:10.3390/fermentation8070294. (IF₂₀₂₂: 3,7)

***Hupp, B.**, Huszár, G., Farkas, A., Maróti, G. Algal Hydrogen Production and Exopolysaccharide Pattern in *Chlorella* – *Bacillus* Inter-Kingdom Co-cultures. *Fermentation* **2023**, 9, 424, doi:10.3390/fermentation9050424. (IF₂₀₂₃: 3,3)

Shetty, P., Farkas, A., Pap, B., **Hupp, B.**, Ördög, V., Bíró, T., Varga, T., Maróti, G., Comparative and phylogenomic analysis of nuclear and organelle genes in cryptic *Coelastrella vacuolata* MACC-549 microalgae. *Algal Research* **2021**, 58, 102380, doi: 10.1016/j.algal.2021.102380. (IF₂₀₂₁: 5,276)

Összesített IF: 12,276

Poszterek:

Hupp, B., Maróti, G., (2020) Mikroalga törzsek növekedésének és hidrogéntermelésének vizsgálata keményítőt tartalmazó közegben. *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium*, Magyarország, 2020.10.14.-16. (Poszter előadás)

Hupp, B., Maróti, G., (2020) Investigation of the growth and hydrogen production of microalgae strains in starch-containing media. *4th Young National Conference of Young Biotechnologists*, Zoom meeting, Magyarország, 2020.11.05.-27. (Poszter előadás)

Hupp, B., Pap, B., Farkas, a., Maróti, G., (2021) Mikroalga törzsek növekedésének és hidrogéntermelő képességének vizsgálata keményítőt tartalmazó közegben. *XIII. Magyar Növénybiológiai Társaság*, Magyarország, 2021.08.24.-27. (Poszter előadás)

Hupp, B., Pap, B., Farkas, a., Maróti, G., (2022) Mikroalga törzsek növekedésének és hidrogéntermelésének vizsgálata keményítőt tartalmazó közegben. *XXV. Tavaszi szél Konferencia*, Magyarország, 2022.05.06.-08. (Poszter előadás)

7. Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője nyilatkozom, hogy Hupp Bettina Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárul az alábbi tudományos publikációk létrehozásához, és tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésekben nem használjuk fel.

Hupp, B.; Pap, B.; Farkas, A.; Maróti, G. Development of a Microalgae-Based Continuous Starch-to-Hydrogen Conversion Approach. *Fermentation* **2022**, 8, 294, doi:10.3390/fermentation8070294. (IF₂₀₂₂: 3,7)

Hupp, B., Huszár, G., Farkas, A., Maróti, G. Algal Hydrogen Production and Exopolysaccharide Pattern in *Chlorella* - *Bacillus* Inter-Kingdom Co-cultures. *Fermentation* **2023**, 9, 424, doi:10.3390/fermentation9050424. (IF₂₀₂₃: 3,3)

.....

Dr. Maróti Gergely

Tudományos főmunkatárs

HUN-REN SZBK Növénybiológiai Intézet

Szeged, 2024. 12.16.