Növényi és állati eredetű hulladékok hasznosíthatósága biogáz előállítására

Doktori értekezés

Készítette:

Szilágyi Árpád

Témavezető:

Dr. Rákhely Gábor

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2021

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék ... 2
Rövidítések jegyzéke ... 4
1. Bevezetés ... 6
2. Irodalmi áttekintés ... 9
2.1. A növényi biomassza (lignocellulóz) és a benne rejlő lehetőségek, kihívások ... 9
2.2. Anaerob emésztés (AD), biogáz ... 10
2.2.1. Hidrolízis ... 12
2.2.2. Acidogenezis ... 15
2.2.3. Acetogenezis ... 16
2.2.4. Metanogenezis ... 18
2.3. Az AD-t befolyásoló legfontosabb tényezők ... 20
2.3.1. Hőmérséklet ... 20
2.3.2. Biogáz reaktorokban alkalmazott nyersanyagok jellemzői (C/N arány, tápanyagok, nyomelemek, szárazanyag-, szerves szárazanyag tartalom) ... 20
2.3.3. pH ... 22
2.3.4. Retenciós idő ... 23
2.3.5. Szerves terhelési sebesség ... 23
2.3.6. Fermentációs technológiák ... 24
2.4. Cirkuláris gazdaság ... 25
2.4.1. Hulladékból biogáz ... 26
2.5. Mikrobiális közösségek vizsgálata ... 31
2.5.1. Metagenomikai vizsgálatok és előzményei ... 31
2.5.2. Újgenerációs szekvenálási technikák ... 31
2.5.3. Harmadik generációs szekvenálási technikák ... 32
2.5.3. Metagenomika vizsgálati megközelítések ... 33
3. Célkitűzés ... 36
4. Anyagok és módszerek ... 37
4.1. Alkalmazott fermentációs technikák és a hozzájuk kapcsolódó mérések ... 37
4.1.1. Szakaszos fermentáció ... 37
4.1.2. Folyamatos üzemű fermentáció ... 37
4.1.3. Kétlépcsős fermentáció ... 39
4.1.4. Szárazanyag-, szerves szárazanyag tartalom meghatározás ... 40
4.1.5. Rostanalízis ... 41
4.1.6. Szén és nitrogén tartalom meghatározása ... 41
4.1.7. pH meghatározás ... 41
4.1.8. Összes szerves sav és pufferkapacitás meghatározása ... 42

4.1.9. Metántartalom meghatározás ... 42
4.1.10. Ammónium-ion meghatározás ... 43
4.1.11. Szerves savak mennyiségi meghatározása nagy teljesítményű folyadék kromatográffal (HPLC) ... 43
4.1.12. gDNS izolálás metagenom szekvenálásokhoz ... 44
4.2. Metagenom szekvenálás ... 44
4.2.1. 16S rRNS alapú metagenom szekvenálás ... 44
4.2.2. Shotgun metagenom szekvenálás ... 46
4.3. Az adatok kiértékelése és statisztikai elemzése ... 47
5. Eredmények és értékelésük ... 48
5.1. A PNM anaerob fermentációja ... 48
5.1.1. A PNM szén-, nitrogén, TS és oTS tartalmának meghatározása ... 48
5.1.2. A KSZ, a PNM és a KOF cellulóz, hemicellulóz és lignin tartalmának meghatározása ... 49
5.1.3. A KSZ, a PNM és a KOF szakaszos üzemű fermentációja ... 50
5.1.4. A KSZ, a PNM és a KOF folyamatos üzemű fermentációja ... 52
5.1.5. A tomatin és tomatidin hatása a szakaszos üzemű fermentációra ... 59
5.2. A juh- (JBT) és szarvasmarha bendőtartalom (SZBT) felhasználása biogáz előállítására ... 61
5.2.1. A bendőtartalom felhasználása inokulumként ... 61
5.2.2. A bendőtartalmak vízzel történő hígítási mértékének meghatározása ... 66
5.2.3. Kétlépcsős fermentáció: Savképző szakasz ... 68
5.2.4. A savképző szakasz mikrobiális közösségeinek vizsgálata ... 69
5.2.5. Kétlépcsős fermentáció: metántermelés ... 88
6. Összefoglalás ... 90
7. Köszönetnyilvánítás ... 98
8. Irodalomjegyzék ... 100

Rövidítések jegyzéke

AD: Anaerobic Digestion (Anaerob emésztés)

BMP: Biomethane Potential (Biometán Potenciál)

CAZy: Carbohydrate-Active enZyme (Szénhidrát-aktív enzim)

C/N: Carbon/Nitrogen ratio (Szén/Nitrogén arány)

dNTP: Deoxynucleoside Triphosphate (Dezoxinukleotid-trifoszfát)

dsDNS: double stranded DNS (kettős szálú DNS)

EC: Enzyme Commission Number (Enzim Osztályozási Szám)

FOS: Flüchtige Organische Säuren (Összes szerves sav)

FÜFKSZ: folyamatos üzemű fermentor kukoricaszárral etetve

FÜFKOF: folyamatos üzemű fermentor kofermentációs szubsztráttal etetve

FÜFPNM: folyamatos üzemű fermentor paradicsom növényi maradvánnyal etetve

GC: Gas Chromatograph (gázkromatográf)

GTDB: Genome Taxonomy Database

HPLC: High-performance Liquid Chromatograph (Nagy teljesítményű folyadék kromatográf)

KSZ: kukoricaszár

KOF: kofermentációs szubsztrát

NGS: Next Generation Sequencing (Újgenerációs szekvenálás)

oTS: organic Total Solid (Szerves szárazanyag tartalom)

PCR: Polimerase Chain Reaction (Polimeráz láncreakció)

PNM: paradicsom növényi maradvány

RNS: ribonukleinsav

ssDNS: single stranded DNS (egyes szálú DNS)

TAC: Totales Anorganisches Carbonat (Pufferkapacitás)

TCD: Thermal Conductivity Detector (Hővezetőképességi detektor)

TE: Tris-EDTA puffer

TS: Total Solid (szárazanyag tartalom)

TWh: Terawatt-hour (Terawattóra)

V: Variable Region (a 16S rRNS gén variábilis régiója)

VDI 4630: Verein Deutscher Ingenieure (VDI 4630 szabvány)

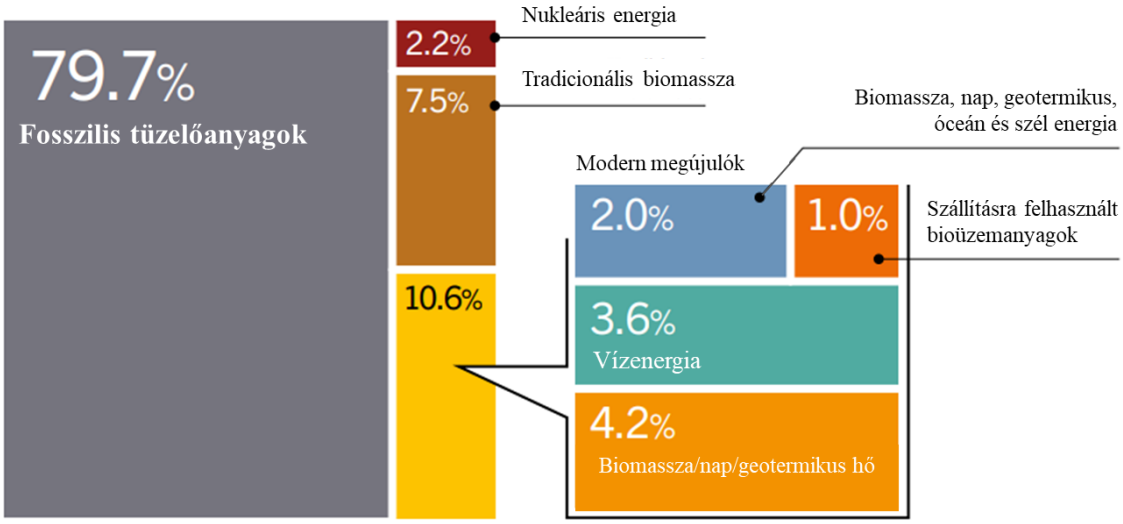
VFAs: Volatile Fatty Acids (illékony szerves savak)

W: watt

16S rRNS: a riboszómális RNS kis alegysége

1. Bevezetés

Korunk társadalmának számos környezeti problémával kell szembenéznie, mint például az egyre növekvő szerves hulladékok mennyisége, azok kezelése, a fosszilis tüzelőanyagok fokozott használata, a készleteink végessége, valamint az azok használatából eredő különféle környezetszennyezések, mint például a levegő-, talaj- és vízszennyezés. A növekvő népesség energiaigénye napról-napra egyre nagyobb és jelentős növekedést mutat az elmúlt néhány évtizedben. Míg a globális energiafelhasználás 1978-ban mintegy 85.000 Terawattóra (TWh) volt, addig 2018-ra ez a duplájára nőtt, mintegy 170.000 TWh-ra [1]. A folyamatosan növekvő energiafelhasználást napjainkban még legfőképpen a fosszilis tüzelőanyagok elégetésével elégítjük ki, azonban a becslések alapján nem megújuló energiatartalékaink már csak rövid ideig elegendőek. Az égetés során az évmilliókkal ezelőtt megkötött szén szén-dioxid (CO_2) formájában felszabadul és növeli a légkör üvegházhatású gázkoncentrációját, minek köszönhetően klímaváltozás és globális felmelegedés következik be. Egy 2019-ben megjelent jelentés alapján, 2017-ben a világ energiatermelését 79,7 %-ban még mindig a fosszilis tüzelőanyagok elégetésével fedeztük, a fennmaradó 20,3 %-ot pedig megújuló energiaforrások felhasználásából (1. ábra).



1. ábra

Becsült, összes energia felhasználás megoszlása 2017-ben [2]

A fentieknek megfelelően korunk kutatói számára az egyik legnagyobb kihívást az jelenti, hogy új, megújuló energiaforrásokat és technológiákat keressenek és dolgozzanak ki, melyek

képesek a fosszilis tüzelőanyagok kiváltására, és környezetkímélő módon képesek energiaigényünk fenntartható módon történő kielégítésére. Számos megoldás már létezik vagy van formálódóban, mint például a természeti erők kiaknázásán alapuló nap-, szél-, víz-, geotermikus energia, a nukleáris energia, vagy a szerves hulladékok mennyiségének csökkentésére is alkalmas biomassza alapú energia. Azonban ezen energiaforrások is rejtenek magukban problémákat, melyek jelentősen befolyásolhatják a környezet terhelését és a gazdaságosságot. A napból származó energia mennyisége például régiótól, napi-, illetve éves ciklustól is függ. Legalkalmasabb helyek ezen energia alkalmazására a szubtrópusi területek, ahol az éves átlag napenergia 300 Watt (W)/m^2, ellentétben az északi területekkel, ahol ugyanez az érték mindössze 50 W/m^2. Emellett a napszakok váltakozása, azok hossza, valamint az időjárás (pl.: felhőképződés) miatt az energiaellátás ingadozhat, ezért a precíz felhasználási tervezés, valamint a felesleges energia tárolható energiává történő átalakítása elengedhetetlen [3–5]. Napjainkban – országoktól függően - a szélenergia az egyik legszéleskörűbben elterjedt és leggazdaságosabb megújuló energiaforrás [5]. Ez szintén tiszta energiaforrás, azonban erre különösen jellemző a területi adottságtól való függés. Emellett az így előállított energia mennyisége nagymértékben függ a szél erősségétől és időtartamától [6]. A vízenergia is függ a területi adottságoktól, azonban kevésbé függ az időjárástól, mint a nap- és szélenergia. Ugyanakkor a vízerőművek telepítése az élővilágra, biodiverzitásra nézve káros hatással lehet [7]. A geotermikus energia a Föld belsejében zajlódó geológiai folyamatok során keletkezik, melyet leginkább fűtésre és elektromos áram előállítására használnak. Ez egész évben megfelelő ellátást biztosít, és költséghatékonyabb, mint más energiaforrások, azonban nagyon területfüggő [8].

A fentebb leírtak alapján jól látszik, hogy a megújuló energiaforrások (is) meglehetősen régió specifikusak. Minden régió egyedi klimatikus viszonyokkal és megújuló energiaforrás potenciállal rendelkezik, aminek köszönhetően területenként eltérő lehet a megújuló energiaforrások optimális felhasználásának a struktúrája. Vannak olyan régiók, amelyek számára leginkább a napenergia biztosítja az energiaellátást, pl.: Közép-Kelet és Észak-Afrika, van, ahol a szélenergia a legköltséghatékonyabb, pl.: Eurázsia, Nyugat-Európa, máshol a vízenergia, pl.: Norvégia, Laosz, vagy akár a geotermikus energia például Izlandon és Szegeden. Európán belül minden megújuló energiaforrás hozzáférhető és felhasználható [9].

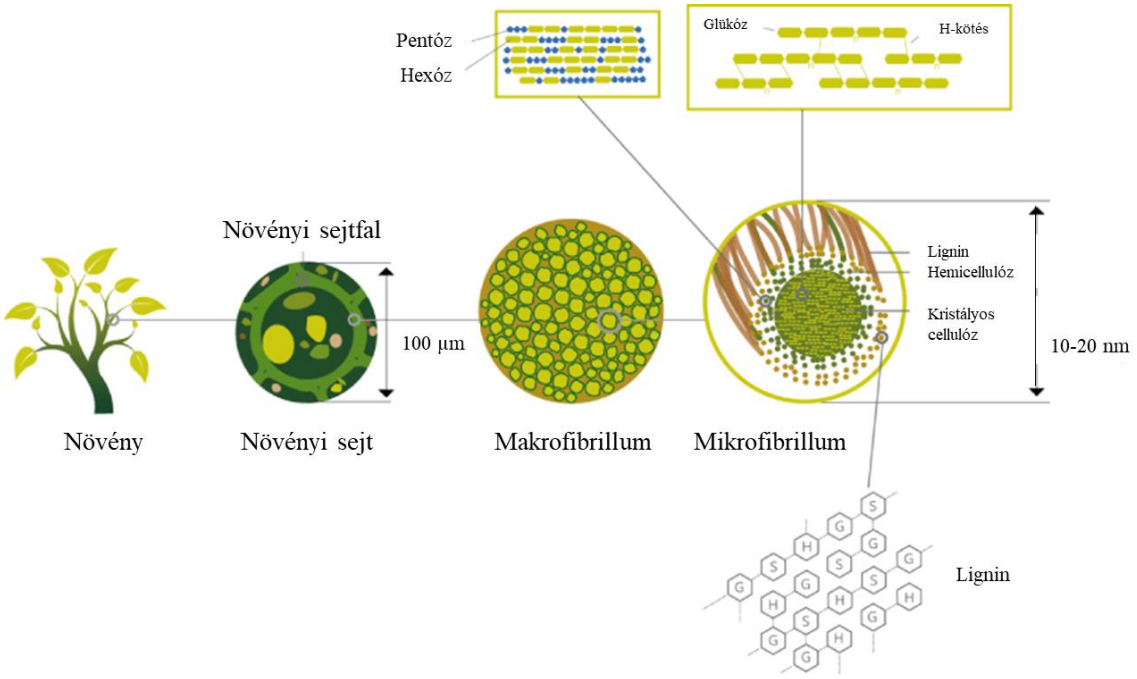
Napjainkban a biomasszából előállított energia a teljes energiaellátás mintegy 9,5 %-át, valamint az összes megújuló energiaforrásból származtatott energia 70 %-át biztosítja [10]. A

biomassza – nedvességtartalomtól függően - közvetlenül égetéssel átalakítható hővé, vagy különböző folyamatok révén akár folyékony (bioetanol, biobutanol, biodízel) vagy gáz halmazállapotú energiahordozókká (biohidrogén, biogáz), melyek számos módon felhasználhatóak, például üzemanyagként, fűtésre, elektromos áram előállítására, stb. [11]. Dolgozatom szempontjából a legfontosabb hasznosítási mód a biogáz előállítása, mely az anaerob emésztés (Anaerobic Digestion, AD) során keletkezik. Az AD során egy komplex mikrobiális közösség, anaerob körülmények között alakítja át a szerves anyagokat biogázzá. A szerves anyagok lehetnek kifejezetten erre a célra termelt energianövények (pl.: cukorcirok, cukornád, stb.), de lehetnek akár ipari termelésben, mezőgazdaságban és lakossági felhasználás során keletkező szerves hulladékok is. A keletkező biogáz mennyiségét és minőségét elsősorban a biogáz fermentorba betáplált biomassza, a fermentáció típusa és az oltóanyag fajtája határozza meg [12]. Előnye, hogy meglehetősen sokfajta biomassza alkalmas biogáz előállítására, ilyenek például a települési szennyvizek, mezőgazdasági hulladékok, állati eredetű hulladékok, ipari hulladékok, energianövények, stb. [13,14]. Mivel számos hulladék fajta jól alkalmazható az AD során, így kialakult az ún. „waste to biogas”, azaz hulladékból biogáz szemlélet (ld. később) [15,16]. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy a korábban is említett hulladékok számos esetben hatékonyan átalakíthatók az AD során üzemanyagokká. Ezek a hulladékok jelentős kockázattal bírnak mind a környezet, mind az emberiség tekintetében, ugyanis sok esetben a bennük jelen levő patogének, kemikáliák, antibiotikumok és szerves anyagok szennyezhetik a felszíni, felszín alatti vizeinket, valamint a talajt is. Mindemellett a szerves hulladékok lebomlása során jelentős mennyiségű CO_2 (aerob), illetve metán (anaerob) keletkezik és kerül ki a természetbe, melyek jelentősen hozzájárulnak a globális felmelegedéshez, tekintve, hogy mindkettő üvegházhatást okozó gáz. Annak érdekében, hogy az üvegházhatású gázkibocsátásunkat és a környezetszennyezés kockázatát is csökkentsük, szükség van a szerves hulladékok kezelésére, hasznosítására, kontrollált körülmények között. A hasznosítás révén hulladékból megújuló energiahordozó állítható elő. Doktori értekezésemben jómagam is növényi és állati eredetű hulladékok hasznosíthatóságát vizsgáltam biogáz előállítása céljából.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A növényi biomassza (lignocellulóz) és a benne rejlő lehetőségek, kihívások

A növényi biomassza egy nagy mennyiségben előforduló nyersanyag, melyből különböző módszerekkel, megújuló üzemanyagok állíthatók elő és így a fosszilis tüzelőanyagok használata csökkenthető [17]. Elsődlegesen két szénhidrát polimerből (cellulóz és hemicellulóz) és egy aromás heteropolimerből (lignin) épül fel, melyek egy komplex struktúrát alkotva megnehezítik ezen biomassza átalakítását [18].



2. ábra

A növényi biomassza felépítése [19]

Fő komponense a cellulóz, ami egy homopolimer molekula, melyben a D-glükóz egységek ß-1,4-es glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Több száz, vagy akár több ezer cukormolekula összekapcsolódása révén alakul ki a cellulózra jellemző lineáris szerkezet, melyet kristályos és amorf régiók alkotnak [20]. A cellulózzal ellentétben a hemicellulóz egy elágazó poliszacharid, valamint polimerizáltsági foka is alacsonyabb. Különböző monoszacharid egységek alkotják, melyek eltérő poliszacharidokat hozhatnak létre, mint pl.: xilán, xiloglükán, mannán, glükomannán, stb. Legnagyobb mennyiségben előforduló fajtája a xilán, mely ötszénatomos xilopiranóz egységek ß-1,4-es összekapcsolódásával jön létre.

Ehhez a fő vázhoz azonban különböző keresztkötő ágensek, mint például ferulinsav és egyéb monoszacharid molekulák, oligoszacharid láncok kapcsolódhatnak [18,21]. Mivel a mikrobák döntő többsége számára a glükóz, illetve hatszénatomos vegyületek élveznek prioritást, így figyelni kell arra, hogy ötszénatomos cukrokat hasznosítani képes mikrobák is jelen legyenek a rendszerben.

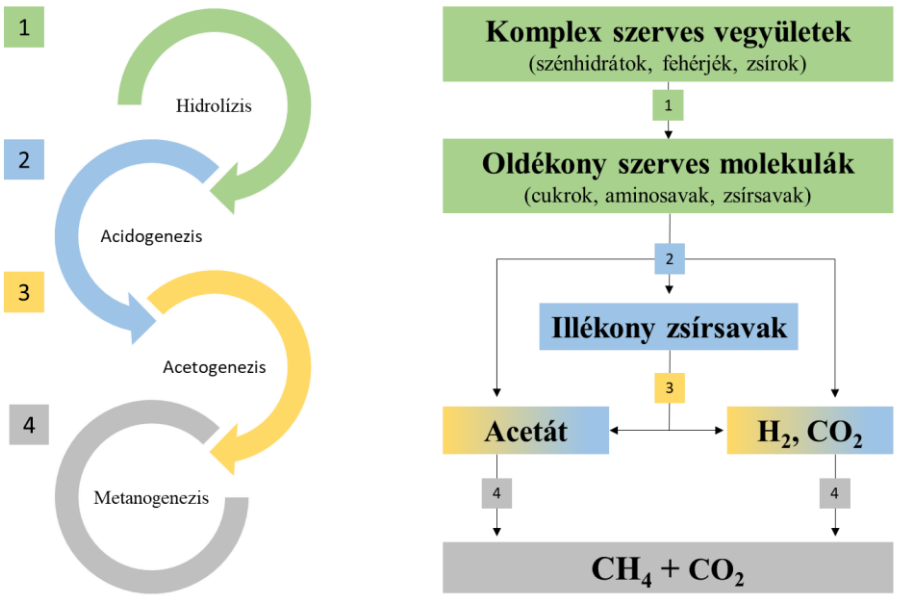
A növényi sejtfalban a cellulóz és hemicellulóz molekulákat körülfonja a lignin térhálós szerkezete, mely ezáltal megnehezíti a mikroorganizmusok, illetve azok enzimeinek cellulózhoz, hemicellulózhoz való hozzáférhetőségét, így a lignocellulóz lebontását [22]. A lignocellulóz enzimatikus lebontását több paraméter is befolyásolhatja, mint például a lignin és hemicellulóz tartalom, a cellulóz kristályossága, az egyes komponensek polimerizációs foka, vagy a hozzáférhető felület nagysága [23]. Alkalmazása anaerob emésztésre, így biogáz előállítására egy ígéretes lehetőségnek mutatkozik, azonban számos kihívással kell még szembenéznünk [17]. Ilyen nehézség lehet például a lignocellulóz szerkezetében rejlő problémák leküzdése.

Fontos megjegyezni, hogy a főbb komponensek mellett a növények számos biológiailag aktív molekulát tartalmazhatnak (pl.: glikozidok, fenol származékok, tanninok, terpének, alkaloidok, proteinek, peptidek, stb.), melyek révén biológiai átalakításuk pl.: biogázzá akár gátlódhat is. Ezek a molekulák másodlagos metabolitok és fontos szerepet töltenek be a növények biotikus és abiotikus stresszel szembeni védekezésében [24,25].

2.2. Anaerob emésztés (AD), biogáz

A biogáz képződését már századokkal ezelőtt megfigyelte az emberiség a mocsarakban, villódzó, fellobbanó fényjelenségek formájában, azonban ezek a megfigyelések a XVII. századig magyarázat nélkül maradtak. Akkor fedezték fel, hogy a mocsarakban éghető gáz, ún. mocsárgáz keletkezik. Ezt követően 1804-ben Dalton fényt derített arra, hogy a mocsárgáz éghető komponense a metán, majd Pasteur kimutatta, hogy azt mikroorganizmusok állítják elő. Ezen megfigyeléseknek és tényeknek köszönhetően olyan technológia került kidolgozásra, melyben mesterséges és kontrollált körülmények között, a természetben is lezajlódó folyamatokat alapul véve, különböző biomassza fajták felhasználásával biogáz állítható elő. Az első biogáz telepet 1856-ban Indiában hozták létre, azonban a biogáz üzemek elterjedése és rohamos fejlődése csak a XIX. század második felétől indult meg [26,27].

Az AD tehát egy természetes folyamat, mely a környezetünkben számos helyen lejátszódik, mint például a mocsarakban, vizes élőhelyeken, hulladéklerakókban, vagy a kérődző állatok tápcsatornájában is. Egy igen összetett biológiai folyamat, melyben egymással szintrófikus kapcsolatban lévő anaerob és fakultatív anaerob mikroorganizmus csoportok képesek a szerves vegyületeket lebontani oxigénmentes környezetben és a felszabadult elektronokból dominánsan metánt tartalmazó biogázt termelni [28,29]. Az AD során biogáz mellett egyéb fermentációs termékek is képződnek [13]. A biogáz 50-75%-ban metánt, 25-50%-ban szén-dioxidot tartalmaz, valamint kisebb mennyiségben egyéb gázokat, mint pl.: ammónia, kénhidrogén, nitrogén, szén-monoxid, vízgőz [30]. A szerves anyagok lebontása négy lépésben valósul meg, melyek a következők: hidrolízis, acidogenezis, acetogenezis és metanogenezis. Az egyes lépéseket más és más mikroorganizmus csoport végzi (bár átfedések vannak). Ezek növekedésükhöz különböző körülményeket igényelnek, pH, szubsztrát koncentráció és egyéb tápanyagok tekintetében [31]. Az egyes lépések között elengedhetetlen az összehangolt reakciósebesség fenntartása a stabil emésztés érdekében [32]. A négy lépés közötti kapcsolatot, valamint az egyes lépésekben lezajló események a 3. ábrán láthatóak.



3. ábra

Az anaerob fermentáció lépései [33]

2.2.1. Hidrolízis

Ezen lépés során a komplex biopolimerek, poliszacharidok, fehérjék és zsírok bomlanak le oldékony monomerekre és dimerekre, egyszerű cukrokra, aminosavakra és hosszú szénláncú zsírsavakra (3. ábra, 1. lépés). A folyamatban résztvevő mikroorganizmusok számos helyen megtalálhatóak a környezetben, például a talajban, szennyvizekben, állatok bendőjében vagy akár a komposztban is [34]. Ezek a mikrobák sejtasszociált vagy extracelluláris hidroláz enzimek segítségével katalizálják a fentebb leírt reakciókat. A lebontásban résztvevő enzimek főként cellulázok, xilanázok, amilázok, pektinázok, proteázok és lipázok [29].

A biogáz előállítása során a legtöbb esetben olyan növényi eredetű kiindulási anyagokat alkalmaznak, melyek főként cellulózból és hemicellulózból épülnek fel. A munkám során felhasznált hulladékok közvetve (bendőtartalom), illetve közvetlenül is (paradicsom növényi maradvány), növényi anyagokat tartalmaznak, ezért ebben a fejezetben szeretnék kitérni azokra a legfontosabb enzimekre, melyek ezen szubsztrátok hidrolízisében fontos szerepet játszanak.

Azokat az enzimeket, amelyek a fent említett poliszacharidok (cellulóz, hemicellulóz, keményítő, glikogén) glikozidos kötéseit képesek elhasítani, összefoglaló néven glikozil hidrolázoknak (GH) nevezzük. Az enzimek csoportosítására egy osztályozási rendszert vezettek be, melyben aktivitásuk alapján kategorizálták azokat és minden egyes csoport és enzim egyedi azonosítót kapott, melyet EC-számnak nevezünk (Enzyme Commission Number). Mindennek megfelelően a GH-ok az EC 3.2.1-es számozást kapták. Mind a cellulázok, mind a hemicellulázok ebbe a csoportba tartoznak.

Cellulázok:

A növényi sejtfalban a legnagyobb mennyiségben a cellulóz fordul elő [20] és lebontásáért az ún. celluláz enzimek felelősek, melyek enzimaktivitásuk alapján három nagy csoportra bonthatók:

1. Endoglükanázok: 1,4-ß-D-glükán-4-glükanohidrolázok (EC 3.2.1.4.). Ezek az enzimek a poliszacharid lánc belsejében, azon belül is az amorf régiókban képesek random helyeken hasítani. A hasítás eredményeképpen pedig eltérő hosszúságú oligoszacharid molekulákat, valamint új láncvégeket eredményeznek. Az endoglükanázok a cellulóz molekula kristályos régióiban nem képesek hasítani, azonban a felszabaduló oligoszacharidok már hozzáférhetők más enzimek számára, így a hidrolízis tovább folyik [22].

2. Exoglükanázok, ideértve a

- 1,4-ß-D-glükán glükanohidrolázokat (EC 3.2.1.74.), más néven cellodextrinázokat, illetve az
- 1,4-ß-D-glükán cellobiohidrolázokat (EC 3.2.1.91.), azaz a cellobiohidrolázokat.

Ezek az enzimek a cellulóz lánc redukáló és nem redukáló cukorvégeiről hasítanak le glükóz molekulákat (glükanohidrolázok) és cellobiózt (cellobiohidrolázok) [22].

3. ß-glükozidázok vagy ***ß-glükozid glükohidrolázok*** (EC 3.2.1.21.), melyek képesek hidrolizálni a cellodextrint, valamint a cellobiózt, minek következtében glükóz szabadul fel [22].

A Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) adatbázis alapján, a GH-k további csoportokba sorolhatóak. Az endoglükanázokat az alábbi GH családokba kategorizálták: 5-9, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124, valamint 128. Az 5-7, valamint a 48-as GH családba az exoglükanázok, az 1, 3, 4, 5, 17, 30 és 116 GH családba pedig a ß-glükozidázok kerültek besorolásra a CAZy adatbázis szerint (www.cazy.org).

Xilanázok:

A növényi sejtfalban a cellulóz mellett a második legnagyobb mennyiségű rostanyag a hemicellulóz. Több, különféle hemicellulózt ismerünk, mint pl.: a xilánok, xiloglükánok, glükomannánok, stb., azonban legelterjedtebb képviselőjük a xilán, így ennek az enzimatikus bontását szeretném bemutatni részletesebben. A bontásért felelős enzimeket összefoglaló néven xilanázoknak nevezünk, melyek szintén a GH-ok családjába tartoznak. Xilanáz aktivitást az alábbi GH családokban mutattak ki: 5, 7, 8, 10, 11, 16, 26, 43, 52, 62 (www.cazy.org). A xilán lebontásához (heterogenitásából és komplexitásából adódóan) is többféle enzim együttes működésére van szükség.

Endo-ß-D-xilanázok (EC 3.2.1.8) a xilán molekula vázát véletlenszerűen hasítják, minek köszönhetően csökkentik annak polimerizációs fokát. A hasítás eredményeként pedig például xilóz, xilobióz, xilotrióz keletkezik.

ß-D-xilozidázok (EC 3.2.1.37.) a xilánt, xilooligoszacharidokat és xilobióz molekulákat hasítják és azok nem-redukáló cukorvégeiről xilóz monomereket szabadítanak fel.

α-L-arabino-furanozidázok (EC 3.2.1.55) a ß-D-xilopiranóz molekulák 2-es és 3-as szénatomjairól hasítanak le L-arabinóz egységeket.

α-D-glukuronidáz (EC 3.2.1.139) az α-1,2-es kötések hidrolízisét végzi a glükuronoxilán molekulában és a hasítás végeredményeként glükuronsav és ß-D-xilopiranóz molekulák keletkeznek.

Acetil-xilán-észteráz (EC 3.1.1.72) az acetilált xilán molekula xilóz egységeinek 2-es és 3-as szénatomjairól távolítja el az O-acetil csoportokat [35–37].

A fentiek mellett számos más enzim is részt vesz a cellulóz és hemicellulóz molekulák hidrolízisében, azonban a felsoroltak a legjelentősebbek. Fontos megjegyezni, hogy ezek lehetnek szabad, egyedi enzimek vagy ún. celluloszómába vagy xilanoszómába rendezettek [22,38]. A cellulo-, illetve xilanoszóma esetén a mikroorganizmusok felszínén az enzimek egy multienzim komplex struktúrában vannak jelen, ugyanis ez a komplex struktúra kinetikailag sokkal előnyösebb, az enzimek újra felhasználhatók, valamint a végtermékek azonnal asszimilálhatók [39]. A különböző aktivitással rendelkező enzimek egy vázfehérje nyélhez kapcsolódnak, melyen keresztül a mikroba sejtekhez rögzülnek. Számos mikroorganizmus esetén kimutatták már, hogy ilyen multienzim komplex-szel rendelkezik, melyeknek lehet vagy csak celluláz vagy csak xilanáz vagy akár mindkét aktivitása is [38]. Általában az anaerob mikroorganizmusok tartalmaznak ilyeneket. Celluloszómája van például baktériumok közül a *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulolovorans* vagy a gombák közül pl.: a *Neocallimastix patriciarum* fajoknak. Xilanoszómát mutattak ki a *Butyrivibrio fibrisolvens* H17C törzs esetén, míg komplex (celluláz, xilanáz) enzimaktivitású multienzim komplex jelenlétét igazolták *C. papyrosolvens* C7 törzs esetén [38].

A biopolimerek enzimatikus hasítását követően a hidrolízis végtermékeit már az acidogenezis mikrobái képesek felvenni a sejtmembránjukon keresztül és tovább hasznosítani azokat [40]. Kémiai szempontból a hidrolízis során a makromolekulák kémiai kötései felszakadnak egy vízmolekula beépülése mellett [41]. Fontos megjegyezni, hogy néhány szubsztrát, mint például a lignocellulóz, olyan összetett szerkezeti struktúrával rendelkezik, melynek köszönhetően hidrolitikus bontása a mikroorganizmusok számára meglehetősen nehéz [40]. A polimer típusától, annak összetételétől és komplexitásától függően a lebontás sebessége eltérő lehet. Az egyszerűbb szénhidrátok emésztéséhez néhány óra elegendő, azonban az összetettebb szerves molekulák lebontása néhány napig is eltarthat [34]. Mindezen tényeknek köszönhetően a hidrolízis lépését gyakran az AD sebességmeghatározó lépésének tartják,

ugyanis a szubsztrát kémiai felépítése, kompaktsága, összetettsége és a részecske mérete jelentősen befolyásolhatják a hidrolízis gyorsaságát, ezáltal a metánképződés folyamatát is. Így ezen lépés sebességének növelése fokozza a metántermelést. A lebontás fokozására számos módszert dolgoztak már ki, mint például a fizikai-, kémiai- vagy biológiai előkezeléseket [32], melyek célja, hogy elősegítsék az enzimek/sejtek emészthető cukrokhoz való hozzáférését [42]. Az előkezelési eljárásokkal megváltoztathatók, illetve eltávolíthatók azok a szerkezeti, illetve összetételbeli akadályok, melyek gátolják a biopolimer bontás hatékonyságát [43]. Fontos megjegyezni, hogy az egyes eljárások speciális hatással vannak a lignocellulóz egyes frakcióira (cellulóz, hemicellulóz, lignin), ezért az előkezelési módszerek ideális megválasztása elengedhetetlen a hidrolízis és a fermentáció optimális lefolyásához [42]. Fizikai előkezelés lehet például az aprítás, darálás, őrlés, hőkezelés, pirolízis, besugárzás (gamma, elektronsugár, mikrohullám) [44]. Kémiai előkezelés például a forró vizes, lúgos vagy savas kezelések [44], azonban ismeretesek olyan módszerek is, ahol a fizikai-kémiai kezeléseket kombinálják, pl.: gőzrobbantás, ammónia rost robbantás, mikrohullámú-kémiai eljárások, stb. [45]. Biológiai előkezés esetében pedig baktériumokat és gombákat (fehér-, barna korhasztó, lágy rothasztó) alkalmaznak, hogy módosítsák a biomassza kémiai összetételét és/vagy a lignocellulóz szerkezetét [44]. Megjegyzendő, hogy különböző baktériumokból és gombákból kinyert enzimekkel is lehet a biopolimer bontás hatékonyságát fokozni [46]. A biológiai előkezelésnek számos előnye van: olcsóbb, biztonságosabb, kisebb az energia igénye és környezetbarát [47].

A hidrolizáló mikroorganizmusok csoportja meglehetősen diverz, azonban korábbi tanulmányok alapján elmondható, hogy főként a Bacteroidetes és Firmicutes törzs tagjai bírnak ilyen képességgel [48]. Ezen hidrolizáló mikroorganizmusok általában gyors növekedésűek és meglehetősen ellenállók a környezeti paraméterek változásaival szemben. Széles pH tartományban képesek aktívak maradni (pH 4-11), azonban pH optimumuk 6-8 közé esik [49,50].

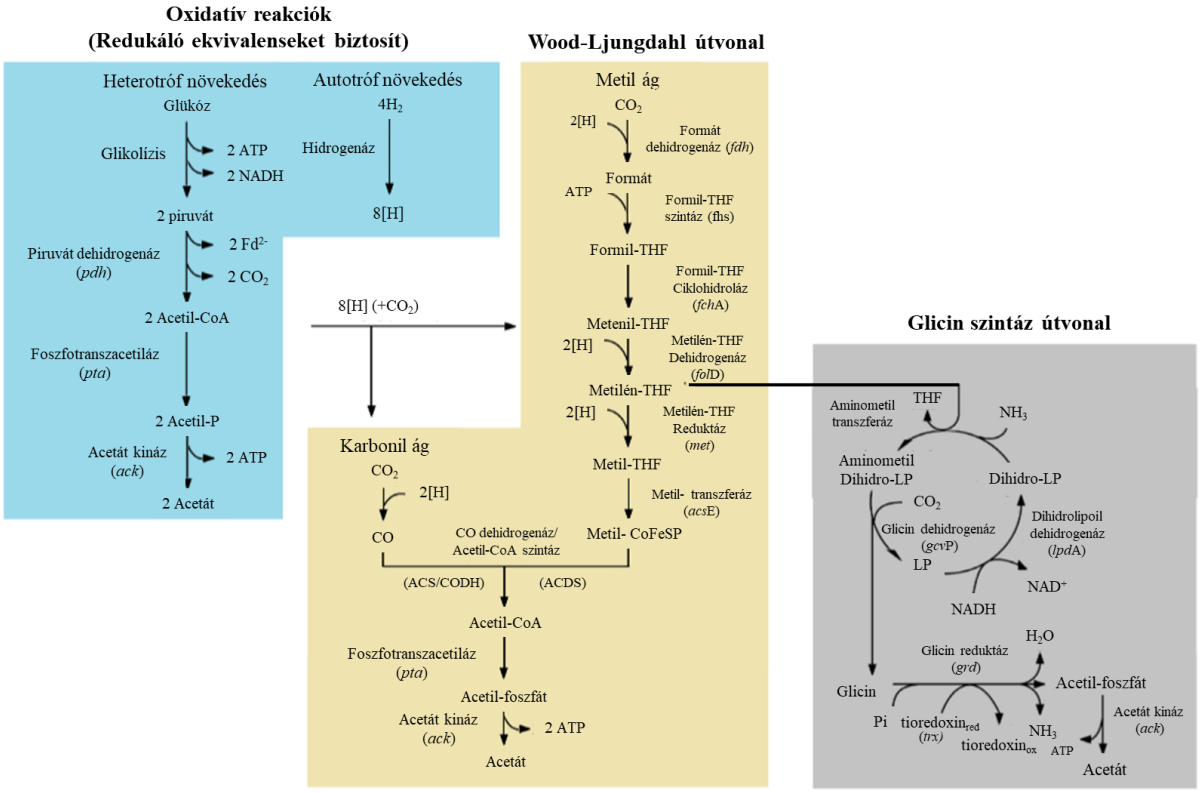
2.2.2. Acidogenezis

Az acidogenezis lépésben a hidrolízis során keletkező köztitermékeket az acidogén törzsek felveszik a sejtmembránjukon keresztül és illékony szerves savakat és egyéb termékeket állítanak elő. A nagyobb szénláncú szerves savak képződése, mint pl.: propionsav, vajsav izovajsav, valeriánsav, izovaleriánsav, valamint kapronsav képződése történik ebben a

lépésben. Emellett hidrogén, szén-dioxid, alkoholok és egyéb melléktermékek is képződnek. A lebontást fakultatív vagy obligát fermentatív mikroorganizmusok végzik [40,51]. A fenti szerves savak igen fontos intermedierek a metánképződés folyamatában. Magas koncentrációban mikrobiális stresszt okozhatnak, valamint jelentősen csökkenthetik a fermentor pH értékét, minek következtében a metánképződés leállhat [52]. A pH csökkenése előnyös lehet az acidogén és acetogén mikroorganizmusoknak [51]. Az acidogenezis mikroorganizmusai pH 4,0 - 8,0 közötti tartományban képesek növekedni, azonban optimális tartománynak a pH 5,5 és 6,5 közötti érték tekinthető. Az acidogenezis pH 4,0 alatt viszont erősen gátolt [53,54]. A hidrolízis és az acidogenezis folyamatában részt vevő mikroorganizmusok körülbelül tízszer gyorsabban növekednek, mint a metanogén mikróbák. A dolog természetéből fakadóan az acidogenezis a leggyorsabb reakció a szerves anyagok anaerob emésztése során [51]. A Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes és Proteobacteria törzseken belül számos savtermelő mikroorganizmust írtak már le [40].

2.2.3. Acetogenezis

Ebben a harmadik lépésben az acidogenezis során képződött termékeket (hosszabb szénláncú szerves savak) alakítják át az acetogén mikroorganizmusok ecetsavvá (CH_3COOH), hidrogénné és szén-dioxiddá [49]. Az acetogén mikroorganizmusok obligát anaerobok, olyannyira, hogy az oxidánsok jelenléte, mint például az oxigén vagy a nitrát, toxikusak a számukra. A pH optimumuk 6 körüli. Lassabban növekednek mint az acidogén mikrobák (osztódási idejük 1,5-4 nap) és meglehetősen érzékenyek a szerves anyag mennyiségére, valamint a környezeti paraméterek változásaira [49,51]. Napjainkig, több mint 100 acetogén mikroorganizmus fajt sikerült izolálni, melyek 20 nemzetségbe sorolhatóak [55]. Ezek közül a legjelentősebbek az *Acetobacterium, Clostridium, Spirochaetes* nemzetségek, amelyek a legkülönbözőbb környezetekben is fellelhetők, mint például állatok emésztőtraktusa, talajok, tengerek, mélytengeri üledékek, stb. Az előfordulásuk sokszínűsége jól mutatja, milyen fontos szerepet játszanak a talajok, tengerek, tavak, élőlények biológiájában. Az egyes acetát képződési útvonalakat a 4. ábra szemlélteti:



4. ábra

Az ecetsav képződés lehetséges útvonalai az acetogén mikroorganizmusokban [56]

Az anaerob acetogén mikroorganizmusok egy mol glükóz molekulából három mol acetátot állítanak elő anaerob körülmények között. A glikolízisen keresztül a folyamat 1 glükóz molekulából 2 molekula piruvátot eredményez, mely aztán tovább alakul acetáttá. A keletkező redukáló ekvivalensek és a szén-dioxid molekulák ezt követően a Wood-Ljugdhal útvonalon keresztül szintén acetáttá alakulhatnak [56]. A folyamathoz szükséges redukáló ekvivalensek azonban nem csak a cukor molekulák oxidációjából, hanem a hidrogén oxidációjából is származhatnak. Az acetogének fakultatív autotrófok, képesek növekedni szerves szubsztrátok (pl.: hexózok, pentózok, alkoholok, metil csoportok és formiát), valamint szervetlen szubsztrátok (hidrogén, szén-monoxid) oxidációja révén is [56]. Ezen két útvonal mellett létezik még egy harmadik útvonal is, melyen keresztül az acetogén mikroorganizmusok képesek acetátot előállítani, ez pedig a glicin-szintáz útvonal. A purin fermentáló mikroorganizmusok, mint például bizonyos *Clostridium*, *Eubacterium* törzsek képesek ezen útvonalon keresztül acetátot termelni [56].

Az anaerob emésztő rendszerekben az acetogének kétféle kapcsolatot alakíthatnak ki a metanogénekkel: 1. versenyeznek a hidrogenotróf metanogénekkel, melyek H_2-ből és CO_2-ből állítanak elő metánt, 2. szintrófikus kapcsolatot alakítanak ki az acetotróf metanogénekkel, akik a homoacetogén törzsek által megtermelt ecetsavat alakítják tovább metánná [57].

2.2.4. Metanogenezis

A negyedik lépést csak és kizárólag az Archaea domén olyan tagjai képesek végrehajtani, melyeket metanogéneknek nevezünk. A legismertebb metántermelő mikroorganizmusok az Euryarchaeota törzsbe tartoznak, azon belül is 7 rendbe, melyek a következők: *Methanobacteriales, Methanocellales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanopyrales, Methanosarcinales* és *Methanomassiliicoccales* [58]. A metagonének csak és kizárólag oxigénmentes környezetben képesek szaporodni, és ott is meglehetősen lassan, reprodukciós idejük mintegy 5-16 nap [34]. Rendkívül érzékenyek a környezet pH értékére, az oxigén jelenlétére, a szabad ammóniára, kén-hidrogénre, és az illékony szerves savak (VFAs) mennyiségére. Optimális pH tartományuk szűk, semleges közeli (pH 7,0-7,2), pH 6 alatt elpusztulnak. Az AD utolsó lépésében a metanogén mikrobák háromféle fő útvonalon keresztül képesek a metán előállítására az AD korábbi három lépésében képződött intermedierekből: acetotróf, metilotróf és hidrogenotróf úton [59]. A hidrogenotróf metanogenezis a legelterjedtebb útvonal és a metán képződés ősi, közös útvonalát képviseli. A hidrogenotróf metanogenezis során a mikrobák a CO_2-t redukálják CH_4-á hat lépésen keresztül, ahol az elektron akceptor H_2 vagy egyes esetekben formiát. Hidrogenotróf metanogenezisre a *Methanomassiliicoccales* rend kivételével minden más metanogén rend képes [59]. A másik fő metánképződési útvonal az acetotróf útvonal, ahol az acetotróf metanogének hasítják az ecetsavat, majd a karboxil-csoportot oxidálják CO_2-á, a metil-csoportot pedig redukálják metánná [60]. Ezek a metanogének elsősorban olyan környezetben találhatóak meg, ahol a hidrogenotróf metanogének képesek a hidrogén mennyiségét olyannyira lecsökkenteni, hogy az ecetsav képződés nagyobb legyen. Az acetotróf metanogének fordulnak elő legnagyobb mennyiségben az AD rendszerekben [61]. Két archaea nemzetség képes ezen az útvonalon keresztül metánt előállítani, a *Methanosaeta* (korábban *Methanothrix*) és a *Methanosarcina* nemzetségek [62]. A harmadik útvonal a metilotróf metanogenezis, mely a három útvonal közül a legkisebb jelentőségű. Ezen útvonalon keresztül a metanol, metilamin és dimetil-szulfid molekulák metil-csoportjából

képesek a mikrobák metánt képezni [60]. A *Methanosarcinales, Methanobacteriales* és *Methanomassiliicoccales* rend tagjai képesek ily módon metánt képezni.

Jelen tudásunk szerint, egyedül a *Methanosarcinales* rend, *Methanosarcina* nemzetség tagjai képesek mindhárom útvonalon metán képzésére [58]. Az egyes metánképződési útvonalak reakció egyenleteit az 5. ábra szemlélteti.

$$CH_3COOH + CO_2 \leftrightarrow CH_4 + 2CO_2 \rightarrow \text{Acetotróf metanogenezis}$$

$$CH_3OH + H_2 \leftrightarrow CH_4 + H_2O \rightarrow \text{Metilotróf metanogenezis}$$

$$CO_2 + 4H_2 \leftrightarrow CH_4 + 2H_2O \rightarrow \text{Hidrogenotróf metanogenezis}$$

5. ábra

A metánképződés három fő útvonalának reakció egyenletei [63]

A fentebb leírtak alapján jól látszik, hogy az anaerob emésztés egy igen összetett folyamat, melyben igen sok mikroorganizmus vehet részt. A különböző fázisokban közreműködő mikroorganizmusoknak eltérő környezeti igényeik vannak, mind pH, mind hőmérséklet, mind szubsztrát tekintetében, emellett reprodukciós idejük, valamint érzékenységük a különböző környezeti paraméterekre szintén eltérő. Egy optimálisan működő anaerob emésztő rendszerben az egyes lépések teljes összhangban vannak, melyben az egyes mikroorganizmusok egymással szintrófikus kapcsolatban állnak, minek köszönhetően az anaerob emésztés végbemegy. Abban az esetben, ha az egyes lépések közötti egyensúly felborul, például a szerves anyag túladagolás következtében a szerves savak felhalmozódnak és a pH drasztikusan lecsökken, vagy például fehérje gazdag szubsztrát adagolásának köszönhetően az ammónia feldúsul a fermentorban, az az emésztés leállásához vezethet. Mindezek alapján jól látszódik, hogy a fermentációt számos paraméter és tényező befolyásolhatja.

2.3. Az AD-t befolyásoló legfontosabb tényezők

A metánképződést számos paraméter befolyásolhatja, mint például a hőmérséklet, a szubsztrát fajtája, a pH, a retenciós idő, C/N arány, stb. A maximális metántermelés akkor érhető el, ha az egyes paraméterek az optimális tartományba esnek [63].

2.3.1. Hőmérséklet

A környezeti paraméterek közül a hőmérséklet az egyik legfontosabb, ugyanis ennek változása jelentős befolyással lehet az egyes mikroba csoportok aktivitására. A metánképződés meglehetősen széles hőmérséklet-tartományban megvalósulhat, pl.: a sarkköri igen alacsony hőmérséklettől egészen 100°C-ig [62,63]. A metánképződést három hőmérséklet-tartományba sorolja a szakirodalom:

1, pszikrofil (kriofil), 10-20°C között

2, mezofil, 20-45°C között, általában 35°C

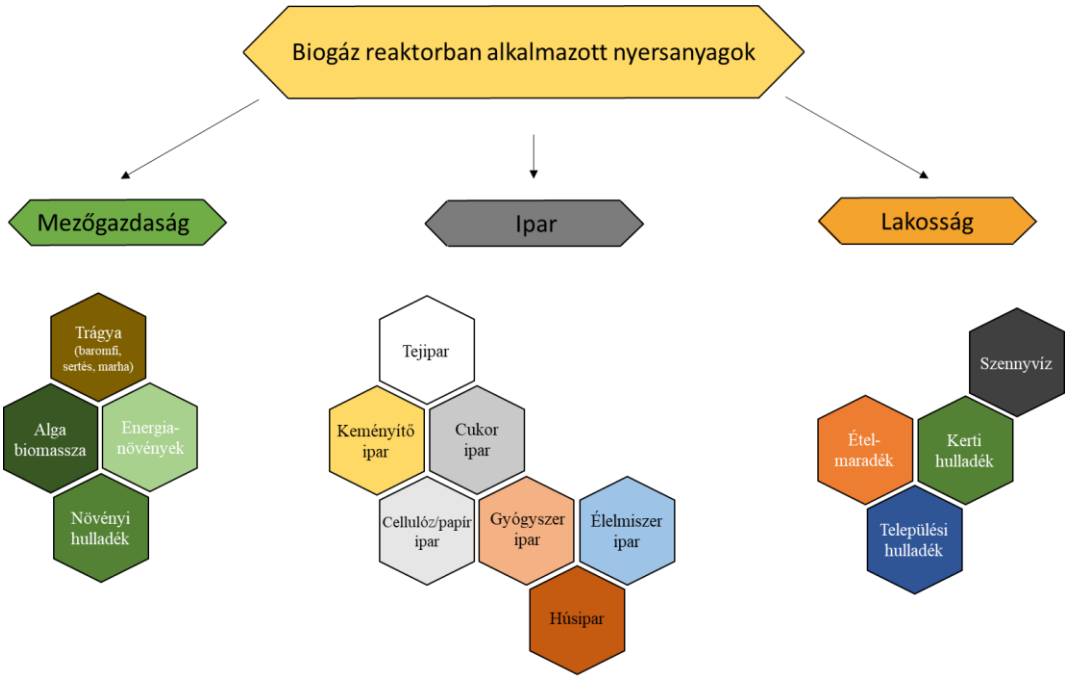
3, termofil, 45-65°C között, általában 55°C

A legelterjedtebb AD rendszerek elsősorban mezofil és termofil hőmérsékleten működnek [63]. A mezofil rendszerek gyakorlatilag szobahőmérsékleten üzemelnek, ahol lassabb és kevesebb a biogáz hozam, azonban a fűtésük kevésbé költséges, mint egy termofil reaktoré. A termofil reaktorok hőmérsékletének fenntartása bár költségesebb, azonban a mezofil rendszerekhez képest az AD gyorsabb és a biogáz hozam is nagyobb, emellett magasabb hőmérsékleten az egyes patogének hatékonyabban inaktiválódnak, mely a fermentációs maradék egyszerűbb felhasználhatóságát segíti [40]. Fontos megjegyezni, hogy az egyes mikroba csoportok igen érzékenyek a hőmérséklet változásaira, minek következtében a biogáz képződés lecsökkenhet. Míg a mezofil folyamatokban a mikrobák akár 3°C fokos ingadozást is könnyedén tolerálnak szignifikáns biogáz termelés csökkenés nélkül, addig a termofil rendszerek erre sokkal érzékenyebbek. Ennek köszönhetően a hőmérséklet változáshoz történő adaptáció termofil rendszerekben sokkal lassabb [64].

2.3.2. Biogáz reaktorokban alkalmazott nyersanyagok jellemzői (C/N arány, tápanyagok, nyomelemek, szárazanyag-, szerves szárazanyag tartalom)

Az AD rendszerekben szinte mindenféle biomassza használható biogáz előállítására, amennyiben tartalmaz szénhidrátokat (pl.: cellulóz, hemicellulóz, stb), fehérjéket vagy

zsírokat. A fermentációban alkalmazott nyersanyagok típusa és azok összetétele jelentősen befolyásolják a biogáz mennyiségét és annak összetételét [64]. Magasabb szénhidrát- és fehérjetartalmú nyersanyag esetén a lebontás sebessége gyorsabb, azonban a metánhozam alacsonyabb, míg magasabb lipidtartalmú nyersanyag esetében a gázkihozatal nő, de hosszabb rentenciós időre lehet szükség [65]. A nyersanyagokkal szemben támasztott követelmények a következők: 1. biológiailag lebontható legyen, 2. ne legyen túlzottan elfásodott (alacsony lignin tartalommal bírjon), 3. megfelelő mennyiségű makro- és mikro tápanyagot tartalmazzon, valamint ne legyen túl magas a nitrogén tartalma. Ennek megfelelően a Földön számos nyersanyag alkalmazható különböző AD rendszerekben biogáz előállítására, mint például az állati trágya, ételmaradékok, az ipari-, mezőgazdasági termelés hulladékai, vágóhídi hulladékok, stb., melyeket csoportosítva a 6. ábra szemléltet [63].



6. ábra

A különböző forrásokból származó nyersanyagok kategorizálása Kothari és mtsai. nyomán [63]

A nyersanyagokkal kapcsolatos egyik legfontosabb paraméter azok szén- és nitrogéntartalma, valamint azok aránya. Az AD igen érzékeny ezekre a paraméterekre, ugyanis a megfelelő C/N

arány biztosításával az AD-t pozitívan lehet befolyásolni. A túlzottan magas C/N arány nem biztosít elegendő mennyiségű nitrogént a mikroorganizmusok megfelelő anyagcsere folyamataihoz, minek köszönhetően alacsonyabb biogáz képződés várható. A túlzottan alacsony C/N arány sem jó, ugyanis ebben az esetben többlet ammónia képződik, ammónia gátlás léphet fel, minek kösvetkeztében a metanogén archaeák elpusztulnak, így a gáztermelés csökken. Mindezeket figyelembe véve, olyan nyersanyagok használata javasolt, melyeknek C/N aránya 20-30 közötti értéket mutat [53]. Ennek megfelelően az ideális nyersanyag megválasztása elengedhetetlen a fermentáció szempontjából. Néhány esetben a szubsztrátok megfelő C/N aránnyal rendelkeznek és önmagukban is alkalmasak nyersanyagként. Ebben az esetben ún. monofermentációról beszélünk. Amennyiben azonban a nyersanyag C/N aránya alacsony, esetleg magas, úgy azt megfelelő arányban keverni kell egy magasabb vagy alacsonyabb C/N arányú szubsztráttal, így elérhető az optimális C/N arány. Ezt kofermentációnak hívjuk [14].

A mikroorganizmusok optimális növekedéséhez és anyagcserefolyamataihoz elengedhetetlen a megfelelő mennyiségű nyomelem biztosítása is. A legtöbb esetben a szükséges nyomelemek rendelkezésre állnak az egyes nyersanyagokban, azonban néha előfordul, hogy azok adottságai miatt ezek pótlása szükségessé válik. A legfontosabb tápanyagként a szént, nitrogént és foszfort tartják számon, azonban a mikroorganizmusoknak számos egyéb nyomelemre is szükségük van, mint például a cink, kálium, kálcium, kobalt, magnézium, mangán, nikkel, réz és a vas. Amennyiben ezek az elemek megfelelő mennyiségben rendelkezésre állnak, úgy a fermentáció teljesítménye, így a metánhozam közelít az optimálishoz [66,67].

2.3.3. pH

Az anaerob emésztés folyamatának pH értéke szintén fontos szerepet játszik a fermentáció szempontjából, ugyanis jelentős hatással van a mikrobák növekedésére és a hidrolízis kinetikájára. A fermentáció optimális pH értéke változhat mind az alkalmazott nyersanyag, mind az alkalmazott fermentációs technológia függvényében [68]. Az AD folyamatában résztvevő mikroorganizmus csoportok is eltérő pH optimummal rendelkeznek. A fermentatív mikroorganizmusok széles pH tartományon belül (pH 4.0-8,5) képesek aktívak maradni és kevésbé érzékenyek a pH változására, azonban a metanogének optimális tartománya jóval szűkebb (pH 6,5-7.2) és a sav-bázis egyensúlyban bekövetkező változásokra is jóval

érzékenyebbek. A fermentatív mikroorganizmusok aktivitása révén keletkező illékony szerves savak folyamatosan csökkentik a reakcióközeg pH értékét. Azonban a fehérjebontás következtében felszabaduló ammónia bázikus karaktere, valamint a metanogének aktivitása révén az illékony szerves savak mennyiségének csökkenése, együttesen képesek a pH-t egyensúlyban tartani. A Stickland-reakció során az aminosavak zsírsavakká alakulnak, valamint a deamináció következtében ammónia képződik [40]. Amennyiben az ammónia felhalmozódik, az a metánképződés leállásához vezethet, ugyanis az ammónia toxikus a metanogénekre. Emellett az AD optimális pH értékének szabályozásában a folyadékfázisban lévő hidrogén-karbonát és a gázfázisban levő szén-dioxid is fontos szerepet játszik [69]. Az egyes tanulmányok eltérő pH tartományt határoznak meg optimális tartománynak az AD tekintetében, azonban abban egyetértenek, hogy a legoptimálisabb a teljes folyamat szempontjából a közel semleges pH.

2.3.4. Retenciós idő

A retenciós idő megmutatja, hogy a bejuttatott szerves anyag mennyi időt tölt a reaktorban. RT= fermentációs folyadék térfogata/napi betáplált nyersanyag térfogata. Függ a hőmérséklettől, a szerves terhelési sebességtől és a szerves anyag összetételétől. Mezofil körülmények között 10-40 nap, termofil körülmények között azonban kevesebb [63].

2.3.5. Szerves terhelési sebesség

A szerves terhelési sebesség azt a nyersanyag mennyiséget jelenti, melyet folyamatos betáplálás mellett napról napra a fermentorba juttatunk [53]. A reaktorok nyersanyaggal való terhelése jelentős hatással van a mikroorganizmusok szaporodására és aktivitására. Ha nagyobb mennyiségű alapanyagot juttatunk a fermentorba, mint amit a mikrobák képesek lebontani, annak következtében illékony szerves savak halmozódnak fel, ami a közeg pH értékének savas irányba történő eltolódását eredményezi. A túlzottan alacsony pH pedig gátolja a metanogén archaeákat, így a metántermelés csökken. Ezért a nyersanyagokat egyenletes ütemben ajánlott beadagolni a fermentorokba. Amennyiben a betáplálási sebességen változtatni szeretnénk, úgy azt lassan és fokozatosan kell végrehajtani, hogy a mikroba közösség adaptálódhasson az új feltételekhez [40].

2.3.6. Fermentációs technológiák

A fermentációs eljárásokat többféle szempont szerint is csoportosíthatjuk. Korábbi fejezetekben már esett róla szó, hogy hőmérséklet alapján megkülönböztetünk pszikrofil, mezofil és termofil fermentációt. A fermentáció teljes szárazanyag (TS) tartalma alapján beszélhetünk alacsony (TS≤15%) közepes (TS=15-20%) és magas (TS≥20%) szárazanyag tartalmú fermentációkról, melyeket másnéven folyadék-, fél-szilárd és szilárd fázisú fermentációknak nevezünk a fentebbi sorrendnek megfelelően [63]. Emellett a nyersanyag beadagolásának alapján további fermentációkat különböztethetünk meg, melyeket a következő fejezetekben ismertetek.

2.3.6.1. Szakaszos fermentáció

Szakaszos fermentáció esetén első lépésként minden egyes komponenst a reaktorba helyeznek és csak az emésztés befejeztével nyerik ki belőle a fermentációs maradékot [70]. Az oltóanyagban megtalálható mikroorganizmusok a betáplált nyersanyagon elszaporodnak és metánt, illetve különféle melléktermékeket képeznek, mint pl.: CO_2, VFAs, H_2, stb., mely metabolitoknak köszönhetően a környezetük folyamatosan változik. Az eljárás egyszerűsége egyben előnye és hátránya is, ugyanis tápanyagutánpótlás nincs és az esetlegesen felhalmozódó toxikus melléktermékek révén a fermentáció gátlása következhet be. Mivel a fermentáció kezdetét követően a környezet és a reaktor között nincs anyagáramlás, ezért kisebb a kontamináció esélye is. Gyakorta alkalmazzák ezt a fermentáció típust új nyersanyagok tesztelésére, valamint optimalizációs kísérletekre [71]. Biogáz fermentációs kísérletekben például az új szubsztrátok biometán potenciáljának (BMP) meghatározására használják. Számos nemzetközi szabványrendszer létezik arra vonatkozóan, hogy a BMP meghatározása hogyan történjen szakaszos fermentációval, ilyenek pl.: VDI 4630, DIN 38414, ISO 11734, stb. [72].

2.3.6.2. Fél-folyamatos fermentáció

A fél-folyamatos eljárást másnéven rátáplálásos fermentációnak is nevezik. A szakaszos fermentáció egy módosított változata, az eltérés az, hogy meghatározott időközönként újabb adag nyersanyagot juttatnak a rendszerbe, azonban csak a fermentáció végén nyerik ki a végterméket, minek köszönhetően a fermentációs térfogat folyamatosan növekszik. Előnye,

hogy a fokozatos beadagolás következtében a szubsztrát gátlás mértéke becsülhető, ugyanis a mikrobák számára szükséges tápanyagok bevitele nem egyszerre történik. Elsősorban olyan esetekben alkalmazzák, amikor magas biomassza hozam, vagy magas termék hozam elérése a cél [73,74].

2.3.6.3. Folyamatos fermentáció

A folyamatos fermentációs eljárás egy nyitott rendszer, melyben a nyersanyag beadagolása folyamatos, valamint a betáplálással egyidejűleg a beadagolt térfogattal azonos mennyiségű fermentlevet távolítanak el a reaktorból, így a fermentációs térfogat nem változik. Ennek köszönhetően, optimális esetben a fermentáció állandó paraméterek mellett zajlódik és egy stacioner állapot érhető el. Ebben az állapotban a mikroorganizmusok növekedése, valamint a metabolitok képződése egy idő után stabilizálódik. Előnye, hogy hosszú távon alkalmazható, viszonylag nagy biogáz hozam érhető el az alkalmazásával, illetve a fermentáció egyes paraméterei szabályozhatóak. Hátránya, hogy a folyamatos beadagolás következtében a fertőzés veszélye magasabb [70,75,76].

2.3.6.4. Egylépcsős és többlépcsős fermentáció

A fermentációs rendszerek aszerint is csoportosíthatók, hogy hány lépésből állnak. Ez alapján megkülönböztetünk egylépcsős és többlépcsős fermentációt. Az egylépcsős fermentáció esetén minden AD lépés (hidrolízis, acidogenezis, acetogenezis, metanogenezis) egy reaktortérben zajlódik le. Ezzel ellentétben a többlépcsős fermentáció esetén a folyamatba több reaktort is bevonnak és az AD egyes lépései egymástól szeparáltan zajlanak le. Gyakorta a hidrolízist, acidogenezist és acetogenezist választják el a metanogenezis lépésétől [63].

2.4. Cirkuláris gazdaság

Az egyre növekvő népesség és a felhasználási szokásaink következtében a jelenlegi lineáris gazdasági modellünk (kinyerés, felhasználás, eldobás) már nem tartható fenn hosszú távon [77]. Ezzel ellentétben, a körforgásos gazdaság fenntartható fejlődést tesz lehetővé, miközben a gazdasági növekedést az erőforrás-kimerülés és a környezetszennyezés negatív következményeinek elkerüléséhez köti. Célja, hogy az erőforrások hatékony felhasználását

tegye lehetővé, a keletkező hulladékokat minimalizálja, hosszútávú értékmegtartást hozzon létre, csökkentse az elsődleges erőforrások felhasználását, mindezáltal környezetvédelemi és társadalmi-gazdasági előnyöket is eredményezzen [78]. Az Európai Unió, Európai Bizottsága felismerve a lineris gazdaságban rejlő veszélyeket, 2015-ben elfogadta az első Körkörös Gazdaság Cselekvési Tervet, mely a létrehozott termékek teljes életciklusára kiterjedő irányzatokat határoz meg, azzal a céllal, hogy a felhasznált erőforrásokat a lehető leghosszabb ideig megőrizzék az Európai Unióban. 2020-ban egy újabb cselekvési tervet fogadtak el, mely kiemelten foglalkozik az Európai Unióban keletkező hulladékok újrafelhasználására való ösztönzéssel, irányelvekkel [79]. Mindezen nyomvonal mentén az ipari-, mezőgazdasági termelés következtében nagy mennyiségben keletkező szerves hulladékok újrahasznosítása például megújuló energiahordozókká, tökéletesen illeszkedik a körkörös gazdasági modellbe. Ilyen folyamat révén csökkenthető a keletkező hulladék mennyisége, ill. az üvegházhatású gázkibocsátás, ugyanis a hulladékból előállított bioüzemanyagokkal a fosszilis tüzelőanyagok kiválthatóak.

2.4.1. Hulladékból biogáz

A korábbi fejezetekben már említést tettem arról, hogy az anaerob emésztésre, biogáz előállítására, számtalan szubsztrát alkalmazható pl.: különböző ipari-, mezőgazdasági-, lakossági hulladékok, energianövények, stb. (ld. 6. ábra). A szubsztrát tekintetében fontos gazdasági tényező az, hogy a nyersanyag keletkezési/előállítási helye milyen messzire helyezkedik el a biogáz üzemtől. Ha ez a távolság 30-50 km-nél nagyobb, akkor az gazdaságilag nem előnyös, ugyanis a nyersanyag beszállítási költségei magasak lesznek. Tekintve, hogy Magyarország, azon belül is az Alföldi-, Dél-alföldi régió mezőgazdasági szempontból kiemelt jelentőséggel bír (állat-, és növénytermesztési szempontból is), a mezőgazdaságban és a hozzá kapcsolódó feldolgozóiparban keletkező hulladékok felhasználása kiemelt jelentőségű lehet. Ennek megfelelően doktori értekezésemben állati és növényi eredetű hulladékok biogáz előállításra történő hasznosíthatóságát tűztem ki célul.

2.4.1.1. Mezőgazdasági hulladékok

A mezőgazdasági termelés következtében igen nagy mennyiségben keletkeznek olyan hulladék típusok, melyeknek a nem megfelelő kezelése révén súlyos környezeti problémák jelentkeznek. Csak az EU-ban mintegy 90 millió tonna hulladék keletkezik a mezőgazdasági termeléshez kapcsolódóan. Ezek a hulladékok többnyire jól felhasználhatók biogáz

előállítására, és így nemcsak jelentős pozitív gazdasági hatással bírnak, hanem javítják is az adott ország hulladékkezelését. Az alkalmazott nyersanyagok lehetnek állati trágyák, mezőgazdasági melléktermékek, növényi hulladékok (szár, szalma, stb.), stb. A növényi maradványok túlnyomó többsége lignocellulóz, mely cellulózból, hemicellulózból és ligninből áll [15]. A magasabb lignin, illetve hemicellulóz tartalom ellenállóbbá teszi a lignocellulózt a hidrolízissel szemben, ezáltal csökkenti a belőle keletkező biometán képződésének sebességét, egyes esetekben mennyiségét is [21]. Számos tanulmány vizsgálta már az olyan mezőgazdasági melléktermékek biogáz képzésre való alkalmasságát, mint pl.: káposzta, paprika, tök, paradicsom növényi maradványok, stb. [14,80–82].

2.4.1.1.1. Paradicsom növényi maradvány

Doktori értekezésemben a mezőgazdasági hulladékok csoportján belül a paradicsom növény szár és levélmaradványának biogáz fermentációra gyakorolt hatását vizsgáltam. A paradicsom (*Solanum lycopersicum*) az egyik legszélesebb körben termesztett zöldségféle a világon [81]. A termesztése és ipari feldolgozása során jelentős mennyiségű hulladék keletkezik, mely elsősorban a termés héját, magját, valamint a növény szárát és levelét jelenti. 2017-ben, a paradicsom termesztés és feldolgozás következtében mintegy 474,000 tonna mezőgazdasági hulladék keletkezett [83]. A világon Kína és India, az Európai Unión belül pedig Olaszország és Spanyolország számítanak a legnagyobb paradicsom termelőknek. Magyarországon 2012-ben, mintegy 1390 hektáron történt szabadföldi, mintegy 410 hektáron pedig fedett területű paradicsom termesztés [84]. Szeged közvetlen vonzáskörzetében is több jelentős üvegházas paradicsomtermesztő vállalkozás működik, mint például a ProfiTom Kft (6 ha), Nemeskert Kft. (9ha), Árpád-Agrár Mezőgazdasági Zrt. (12,5 ha), Floratom Kft. (n.a.), Hódkertész Kft. (11 ha), stb. A paradicsom feldolgozása során keletkező melléktermékek (magok, héj, sérült termés) alkalmazhatóságát biogáz előállítására sokan, azonban a termesztést és szüretelést követően visszamaradó, valamint a növény gondozása/ápolása során keletkező szár és levél ilyen irányú hasznosíthatóságát csak kevesen vizsgálták [81,82,85–87]. A gondozás során a növény tetején a hajtások visszavágását 7-10 naponta kell elvégezni, valamint a teljes állomány cseréjét pedig évente. Ennek következtében jól látszódik, hogy ez a nyersanyag önmagában nem képes egy nagyobb biogáz üzem ellátására, ezért célszerű kofermentációs szubsztrátként beadagolni. A visszamaradó szár és levél, akárcsak más növényi maradványok túlnyomó részben (ligno)cellulózból állnak. Fontos megjegyezni, hogy a növényi maradványok - a paradicsom esetén is - számos biológiailag aktív vegyületet tartalmazhatnak,

mint például fenolok, flavonoidok, glikoalkaloidok (pl.: tomatin, tomatidin), melyek antibakteriális, antivirális és antifungális hatással rendelkezhetnek és a növény mikroorganizmusokkal szembeni védekező mechanizmusában játszanak fontos szerepet. Biogáz előállítása esetén ezek kulcsfontosságúak lehetnek, hiszen a növényi anyagok biogázzá történő átalakításában számos mikroba csoport vesz részt [88–90]. A paradicsom szár és levél biogáz fermentorban történő alkalmazását már tanulmányozták [82], azonban a publikált vizsgálatban csak a vizsgált nyersanyag BMP értékét határozták meg szakaszos fermentációban és nem vizsgálták a nyersanyag hatását a folyamatos fermentációra, melyet jelentősen befolyásolhatnak többek között a fentebb említett biológiailag aktív vegyületek.

2.4.1.2. Ipari hulladék

A különböző nyersanyagok feldolgozása során a különböző ipari tevékenységnek köszönhetően nagy mennyiségű melléktermék, hulladék keletkezik, ami felhasználható anaerob emésztésben biogáz előállítására. Ezek a hulladékok nagy szerves anyag tartalommal rendelkeznek, azonban ismeretlen összetevőket is tartalmazhatnak. A gyártási folyamat során, szennyeződhetnek patogénekkel és nehézfémekkel, melynek következtében az AD gátlódhat. A különböző ipari hulladékok, pl.: papír-, textil-, élelmiszeripari hulladékok, stb. [15] közül, szeretném kiemelni az élelmiszeripari hulladékokat, ugyanis doktori értekezésemben ilyen hulladék típus, azon belül is a vágóhidi hulladékok (bendőtartalom) alkalmazhatóságát vizsgáltam.

2.4.1.2.1. Vágóhidi hulladékok, bendőtartalom

A húsipar hatalmas mennyiségű hulladékot generál, mely elsősorban a vágóhidakról származik. Ezek a hulladékok szintén magas szervesanyag tartalommal rendelkeznek és számos élő patogén mikroorganizmust tartalmazhatnak, minek következtében súlyos környezeti problémát és egészségügyi kockázatot jelenthetnek. Ezért a kibocsátással kapcsolatos feltételek meglehetősen szigorúak [91,92]. Évente mintegy 545 millió juhot és 300 millió szarvasmarhát vágnak le világszerte (FAOSTAT, 2018), mely mintegy 5,46-7,64 Mt juh és mintegy 18-36 Mt szarvasmarha bendőtartalom hulladékot jelent. A magyarországi Élelmiszeripari Információs Rendszer adatai alapján 2019-ben hazánkban mintegy 112.000 szarvasmarhát és 46.000 juhot vágtak le hazai vágóhidakon [93]. Így szarvasmarha vágásból hazánkban 6,7-13,4 ezer tonna, míg juh vágásból 0,46-0,64 ezer tonna bendő hulladék keletkezik. A bendőtartalom hulladék az állat vágását követően a bendőben maradó félig

emésztett táplálékot jelenti, ami gazdag cellulózban, mikrobiális fehérjékben, nyomelemekben, stb. [94–96]. Mindemellett a bendőtartalom egy igen nagy, komplex és aktív mikrobiális közösséggel rendelkezik, mely tartalmaz baktériumokat, gombákat és protozoákat [97]. A fentieket figyelembe véve az elmúlt években számos módszer került kidolgozásra ilyen típusú hulladékok kezelésére, alkalmazására: aerob kezelés, alkalikus hidrolízis, égetés vagy felhasználás állati takarmányozásban [92,96,97]. Emellett a bendőfolyadék inokulumként is felhasználható AD kísérletekben, melynek során az aktív cellulolitikus mikroflórája válik a hozamnövekedés elsődleges forrásává [98,99]. Kevesen vizsgálták azonban, hogy a bendőfolyadék milyen módon növeli a biogáz hozamot.

A kérődző állatok

Az első kérődző állatok, mintegy 50 millió évvel ezelőtt evolválódtak. Az elmúlt tízezer évben 9 fajt háziasított az ember, melynek köszönhetően egyedszámuk napjainkra megközelíti a 3,6 milliárdot. A háziasított fajok – a rénszarvas (*Cervidae*) kivételével – mind a *Bovidae* családba tartoznak [100]. Emésztőrendszerük mérete, felépítése és mikroflórája jelentősen eltér a többi emlős állatétől, ugyanis négyüregű gyomorrendszerük van (bendő, recés gyomor, százrétű és oltógyomor) [101]. Önmaguk nem termelnek a növényi rostok lebontására alkalmas enzimeket, azonban tápcsatornájukban olyan szimbiotikus mikroorganizmusok élnek, melyek igen. A mikrobaközösség tagjai között megfigyelhetünk baktériumokat (eu- és archaea baktériumokat), protozoákat és gombákat is, melyek többsége obligát anaerob [102]. A gazdaállat megfelelő környezetet biztosít a komplex mikrobiális közösség számára a növekedéshez (nedves-, anaerob környezet, ~39°C), azok pedig anyagcserefolyamataik révén a növényi biomasszából VFA-kat állítanak elő, melyekből a gazda szervezet energiát nyer [103,104]. A zsírsavak mellett a mikroorganizmusok fehérjékkel, vitaminokkal és egyéb bioaktív anyagokakkal is ellátják az állatot, valamint metánt, szén-dioxidot és hidrogént is termelnek [105]. Akárcsak az AD folyamatában, itt is ugyanaz a négy lépés zajlódnak le, így az egyes fermentációs termékek keletkezése és felszívódása/átalakítása közötti egyensúly felborulása kritikus lehet az állat számára. Ha az felborul, anyagcsere rendellenességek következnek be, mint pl.: nitrát toxicitás, acidózis, stb. [102]. A mikrobiális aktivitás következtében elsősorban savas karakterű melléktermékek keletkeznek a bendőben, azonban annak sav-bázis egyensúlya mégis pH 6-7 közötti értéket mutat. A bendő túlzott mértékű lesavanyodása három tényező miatt kerülhető el: 1) a keletkező szerves savak gyorsan felszívódnak a bendő falán keresztül, 2) az állat a kérődzés során jelentős mennyiségű nyálat

termel, mely lúgos kémhatású, 3) a fehérjék lebontásából ammónia képződik, mely szintén bázikus karakterű [101].

A bendőfolyadék alkalmazása, mint inokulum

A biogázzal kapcsolatos kutatások egyik fő területe napjainkban, hogy egy adott nyersanyag esetén hogyan gyorsítható fel a belőle keletkező biogáz képződési sebessége, valamint hogyan fokozható egy adott nyersanyag lebonthatósága. A szerteágazó kutatások egyik irányvonala, amikor ezt a célt inokulum (starter kultúra) hozzáadásával kívánják megvalósítani. A starter kultúra olyan mikroorganizmusok közössége, melyek megfelelő számban és metabolikus állapotban, képesek a fermentációs közeg beoltására, valamint a fermentáció eredményességének pozitív irányba történő befolyásolására [106]. Több publikáció is napvilágot látott már arról, hogy a kérődző állatok bendőfolyadékát használják inokulumként biogáz képződés fokozására [99,106–108]. Hu és munkatársai (2005), valamint Yue és munkatásai (2013) munkája alapján a bendőfolyadékban található mikroorganizmusok magasabb cellulolitikus aktivitással rendelkeznek, mint egy normál anaerob emésztő rendszer mikroba közössége, ezáltal a lignocellulóz szubsztrát jóval hatékonyabb lebontását teszik lehetővé [109,110]. Fontos megjegyezni, hogy nemcsak a hidrolízisben, de az illékony szerves savak termelésében is hatékonynak bizonyultak [111]. A bendőben egy igen komplex mikrobiális közösség található, melynek 80-90%-a a hagyományos izolálási technikákkal nem volt vizsgálható korábban. Azonban az újgenerációs szekvenálások megjelenésével az elmúlt bő egy évtizedben egyre többet tudhattunk meg a bendő mikrobiomjáról, metabolit profiljáról, laboratóriumi körülmények között nem tenyészthető tagjairól, stb. [109]. Wirth és munkatársai (2018) meghatározták a szarvasmarha bendő plaktonikus core mikrobiomját teljes metagenom szekvenálással. Vizsgálataik alapján a mikrobiom 48 nemzetséget foglalt magába. Az eubaktérium csoport tagjai közül a legnagyobb gyakorisággal a *Prevotella, Ruminococcus, Sharpea,* azonosítatlan *Lachnospiracea, Eubacterium, Treponema, Clostridium, Bacteriodes,* azonosítatlan *Ruminococcacea, Butyrivibrio, Fibrobacter* nemzetségek mutatkoztak a 10 leggyakoribb nemzetségnek. Az archaea csoportból egyetlenegy nemzetség volt jelen a core mikrobiomban: a *Methanobrevibacter*, míg gomba jelenlétét nem sikerült kimutatni [112].

2.5. Mikrobiális közösségek vizsgálata

2.5.1. Metagenomikai vizsgálatok és előzményei

A metagenomikai vizsgálatok lehetőséget biztosítanak arra, hogy a mikrobiális közösségeket feltérképezzük a környezeti mintákban (pl.: állatok tápcsatornája, talaj-, vízminták, stb.) anélkül, hogy azokból tiszta kultúrákat kellene izolálnunk és jellemeznünk. Emellett ezzel a technológiai eljárással olyan mikroorganizmusok is vizsgálhatóak, melyek nem, vagy csak igen nehezen tenyészthetőek. Továbbá, teljes metagenomikai adatokból kinyert genomi információkból lehet következtetni az egyes mikrobiális komponensek funkciójára is [113]. Ez a molekuláris biológiai módszer, valamint vele párhuzamosan a bioinformatika, mely nagy mennyiségű adat feldolgozását teszi lehetővé, rohamosan fejlődő területek. A kutatók már korábban is alkalmaztak olyan módszereket, melyekkel mikrobiális közösségek vizsgálhatók, pl.: denaturáló grádiens gélelektroforézis, fluorescens in situ hibridizáció, különböző polimeráz láncreakciós technikák (restrikciós fragment-hossz polimorfizmus, terminális restrikciós fragment-hossz polimorfizmus, kvantitatív real-time PCR) [114–116], azonban ezekkel a módszerekkel a kinyerhető információk korlátozottak voltak és sok esetben nem a teljes közösségre vonatkoztak, csak annak egyes tagjaira. Az 1970-es évek végén a Sanger szekvenálás forradalmasította a mikroorganizmusok osztályozását és tanulmányozását is, azonban a legnagyobb áttörést a mikrobiális közösségek vizsgálataiban a 2005-ben először megjelent, második generációs (újgenerációs) szekvenálási eljárások hozták meg, melyekkel már komplex közösségekről is mélyrehatóbb információkat kaphattunk [116].

2.5.2. Újgenerációs szekvenálási technikák

Az újgenerációs szekvenálási technológiák első képviselői a Roche 454 (2005-ben), majd az Illumina-Solexa (2006-ban) és az ABI SOLiD (2007-ben) platformok voltak [117]. Ezeket nagy áteresztőképességű szekvenálásoknak is nevezik, ugyanis egyetlen futás alatt nagy mennyiségű adat előállítására képesek. A Rosche 454, az Illumina-Solexa összekapcsolja a szintézist a leolvasással, az ABI SOLiD rendszere pedig ligálás alapú szekvenálást végez [118]. Ezek közül az Illumia technológiáját szeretném részletesebben ismertetni, ugyanis kísérleteim során ezt a platformot alkalmaztuk.

Napjainkra, számos, az Illumina által forgalmazott szekvenáló készülék áll már a kutatók rendelkezésére (iSeq, MiniSeq, MiSeq, HiSeq, NextSeq és NovaSeq). A megfelelő készülék

kiválasztása függ a felhasználási céltól. Az egyes készülékek esetén eltér a futási idő, a generált adatmennyiség, valamint a leolvasott readek hossza is. Például a 16S rRNS gén alapú szekvenáláshoz a MiniSeq vagy MiSeq készülék, míg metagenomikai profilhoz a NextSeq vagy a NovaSeq készülékek használata ajánlott (www.illumina.com).

Az Illumina platform híd amplifikációt (bridge amplification) alkalmaz az egyedi genomi régiók amplifikálásához és a szekvenálás a szálszintézis során történik (sequencing by synthesis). Az amplifikációhoz használt forvard és a reverz oligonukleotidok (primerek) adapter szekvenciákat tartalmaznak, mely révén a flow cell-en lévő komplementer adapter szekvenciákhoz képesek kapcsolódni a DNS könyvtár molekulái. Az amplifikációt követően a könyvtár feltöltése következik a flow cell-re. Denaturációt követően az egyesszálú DNS fragmentumok a felszínhez kötött oligonukleotidokhoz kapcsolódnak, melyek primerként funkcionálnak az első DNS szál másolatok létrehozása során. Ezt követően a kezdeti könyvtár molekulák eltávolításra kerülnek és csak a másolt, a flow cell-hez rögzített fragmentek lesznek felhasználva a klaszterképzéshez. Specifikus pufferek felhasználásával, 60°C-on történik meg a klaszterképzés, ismételve a denaturáció, hibridizáció, polimerizáció lépéseit. A lépések során a másolatok 3' vége képes hozzáhibridizálni a komplementer oligonukleotid szekvenciákhoz, melyek szintén a flow cell-hez vannak rögzítve, így kialakul a híd alakú struktúra, melyről az amplifikáció a nevét kapta. Majd megtörténik az újabb szálak szintézise, így a klaszterek képzése. Ezt követően a reverz szálat lehasítják, így csak a forvard szál marad a flow cellen. A reakcióelegyhez adott ddNTP—knek köszönhetően pedig a leváló ssDNS szál nyitott 3' vége blokkolásra, majd a szál lemosásra kerül. Megfelelő körülmények között a flow cell minden egyes mm^2-én 800,000-1,000,000 klaszter keletkezik. A szekvenálás során az egyes DNS szálakat bázisról-bázisra leolvassák ismétlődő ciklusokban. Az egyes ciklusokban fluorescens jelölt nukleotidokat adnak a reakcióhoz, melyek mindegyike egyedi jelöléssel rendelkezik és reverzibilisen terminálja a szintézist. A fluorescens csoport lehasításra kerül, fluorescens jel képződik, melyet egy kamera érzékel. A hasítás következtében a terminálás megszűnik, így a templát szál készen áll az újabb ciklusra [119].

2.5.3. Harmadik generációs szekvenálási technikák

A második generációs szekvenálási technológiák azonban nem elégítették ki a kutatók igényeit. Mindegyik PCR alapú volt, ami sok időt és pénzt igényelt, emellett a genomok komplexitása, azok repetitív szekvenciái, a rövid leolvasások, mind-mind bonyolulttá,

esetenként lehetetlenné tették a genom összeillesztéseket [120]. Mindezeknek köszönhetően 2011-ben megjelentek a harmadik generációs szekvenátorok, melyek ezeket a problémákat kiküszöbölik [120–122]. Alacsony költségűek, a mintaelőkészítés egyszerű, emellett nem igényelnek PCR amplifikációt, ezáltal gyorsabbak. Mindemellett néhány kilobázisos (1-10kb) leolvasásokat eredményeznek, melyekkel a komplex genomok repetitív szekvenciái nem okoznak gondot az összeszerelés során. Jelenleg két típusuk található meg a piacon: a single molecule real time sequencing (SMRT) és a szintetikus megközelítésű, mely az Illumina rövid read-es technológiáján alapul. Azonban a legelterjedtebbek az SMRT technológiák közül a PacBio és Oxford Nanopore platformok [120].

A második, illetve harmadik generációs szekvenálási technológiák legnagyobb fejlesztése, hogy a könyvtárkészítéshez nincs szükség klónozó vektorokra, illetve klónozó törzsekre, ezáltal egyszerűsödött a könyvtárkészítés, csökkent a kontamináció lehetősége. Bár ezen technológiák hatékonyak és lehetővé tették új mikrobiális közösségek és új környezetek felfedezését, azonban ezeknek is megvannak a sajátos korlátai és hibái, mint például a leolvasások hossza, vagy a hibásan leolvasott bázisok aránya, stb. [116].

2.5.3. Metagenomika vizsgálati megközelítések

A metagenomika jellemzően két külön szekvenálási stratégiát foglal magában: az amplikon szekvenálást (másnéven target gén szekvenálás), és a shotgun szekvenálást, mely a mintában fellelhető összes DNS-t vizsgálja [123].

Mindkét eljárás alkalmas komplex környezeti minták mikrobiológiai elemzésére, mely során genomikai információkat nyerhetünk azokról a mikroorganizmusokról, melyek a mintáinkban jelen vannak [124]. Amplikon szekvenálás esetén leggyakrabban a 16S rRNS gént alkalmazzák, mely egy széleskörben elfogadott filogenetikai marker baktériumok esetén [125]. Azonban más markergén, mint pl.: a metanogének vizsgálatára alkalmas *mcrA* gén is alkalmazható [126]. A 16S rRNS gén univerzálisan előfordul a prokarióták körében. A funkciója hosszú idő óta nem változott, így a benne bekövetkező véletlenszerű változások az eltelt idő pontosabb mértékét jelentik (evolúció). Multigén családban fordul elő, vagy operonban, mérete pedig nem túl nagy (~1500 bp) [125]. A gén konzervált régiókat, valamint azok között 9 db ún. variábilis régiót tartalmaz, mely fajonként egyedi szekvenciákkal rendelkezik, ezzel lehetővé téve a fajazonosítást. A génen belül legtöbb esetben a V3-V4-es hipervariábilis régió vizsgálatát célozzák meg, azonban más variábilis régiókat is

vizsgálhatnak, mint pl.: V1-V2, V6-V8. A taxonómiai vizsgálatra kiválasztott régió azonban jelentős befolyással lehet az eredményre [127–129]. Költséghatékony módszer az egyes minták mikrobiomjának elemzésére, ám legtöbb esetben csak nemzetség szintű elemzést tesz lehetővé, attól függően, hogy milyen adatbázist és azonosító szoftvert alkalmazunk, ugyanis néhány faj között elég magas szekvencia-azonosság figyelhető meg [130]. A taxonómiai besorolás mellett fajgazdagság és különböző diverzitás mutatók is számolhatók [131]. Fontos megjegyezni, hogy a módszer számos hibát rejthet magában, mind a minta előkészítése, mind a szekvenálás során [123]. Ilyen típusú szekvenálási adatok kiértékelésére számos informatikai program/programcsomag, online kiértékelő szoftver került kifejlesztésre, többek között pl.: a MALT, MEGAN, Qiime, Qiime II, OneCodex, MG-RAST, stb., melyek vagy meghatározott, vagy esetenként választható adatbázisokkal (pl.: Silva SSU vagy LSU, Greengenes, OneCodex Targeted loci, stb.) működnek [132,133,142,134–141].

A másik megközelítést, a shotgun metagenom szekvenálást részben a fentebb említett hibák és limitációk kiküszöbölése hívta életre, mellyel már a baktériumok faj és törzsszintű azonosítása is lehetséges. Emellett funkcionális analízisre is jóval alkalmasabb, mellyel az egyes minták esetében jóval pontosabb funkciók határozhatók meg [123]. Ezzel a metagenomikai megközelítéssel az adott környezeti minta (metagenom) génkészlete meghatározható, és jósolható azok biokémiai aktivitása, illetve akár azok komplex interakciói (pl.: gazdaszervezet és mikroba között) vagy metabolikus utak is [143]. Emellett lehetővé teszi olyan, eddig még ismeretlen mikrobák felfedezését is, melyek egyébként beazonosíthatatlanok lennének (az amplikon szekvenálás sok esetben csak nemzetség szintű meghatározást tesz lehetővé) [144]. A költségeket tekintve drágább mint az amplikon szekvenálás, sokkal komolyabb számítástechnikai kapacitást igényel, ezért a benne rejlő lehetőségek ellenére alkalmazása még kevésbé elterjedt [145].

Az íly módon nyert adatok kiértékelése történhet read- (nem összeillesztéses), illetve összeillesztés alapon. Első esetben különféle programok alkalmazásával taxonómiai (pl.: MG-RAST, MEGAN6, Kraken, MetaPhlAn, stb.) és funkcionális (pl.: DIAMOND, MG-RAST, MEGAN6, PALADIN, stb.) analízis is végrehajtható [136,146–149]. Összeillesztés alapú megközelítés esetén az első lépés a minőségileg szűrt readek összeszerelése kontigokká, mely történhet pl.: metaSPAdes, MEGAHIT, MetAMOS, stb. programokkal. Az így kapott néhány 10 kb hosszúságú kontigok ezt követően közvetlenül felhasználhatóak gén jóslásra (eggNOG-mapper, MetaGeneMark-2, BlastKOALA, stb.), funkciók hozzárendelésére, vagy binelő szoftverek segítségével (pl.: MetaWRAP, CONCOCT, MetaBAT2, MaxBin2, COCACOLA,

stb.) egyedi genomok, ún. metagenomic assembled genomes (MAGs) szerelhetők össze belőlük [150]. Binelés során az egyes programok az ugyanabba a biológiai taxonba sorolható kontigokat összegyűjtik és osztályozzák vagy taxonómiai vagy taxonómia független (pl.: oligonukleotid frekvencia, GC tartalom alapján) módon. Emellett funkcionális jellemzés is végrehajtható [150]. Az összeszerelt binek pedig minőségileg jól jellemezhetők azok teljességével és kontaminációjával markergének alapján [151].

3. Célkitűzés

Munkám megkezdésekor célul tűztem ki, hogy:

- az ipari-mezőgazdasági termelés során visszamaradó paradicsom növényi maradvány (szár és levél) biogáz előállításra való alkalmazhatóságát megvizsgáljam, mind szakaszos, mind folyamatos üzemű fermentációban, mind mono-, mind pedig koszubsztrátként.
- kiderítsem, a paradicsom növényi maradvány folyamatos üzemű fermentációban milyen változásokat eredményez a mikrobiális közösségben.
- felderítsem, hogy a paradicsom növényi maradvány milyen komponense fejt ki meghatározó hatást a szakaszos, illetve folyamatos fermentációra.
- összehasonlítsam a szakaszos és folyamatos fermentációval kapott eredményeket és az esetleges különbségekre magyarázatot találjak.
- a húsipari termelés következtében nagy mennyiségben hulladékként keletkező bendőtartalmat (juh, marha) inokulumként és nyersanyagként, biogáz előállítására hasznosítsam.
- meghatározzam, hogy hogyan érhető el a legmagasabb gázkihozatal a bendőtartalmakból.
- metagenomikai módszerekkel összehasonlísam a juh és a szarvasmarha bendőtartalmát, valamint feltérképezzem azon mikroorganizmusokat és metabolikus útvonalakat, melyek részt vesznek a bendőtartalmak szénhidrát komponenseinek lebontásában és az ecetsav termelésében.

4. Anyagok és módszerek

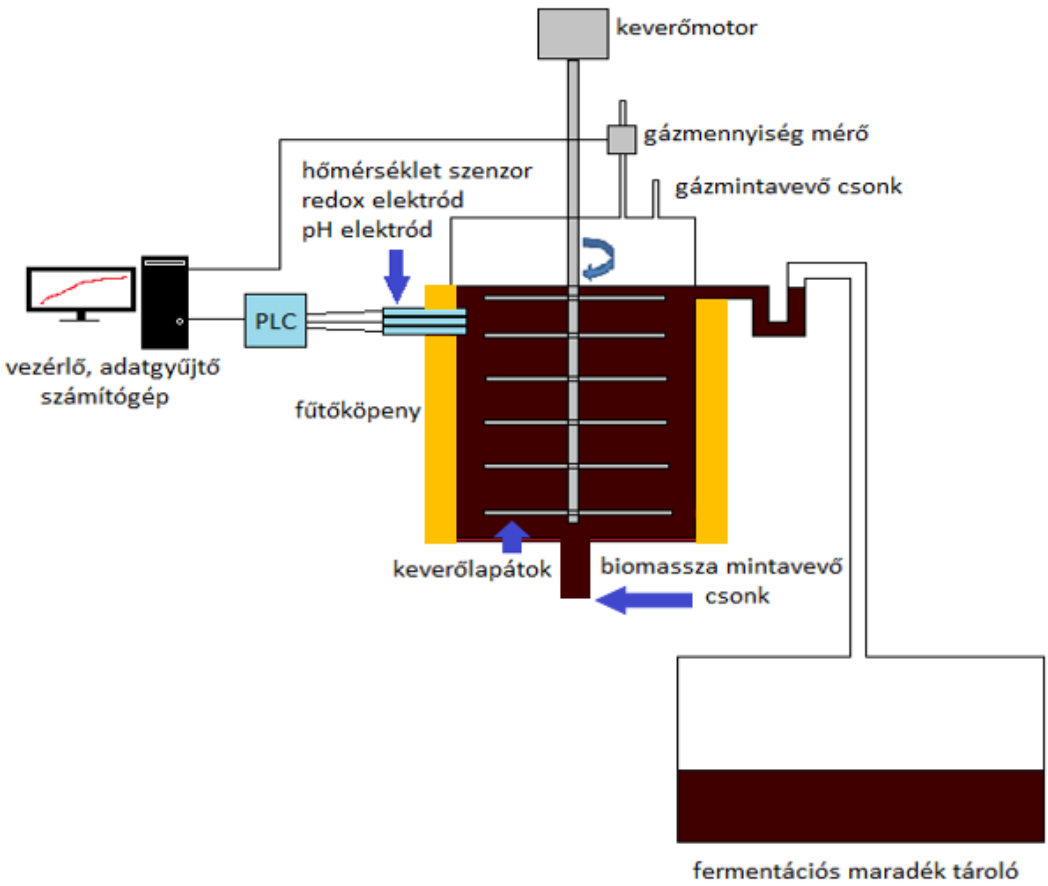
4.1. Alkalmazott fermentációs technikák és a hozzájuk kapcsolódó mérések

4.1.1. Szakaszos fermentáció

Számos szabványosított módszer létezik, mellyel egy adott nyersanyag biometán potenciál értéke (BMP) meghatározható szakaszos fermentációban. Kísérleteim során a VDI 4630-as szabványt alkalmaztam szakaszos üzemmódban. A kísérleteket 125 ml-es Wheaton szérum üvegekben hajtottam végre, melyeket gumi szeptummal zártam le légmentesen. Az oltóiszap egy stabilan működő ipari biogáz fermentorból származott (Zöldforrás Energia Kft, Szeged), mely kukorica silót és sertés hígtrágyát használ nyersanyagként. A frissen begyűjtött oltóiszapot egy 2 mm-es szűrőn átszűrtem, hogy a nagyobb növényi maradványokat eltávolítsam, ezáltal homogén legyen az oltóiszap. A reaktorok összeállítása 40 ml folyadék térfogattal történt, ahol az oltóiszap/szubsztrát szerves szárazanyag tartalom (oTS) aránya 2 volt (VDI I). VDI II esetén az oltóiszap/szubsztrát aránya oTS tekintetében 1 volt. Az összeállítást követően a légteret nitrogén (N_2) gázzal (Messer Magyarország Kft, Dunaföldvár, Magyarország) cseréltem le, hogy biztosítsam az anaerob környezetet. A reaktorokat 37°C-on inkubáltam, majd a keletkező metán mennyiségét naponta mértem Agilent Technologies 6890 gázkromatográf (GC) segítségével (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) (ld. 4.1.9. fejezet). Minden mérést követően a légteret nitrogén gázzal fújattam át, hogy a napi metánhozamokat napról-napra meg tudjam határozni. A napi metánhozamokat összeadva állapítottam meg az egyes szubsztrátok kumulatív metántermelését, így azok biokémiai metán potenciálját. A szakaszos kísérleteket minden alkalommal 30 napig végeztem, kivétel a tomatin/tomatidin tesztet, ahol 16 napig.

4.1.2. Folyamatos üzemű fermentáció

A kísérleteket egyedileg gyártott, 5 literes fermentorokban végeztem, mely fermentorok felépítését az 7. ábra szemlélteti.



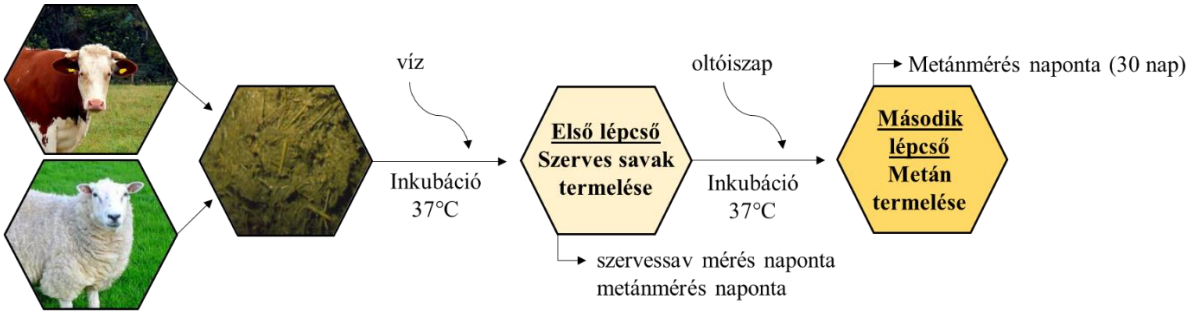
7. ábra

A folyamatos üzemű fermentorok sematikus ábrázolása

A reaktorok térfogata 6 liter, melyből 5 liter a folyadék térfogat és 1 liter a gáztér. A fermentorok blokkos elrendezésben helyezkednek el, ahol 1 blokkban 3 db külön-külön üzemeltethető fermentor tartály foglal helyet. Minden fermentorban külön redox potenciál-, pH-, valamint gázmennyiség mérő került elhelyezésre, melyek a rendszerhez kapcsolt számítógép segítségével 4 óránként rögzítik az egyes paramétereket. A reaktorok elektromos fűtő köpennyel rendelkeznek (mely biztosítja az állandó 37 ± 1°C-ot), valamint spirális keverőlapáttal vannak felszerelve. A keletkező biogáz mennyiségét közvetlen tömegáramú érzékelőkkel detektáltam, valamint naponta gázmintát vettem a keletkező biogázból, hogy a metán mennyiségét meghatározzam. A szubsztrát beadagolása napi szinten történt azonos időben, 1g oTS/liter terheléssel. A fermentorokból az adagolást követően a bejuttatott nyersanyag térfogatának megfelelő térfogatú fermentációs folyadék távozik a rendszerből egy túlfolyón keresztül (6. ábra).

4.1.3. Kétlépcsős fermentáció

Bendőtartalommal történő kísérleteink során megállapítottam, hogy a bendőtartalom laboratóriumba történő szállítását követően 24 órán belül lesavanyodik, ezért az ott élő mikrobák aktivitása és a szubsztrát kémiai összetétele is megváltozik. Emiatta a bendőtartalmak biogáz fermentációkban történő alkalmazásának vizsgálatára kétlépcsős fermentációs kísérleteket terveztem. A kísérleti elrendezést az alábbi ábra szemlélteti:



8. ábra

A bendőtartalmakkal végzett kísérletek sematikus ábrája

Első lépcső: Szerves savak megtermelése, előemésztés

A bendőtartalmat a laborba szállítást követően steril desztillált vízzel hígítottam az adott kísérletnek megfelelő mértékben 1:1, 1:2 vagy 1:3 térfogat arányban (bendőtartalom:víz). A kísérleteimet 500 ml-es Wheaton szérum üvegekben végeztem, 300 ml-es végtérfogatban. Az üvegeket gumiszeptummal zártam le, valamint az üvegek légterét N_2 gázzal fújattam át, hogy az anaerob környezetet biztosítsam. Az így összeállított mintákat 37 °C-os inkubátorba helyeztem. Az első lépcsőben termelődő szerves savak minőségi és mennyiségi meghatározását nagy teljesítményű folyadék kromatográfiás eljárással (HPLC, 4.1.11. fejezet), a keletkező metán mennyiségét pedig GC analízissel (4.1.9. fejezet) határoztam meg naponta.

Az 5.2.3.-es fejezet kísérletét az alábbiak alapján végeztem el: 3 juh- és 3 szarvasmarha bendőtartalmat vizsgáltam, mindegyiket további 3-3 technikai párhuzamossal. A beérkező bendőtartalmakat 1:1 térfogat arányban hígítottam vízzel, majd 5 napon keresztül 37°C-on inkubáltam anaerob környezetben. Öt napon keresztül naponta mértem a pH változását, a légtér metántartalmát (4.1.9. fejezet), szerves savak változását (4.1.11. fejezet), valamint a 0., 2. és 5. napokon mintákat vettem teljes metagenom szekvenáláshoz, hogy alaposan

feltérképezzem az ebben a szakaszban lezajlódó folyamatokat. A 0. nap az állatok bendőjének kiindulási állapotát mutatja.

Második lépcső: Metántermelés, utóemésztés

Az első lépcsőben megtermelt szerves savakból (folyadék fázis), valamint a visszamaradó szilárd fázisból a második lépcsőben történt a metánképzés. Az első lépcsőben is történt metán mennyiségi meghatározás, ugyanis a bendő endogén mikroflórája is képes metanogenezisre. Azonban az első lépcsőben keletkező szerves savak felhalmozódása jelentősen gátolja azt az idő előrehaladtával (ld. 19. ábra). A két fázis különválasztására azok eltérő fiziko-kémiai paraméterei miatt volt szükség, valamint amiatt, mert a mintáim nem voltak teljesen homogének. A szétválasztás 2 mm-es szűrőn keresztül történt meg. Az alkalmazott oltóiszap szintén a sándorfalvi biogáz üzemből származott. A folyadékfázis esetében az alkalmazott mennyiséget úgy választottam meg, hogy a szerves savak koncentrációja 2 g/liter legyen, szilárd fázis esetében pedig az oltóiszap/nyersanyag (szilárd fázis) szerves szárazanyag tartalom aránya 2 legyen. A fermentorokat gumiszeptummal zártam le, nitrogén gázzal anaerobizáltam, majd 37°C-os inkubátorban tároltam őket. Napi metántermelésüket GC-vel követtem nyomon 30 napon keresztül (4.1.9. fejezet). A napi méréseket követően a légteret nitrogén gázzal fújattam át, hogy másnap a napi gáztermelést meg tudjam határozni. A folyadék fázis esetében az illékony szerves savak illékonysága miatt a szárazanyag (TS), és szerves száraz anyag (oTS) meghatározás téves eredményhez vezet, ezért ezekben a kísérletekben a keletkező metán normálását széntartalomra végeztem el. A széntartalom meghatározást Elementar Analyzer Vario MAX CN készülékkel hajtottam végre (4.1.6. fejezet).

4.1.4. Szárazanyag-, szerves szárazanyag tartalom meghatározás

Az anaerob emésztés esetén az egyik legjelentősebb paraméter a nyersanyag esetében annak TS, valamint oTS tartalma. A szubsztrát TS tartalmának meghatározásához az alkalmazott szubsztrátokat 105 °C-os szárítószekrénybe helyeztem és tömegállandóságig hagytam őket száradni (kb. 24 óra). A kiindulási, valamint a visszamaradt tömegből számoltam a TS tartalmat. A szárazanyag tartalom meghatározását követően a mintákat égető kemencébe helyeztem, majd 550 °C-on hevítettem őket szintén tömegállandóságig (égetőkemence: Nabertherm LE 4/11/R6). A minták tömegét deszikkálást követően újra lemértem, majd az

égetés után visszamaradt hamu tömegből kalkuláltam az oTS tartalmat. A száraz minta tömegéből kivontam a hamu tömegét, majd az így kapott értéket elosztottam a száraz minta tömegével.

4.1.5. Rostanalízis

A kísérleteim során alkalmazott szubsztrátok rostanalízise (szolubilis anyag-, cellulóz, hemicellulóz, lignin tartalom) FIWE 3 Fiber Analyzer (VELP Scientifica, Usmate, Italy) készülékkel történt, Van Soest módszerrel [152]. Az eljárás során több lépésen keresztül kerülnek szolubilizálásra az egyes komponensek. Első lépésben a szolubilis frakció (oldható szénhidrátok, pektinek, a legtöbb fehérje, lipidek, oldékony ásványi anyagok), második lépésben a hemicellulózok, harmadik lépésben a cellulóz, majd végül a lignin tartalom kerül meghatározásra. Az összetevők mennyiségének meghatározása az egyes szolubilizálási lépéseket követően mért visszamaradó tömegből számolható.

4.1.6. Szén és nitrogén tartalom meghatározása

A mintáim összes szén-, valamint összes nitrogén tartalmát Elementar Analyzer Vario MAX CN készülékkel végeztem el (Elementar Group, Hanau, Németország). A műszert a következő beállításokkal használtam: égési hőmérséklet: 900°C, utóégetési hőmérséklet: 900°C, redukciós hőmérséklet: 830°C, oszlop hőmérséklet: 250°C. A kívánt komponensek elválasztásához egy specifikus adszorpciós oszlopot alkalmaztam C/N módban, ami Sicapentet tartalmazott (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A vivő-, valamint mosó gáz hélium volt (Messer Group, Bad Soden, Németország), a keletkező anyagokat pedig hővezető képességi detektorral mértem (TCD). A műszer kalibrálása glutaminsavval történt.

4.1.7. pH meghatározás

A minták sav-bázis egyensúlyának meghatározása Radelkis OP-211/2 digitális pH mérővel (RADELKIS Kft, Budapest, Hungary) történt.

4.1.8. Összes szerves sav és pufferkapacitás meghatározása

A mintáim összes szerves savtartalmát (FOS: Flüchtige Organische Säuren), valamint pufferkapacitását (TAC: Totales Anorganisches Carbonat), valamint kettejük hányadosát (FOS/TAC) Pronova FOS/TAC 2000 automata titráló készülékkel határoztam meg. A meghatározás során 0,1N H_2SO_4 titráló oldatot használtam és a mintáimat pH=4,30 értékig titráltam.

4.1.9. Metántartalom meghatározás

A mintáimban keletkező metán mennyiségi meghatározása GC (Agilent Technologies 6890 GC (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)) segítségével történt. A gázminták injektálásához zárható/gázbiztos Hamilton fecskendőt alkalmaztam, valamint a metántartalom pontos meghatározásához kalibrációt végeztem. A készüléket a következő egységekkel, paraméterekkel üzemeltettem:

- Detektor típusa: hővezető-képességi detektor (160°C)
- Vivőgáz: Argon (5.0), (Messer Magyarország Kft., Dunaföldvár, Magyarország)
- Inlet üzemmód: Split (5:1)
- Inlet hőmérséklet: 160 °C
- Kolonna típusa: HP Molesieve 5 A (32 m x 0,53mm x 25 µm)
- Kályhahőmérséklet: 42°C
- Lineáris áramlási sebesség: 16,8 ml/perc

A fermentorok légteréből naponta vettem légtér mintát (100 µl), majd mérést követően nitrogén gázzal cseréltem ki a fermentorok légterét (10 perc átfújatás). Minden esetben megszüntettem a reaktorokban keletkező túlnyomást (víz alatt, gumicsőre szerelt tűn keresztül, hogy oxigén ne juthasson vissza a reaktorokba), majd visszahelyeztem azokat 37°C-ra. Folyamatos üzemű fermentáció esetén a reaktorok gázteréből zárható hypovial üvegekbe vettem gázmintát, majd abból történt az injektálás a GC készülékbe (100 µl). Ezt követően pedig a pontos metánmennyiség meghatározásához számoltam a mintavétel során történő hígulás mértékével.

4.1.10. Ammónium-ion meghatározás

A minták ammónium-ion tartalmát Spectoquant Nova 60 reagens teszttel végeztem (Merck, 1.00683.0001). A gyorsteszt spektrofotometriás elven működik, ezért a mintáimat először szűrőpapíron keresztül, majd 0,2 µm-es fecskendőszűrőn keresztül leszűrtem, hogy a szennyeződésektől - melyek fényszórása hibához vezethet – megszabaduljak.

4.1.11. Szerves savak mennyiségi meghatározása nagy teljesítményű folyadék kromatográffal (HPLC)

A fermentációs folyamatok során keletkező illékony szerves savak mennyiségi és minőségi meghatározása egy VWR Hitachi Chromaster High Performance Liquid Chromatograph 5210 (VWR International Ltf., Lutterwoth, Nagy-Britannia) készülékkel történt. A HPLC vizsgálatokhoz a mintáimat a következőképpen kezeltem elő, hogy megszabaduljak a szennyeződésektől: 20 perc centrifugálás 13.000 rpm-en, 4 °C-on, majd. a tiszta felülúszót VWR Syringe Filteren keresztül újra centrifugáltam 20 percen keresztül, 13.000 x g sebességgel, szintén 4°C-on.

A HPLC készülék az alábbi beállításokkal és felszerelésekkel üzemelt:

- pumpa: VWR Hitachi Chromaster 5110
- eluens: 0,01N H_2SO_4 oldat, áramlási sebessége 0,8 ml/perc
- injektált mennyiség: 10 µl
- oszlop: Agilent Hi-Plex H
- kolonna termosztát: ELITE LaChrom L2350
- kolonna termosztát hőmérséklete: 50 °C
- detektor: Hitachi Chromaster 5450 RI
- detektor hőmérséklete: 41 °C

A kapott kromatogrammok kiértékelése EZ Chrome Elite programmal történt. A kromatogrammokról leolvasható csúcsok retenciós ideje alapján történt meg az egyes illékony szerves savak azonosítása, míg a csúcs alatti területek átszámításából történt a mennyiségi meghatározás.

4.1.12. gDNS izolálás metagenom szekvenálásokhoz

Az egyes minták metagenomikai (16S amplikon és teljes metagenom is) elemzéséhez szükséges összes gDNS a Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Kit segítségével (Zymo Research Corporation, Irvine, USA) került kivonásra a mintáimból a gyártó utasításai szerint.

A DNS kinyeréseket követően a DNS minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem (1 % agaróz gél, 90 V, 30 perc, TAE pufferben), mennyiségét pedig Qubit 4.0 fluoriméterrel (Invitrogen, Waltham, USA) határoztam meg.

4.2. Metagenom szekvenálás

4.2.1. 16S rRNS alapú metagenom szekvenálás

A folyamatos üzemű fermentációkból származó minták 16S alapú metagenom szekvenálását Illumina MiSeq készüléken végezték el. A 16S rRNS gén V3-V4-es régióját sokszoroztuk fel a gyártó utasításai szerint. A PCR reakcióhoz az alábbi primerpárt alkalmaztam:

Forvard primer: 5' – TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3',
Reverz primer: 5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC – 3'.

A PCR rekació (25µl) pedig az alábbi összetevőket tartalmazta:

Komponensek	25 µl reakcióhoz	végső koncentráció
Víz	10,5µl	-
2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12,5µl	1x
10µM Forvard primer	0,5µl	0,3µM
10µM Reverz primer	0,5µl	0,3µM
templát gDNS	1µl	12,5ng

Az alkalmazott PCR program:

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklus szám
Elődenaturáció	95°C	3 perc	1X
Denaturáció	95°C	30 másodperc	25X
Hibridizáció	65°C	30 másodperc	
Polimerizáció	72°C	30 másodperc	
Utópolimerizáció	72°C	5 perc	1X

A PCR reakciók, majd a könyvtárak tisztítását követően a mintákat Illumina MiSeq készülékkel, Illumina MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle) kit alkalmazásával szekvenáltuk. A nyers readek elérhetőek az NCBI Sequence Read Archive (SRA) archívumában az alábbi kódszámmal: SAMN13231577.

	readszámok					
Minták	kiinduló	szűrt	denoisedF	denoisedR	merged	nonchim
KSZ/1	56791	47856	46381	46654	18289	17022
KSZ/2	52597	44319	40952	41460	18218	16084
KSZ/3	52019	42515	39183	39811	17191	15185
PNM/1	54535	46605	45735	45980	21142	20136
PNM/2	56333	48137	47184	47455	22385	21365
PNM/3	50528	42531	41733	41961	19706	18785
KOF/1	57528	48167	46768	47023	26622	23788
KOF/2	63492	51770	50298	50674	29101	26267
KOF/3	60378	51086	49718	50006	28762	26017

KSZ, PNM és KOF - fermentorok kukoricaszárral, paradicsom növényi maradvánnyal és kofermentációs szubsztráttal etetve. 1, 2, 3 a technikai párhuzamosokat jelöli.

1. táblázat

Az amplikon szekvenálás során kapott readek statisztikai adatai

A trimmelést és minőségi szűrést a *DADA2's* [134] program segítségével végeztük el, a *filterAndTrim* funkció alkalmazásával (paraméterek: truncLen = c(240,220), maxN=0, maxEE = c(2,2), truncQ = 2, rm.phix = T, ctrimLeft = c(50, 55)) és R programcsomag használatával (R version 3.5.3, *Great Truth*) [153]. A trimmelt és minőségileg szűrt readeket feltöltöttük a OneCodex webszerverre, ahol a Targeted Loci adatbázist alkalmaztuk a klasszifikációhoz [139]. A taxonómiai osztályozást követően kapott eredmények (*Phylum* and *Genus* szinten)

letöltésre kerültek .csv formátumban. A PCA analízis *FactoMineR* programmal [154], valamint megjelenítése *factoextra* programmal történt [155]. Az alfa-diverzitás értékeket pedig *phyloseq* programmal határoztuk meg. Az ezt követő statisztikai elemzéshez a DESeq2 (test = "Wald", fitType = "parametric", p<0,01) programcsomag szolgált segítségül [156,157]. A kapott eredményeket pedig a ggpubr [158] program segítségével ábrázoltuk.

4.2.2. Shotgun metagenom szekvenálás

A tisztított gDNS mintákat a Seqomics Kft. szekvenálta meg. A fragment könyvtárak elkészítéséhez a „NEBNext Ultra II Library Prep Kit for Illumina" kitet alkalmazták a gyártó utasításai szerint (www.international.neb.com). Az elkészített könyvtárakat Illumina NextSeq készüléken szekvenálták.

Ezt követően a nyers readek minőségi analízise FastQC és MultiQC programok segítségével történt a programok alapbeállításainak megfelelően [159,160]. A readek trimmelését a Trimmomatic program segítségével végeztük el az alábbi beállításokkal (LEADING:4 TRAILING:4 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:125 ILLUMINACLIP) [161]. A minőségileg szűrt és trimmelt readek számszerűsített adatai az 5. táblázatban találhatóak.

A minták taxonómiai elemzéséhez Diamond és MEGAN programcsomagokat használtunk. Ezen esetekben az illesztés és azonosítás az NCBI nr adatbázis alkalmazásával történt [162]. A MEGAN programból exportált adatokat pedig Microsoft Excel programmal ábrázoltam.

A taxonómiai analízis mellett első lépésben a MetaSPAdes programot alkalmaztuk, mely segítségével a 100-150 bázis hosszúságú readeket min. 1000, tipikusan néhányszor 10 kb hosszúságú kontigokká szereltük össze és MetaQUAST-t programmal elemeztük az összeillesztett kontigok paramétereit [163,164]. Az összeszerelést követő statisztikai adatok a 6. táblázatban olvashatóak. A kapott kontigokból egyedi genomok összeillesztését hajtottuk végre a MetaWRAP programcsomaggal, mely során háromféle automata binelő programot (CONCOCT, metaBAT2, MaxBin2) is alkalmaztunk [165]. Az elemzés során csak a min. 1000 nukleotid hosszúságú kontigokat használtunk fel, hogy a fragmentált binek számát csökkentsük. A kontigok minőségét CheckM programmal ellenőriztük [166]. A minőségileg megfelelő bineket a GTDB Tk program segítségével azonosítottuk a GTDB adatbázist alkalmazva [167]. A metabolikus útvonalakat pedig eggNOG-Mapper segítségével vizsgáltuk [168,169]. Az így kapott eredményeket Circos program, valamint Excel program segítségével ábrázoltam [170]. A readek visszatérképezése a binekre Bowtie 2 programmal történt a

program alapbeállításait alkalmazva. A kapott térképfájlokat a SAMtools program segítségével megfelelő formába alakítottuk és a CheckM programmal számoltuk ki a binek lefedettségeit. A visszatérképeződő readeket pedig ezt követően normalizáltuk a szekvenálási mélységre, valamint a binek nagyságára.

4.3. Az adatok kiértékelése és statisztikai elemzése

Az egyes mérési eredményeket Microsoft Excel, valamint GraphPad Prism programok segítségével ábrázoltam és elemeztem. Minden esetben az átlagokat az ÁTLAG függvény, a szórást pedig az STDEV függvény alkalmazásával határoztam meg. Az egyes esetekben alkalmazott statisztikai próbákat pedig a megfelelő helyen feltüntetem a kiértékelés során.

5. Eredmények és értékelésük

Doktori disszertációm keretein belül a fent leírtakat figyelembe véve, két ipari-mezőgazdasági hulladék (paradicsom növényi maradvány (szár és levél, PNM), valamint juh (JBT) és szarvasmarha bendőtartalom (SZBT)) biogáz termelésre való alkalmasságát vizsgáltam meg. Ezeknek a hulladékoknak a fermentációja során feltérképeztem a bontásban szerepet játszó mikrobiális közösségeket, illetve vizsgáltam azt, hogy az egyes nyersanyagok miként befolyásolják a fermentációt, illetve a gázképződést.

5.1. A PNM anaerob fermentációja

A kísérleteim során célom volt, hogy megvizsgáljam a paradicsom termés leszüretelését követően, valamint a növény kaccsolása során keletkező, hulladékként visszamaradó PNM alkalmas-e biometán képzésére, valamint az alkalmazása során az milyen hatással van a fermentációban résztvevő mikrobiális közösségre, valamint magára a fermentációra. A növényi maradványokat szárított formában a Szegedi Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Növénybiológiai Tanszékének munkatársa, Dr. Szepesi Ágnes biztosította számomra.

5.1.1. A PNM szén-, nitrogén, TS és oTS tartalmának meghatározása

Munkám megkezdésekor jellemeztem az alkalmazni kívánt nyersanyagok különböző fiziko-kémiai paramétereit. Tekintve, hogy ilyen hulladékok csak limitált mennyiségben állnak rendelkezésre, valamint időszakosan, így kísérleteimet úgy terveztem meg, hogy a PNM-t mind mono-, mind kofermentációs szubsztrátként is vizsgálni tudjam. Kofermentációs szubsztrátként a PNM mellé a kukoricaszárat (KSZ) választottam. A kukoricaszár, mint hulladék maga is hasonló fiziko-kémiai paraméterekkel rendelkezik, mint az általunk vizsgálni kívánt PNM, valamint széleskörű szakirodalma van.

Először is meghatároztam a PNM, valamint a KSZ szén- és nitrogén tartalmát, azok szén/nitrogén (C/N) arányát, szárazanyag (TS), valamint szerves szárazanyag (oTS) tartalmát. Az eredmények birtokában megtudtam állapítani, hogy a PNM alkalmas-e biogáz termelésre, illetve, hogy a PNM és a KSZ milyen arányú keverése fog olyan kofermentációs szubsztrátot (KOF) eredményezni, amely a fermentáció szempontjából ideális C/N aránnyal rendelkezik. A szakirodalmi adatok alapján a fermentáció ugyanis akkor a leghatékonyabb, ha ez az arány 20-30 közötti értéket mutat. Emellett a PNM időszakosan fordul csak elő nagyobb mennyiségben, így érdemes azt inkább kofermentációs szubsztrátként alkalmazni egy olyan alapanyaggal, mely nagyobb mennyiségben áll a rendelkezésre, mint pl. a KSZ. A mért

eredményeket az alábbi táblázat szemlélteti, mely már tartalmazza a megfelelő arányú keverést követően létrejött KOF szubsztrát értékeit is.

	TS (%)	oTS (%)	szén tartalom (%)	nitrogén tartalom (%)	C/N arány	méret [mm]
KSZ	92,80±0,25	91,10±0,32	44,02±1,31	1,1±0,03	39,88±0,08	<2
PNM	92,12±0,12	83,74±0,05	37,27±0,34	1,77±0,05	21,09± 0,77	<2
KOF	92,18±0,13	88,05±0,40	41,03±0,94	1,46±0,21	28,46±3,29	<2

2. táblázat

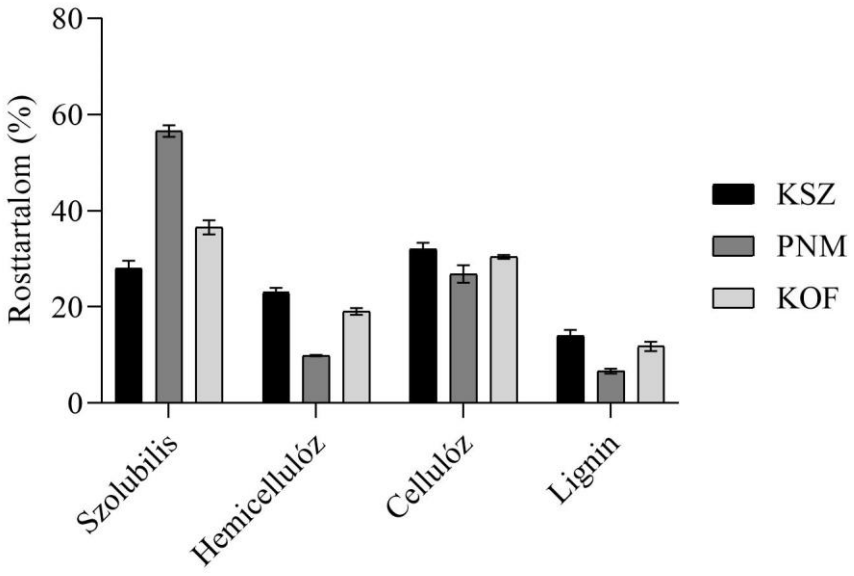
A felhasznált szubsztrátok jellemzői

(kukoricaszár (KSZ), paradicsom növényi maradvány (PNM), és a kofermentációs szubsztrát (KOF)) paraméterei. Szárazanyag tartalom: TS, szerves szárazanyag tartalom: oTS.

A mért értékek alapján megállapítható, hogy a PNM megfelelő C/N aránnyal (21,09± 0,77) rendelkezik a fermentáció szempontjából, így az monoszubsztrátként alkalmazható anaerob fermentációban. Figyelembe véve a KSZ és a PNM szén és nitrogén tartalmát, valamint azok TS, és oTS tartalmát, azokat 0,7:0,3 arányban (KSZ:PNM) keverve, egy olyan kofermentációs szubsztrát nyerhető, melynek C/N aránya szintén ideális a fermentációhoz (28,46±3,29). Mindezeknek megfelelően a következő kísérleteimet KSZ, PNM és KOF nyersanyagok alkalmazásával végeztem el.

5.1.2. A KSZ, a PNM és a KOF cellulóz, hemicellulóz és lignin tartalmának meghatározása

Az anaerob emésztés során egy szubsztrát emésztését jelentősen képes befolyásolni annak szolubilis-, cellulóz-, hemicellulóz- és lignin tartalma. Bár a lignin bontása jellemzően aerob folyamat (peroxidáz, lakkáz enzimekkel) [171], azonban jelenléte egy szubsztrátban mégis képes annak emészthetőségére hatással lenni, ugyanis olyan fizikai gátat képes eredményezni, mely jelentősen megnehezíti a mikroorganizmusok, valamint azok enzimeinek cellulózhoz, valamint hemicellulózhoz való hozzáférhetőségét, tekintve, hogy térhálós szerkezetével körülfonja azokat. Emiatt szükséges volt mindhárom szubsztrát rostanalízisét végrehajtani, melyet a Van Soest féle módszer segítségével végeztem el [152]. A mért eredményeimet az alábbi, 9. grafikon szemlélteti.



9. ábra

Az alkalmazott nyersanyagok rostösszetétele a Van Soest módszer alapján [172]

KSZ: kukoricaszár, PNM: paradicsom növényi maradvány, KOF: kofermentációs szubsztrát

A rostanalízis alapján megállapítható, hogy a PNM szolubilis tartalma mintegy kétszerese, valamint hemicellulóz és lignin tartalma pedig fele annyi, mint a KSZ-é, cellulóz tartalmuk pedig közel megegyezik. A PNM alacsonyabb lignin és hemicellulóz tartalma, párosulva annak magasabb szolubilis tartalmával könnyebb hozzáférhetőséget és emészthetőséget jelez előre. A KOF ugyanezen értékei megfelelnek a keverési arány mértékének. A mért értékek alapján elmondható, hogy a PNM és a KOF is igen ígéretes nyersanyagnak tűnik biogáz előállításra, hiszen az alacsonyabb lignintartalom és magasabb szolubilis tartalom alapján ezeknek a nyersanyagoknak a biodegradációja várhatóan egyszerűbb és hatékonyabb, mint a KSZ lebontása.

Annak érdekében, hogy igazoljam ezen feltevésünket, szakaszos üzemű fermentációs kísérleteket terveztem és hajtottam végre.

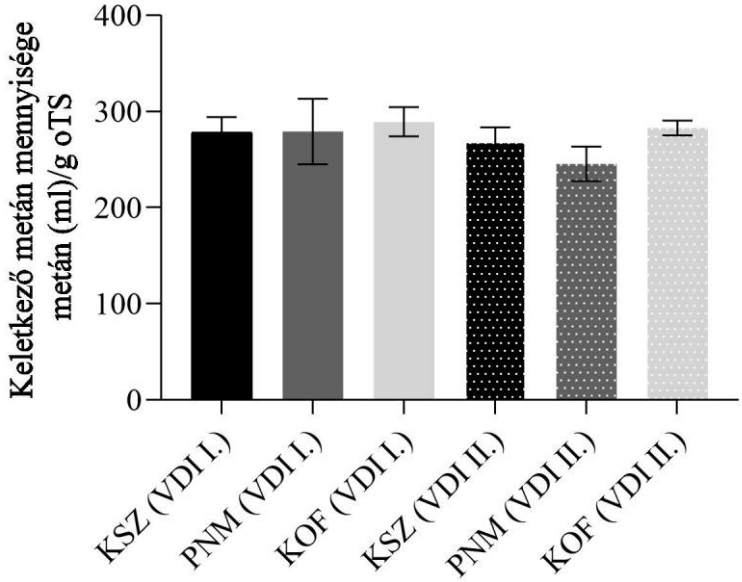
5.1.3. A KSZ, a PNM és a KOF szakaszos üzemű fermentációja

Amennyiben egy új nyersanyag biogáz előállításra való alkalmazhatóságát szeretnénk vizsgálni, először szakaszos üzemű fermentációt szokás végrehajtani. Ennek révén megállapítható az adott nyersanyag BMP értéke , azaz, hogy a vizsgált nyersanyag egységnyi szerves anyag tartalmából mennyi metán képződik. A BMP érték megállapítására számos

nemzetközi szabvány létezik, melyek közül a Biotechnológiai Tanszéken a VDI 4630-as szabványt követjük.

Ezekben a kísérleteimben teszteltem, hogy a PNM, valamint a KOF milyen BMP értékkel rendelkezik a pozitív kontrollként alkalmazott KSZ-val összehasonlítva. A kísérletet elvégeztem egyszeres (VDI I) és kétszeres (VDI II) szervesanyag terhelés mellett is.

A kumulatív metánhozamokat (30 nap) az alábbi, 10. ábra szemlélteti:



10. ábra

Az alkalmazott nyersanyagok BMP értékei a VDI I-es és VDI II-es szabvány alapján.

KSZ: kukoricaszár, PNM: paradicsom növényi maradvány, KOF: kofermentációs szubsztrát.

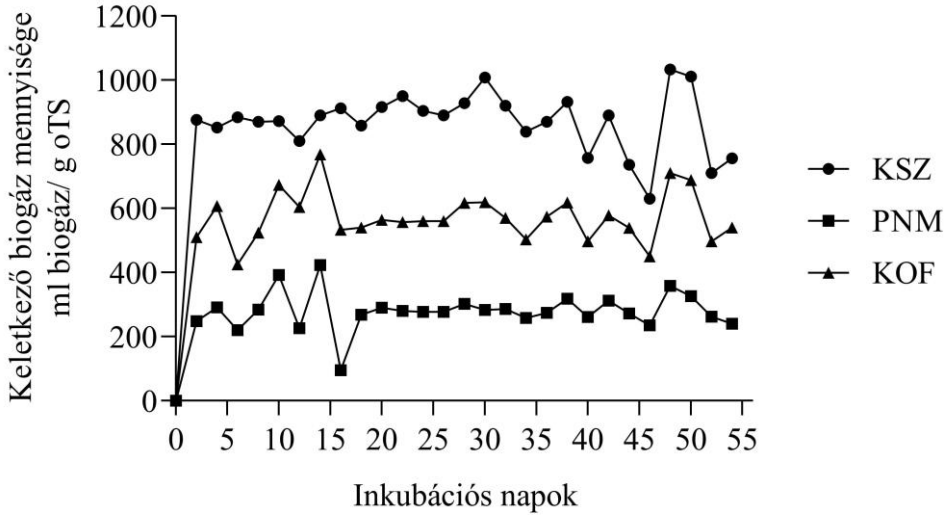
A 10. ábrán jól látszik, hogy a PNM és a KOF is éppen ugyanakkora BMP-val rendelkezik, mint a kontrollként alkalmazott KSZ, mind egyszeres és mind kétszeres nyersanyag bevitel mellett is. A statisztikai analízis alapján (Dunnett teszt, $n=3$, $p \leq 0,05$) egyik szubsztrát sem mutatott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest, akár a VDI I-es, akár a VDI II-es szabvány alapján állítottam össze a fermentációt. Ezen eredményeim alapján megállapítható, hogy a PNM, mind mono-, mind pedig koszubsztrátként (kukoricaszárral) alkalmazva igen ígéretes nyersanyag biometán előállítására.

Fontos megjegyezni, hogy a fermentáció első öt napjában a PNM-ből keletkező metánmennyiség magasabb értéket mutatott, mint a KSZ-ból keletkező, mely a PNM magasabb szolubilis tartalmából, valamint alacsonyabb lignin tartalmából eredhet.

5.1.4. A KSZ, a PNM és a KOF folyamatos üzemű fermentációja

Folyamatos üzemű fermentációs kísérletet állítottam össze, hogy a PNM fermentációra gyakorolt, hosszú távú hatását vizsgálni tudjam. Ezekben a kísérletekben KSZ-t, PMN-t és KOF-t alkalmaztam nyersanyagként és napi szinten követtem nyomon a keletkező biogáz mennyiségét, valamint annak metántartalmát. Emellett heti rendszerességgel monitoroztam a fermentáció szempontjából fontos paramétereket, mint a pH, ammónium-ion koncentráció, FOS/TAC érték, melyek mindegyike a fermentáció működéséről nyújtanak információt számunkra.

Ezeket a kísérleteimet a 4.1.2-es fejezetben leírt 5 literes fementorokban végeztem el, ahonnan a fentebb leírt paraméterek méréseihez napi, illetve heti mintavételt végeztem 8 héten keresztül (56 nap). A mintavételezést és adatgyűjtést egy 3 hetes adaptációs időszak előzte meg, mely során az egyes fermentorokban lévő oltóiszap mikrobiális közösségét adaptáltattam az egyes nyersanyagokhoz. A vizsgálati periódus alatt kapott eredményeimet a következő grafikon szemlélteti:



11. ábra

A folyamatos üzemű fermentorok napi biogáz termelése

A folyamatos üzemű fermentáció nyersanyagai KSZ: kukoricaszár, PNM: paradicsom növényi maradvány, KOF: kofermentációs szubsztrát. oTS: szerves szárazanyag tartalom.

A 11. ábrán jól látszódik, hogy a PNM, mind mono-, mind KOF szubsztrátként alkalmazva a

biogáz termelés jobbára elmaradt a kontroll, KSZ fermentációjához képest. A FÜFKSZ (folyamatos üzemű fermentor kukoricaszárral etetve), a FÜFPNM (folyamatos üzemű fermentor paradicsom növényi maradvánnyal etetve) és a FÜFKOF (folyamatos üzemű fermentor kofermentációs szubsztráttal etetve) esetében 860±80 ml, 290±50 ml, és 570±70 ml/g oTS volt az átlagos napi biogáz hozam (11. ábra). A FÜFKSZ-hez hasonlítva a FÜFPMN mintegy 66,3%-os, a FÜFKOF, mintegy 33,72%-os csökkenést mutatott a biogáz termelés tekintetében. Statisztikai analízis alapján az egyes szubsztrátokkal etetett fermentációk napi biogáz hozamai között szignifikáns különbség mutatkozik (Dunnett teszt, n=56, $p \leq 0{,}0001$). Az egyes reaktorokban termelődő biogáz metántartalmai a következők voltak: 46,01±3,56% (FÜFKSZ), 46,91±3,77% (FÜFPNM), 48,10±3,96% (FÜFKOF).

Megállapítható tehát, hogy folyamatos üzemű fermentációban a PNM negatív hatással van a keletkező biogáz mennyiségére, amely ellentmond mind a saját szakaszos üzemű kísérleteimben kapott eredményemmel, mind egy korábbi publikációban leírt – szintén szakaszos üzemű fermentációkban kapott - eredménnyel [82]. Érdekes azonban az a tény, hogy az egyes fermentációs paraméterek (pH, FOS/TAC, ammónium ion koncentráció) minden egyes héten és minden egyes fermentor esetén határértéken belüli, sőt közel optimális értékeket mutattak. A pH 7,20-7,92 közötti, a FOS/TAC 0,1-0,3 közötti értékeket mutatott, míg az ammónium-ion koncentráció nem volt magasabb, mint 1,2 g/liter. Az eltérő PNM-mel etetett fermentációk gáztermeléseiben megmutatkozó különbség feltehetően a PNM-ben található valamely egyéb komponens miatt következhetett be.

Szakirodalmi adatok alapján a PNM tartalmaz antimikrobiális anyagokat, mint pl.: flavonoidokat, fenolokat, vitaminokat, glükoalkaloidokat (tomatin, tomatidin) [88–90]. A PNM folyamatos adagolása (ezáltal a potenciálisan antimikrobiális hatású bioaktív anyagokénak is) befolyással lehet a fermentációban résztvevő mikrobiális közösségre.

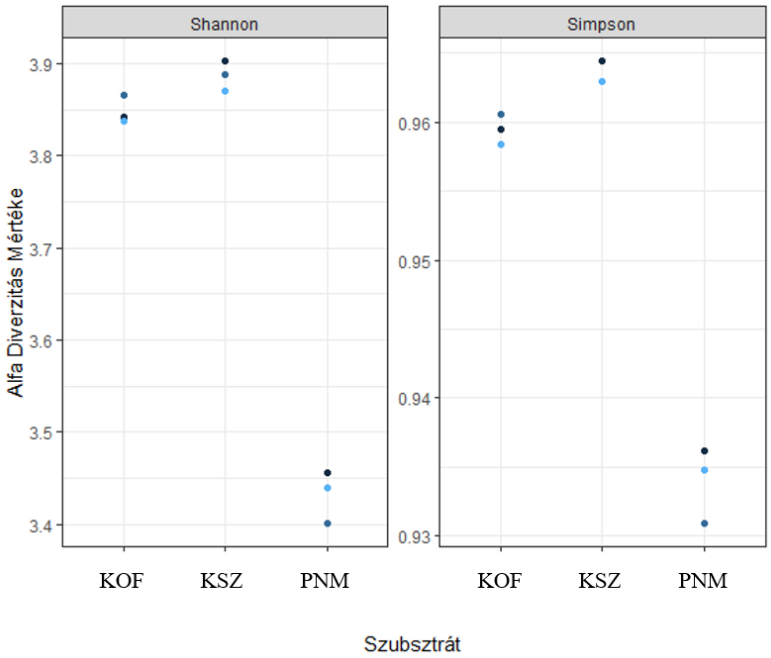
A fermentáció 40. napján, amikor az egyes fermentációs paraméterek alapján a fermentáció stabilan működött, mintát vettem 16S amplikon szekvenálás céljából, hogy megállapítsam, a PNM alkalmazása milyen hatással volt a mikrobiális közösségre.

Metagenom szekvenálás

A fermentációban résztvevő mikrobák azonosítása 16S rRNS gén alapú metagenom szekvenálással történt. Mintát vettem a fermentorból az adaptációs időszak végét követő 40. napon (11. ábra).

A szekvenálást és a readek minőségi és mennyiségi analízisét követően megállapítottam az egyes fermentorokból származó minták alfa-diverzitását. Az egyes minták Shannon és

Simpson indexeit bioinformatikai módszerekkel határoztam meg, melyek a fajok előfordulási gyakoriságát és egyenletességét jellemzik [173]. Ezeket az alábbi, 12. ábrán mutatom be.



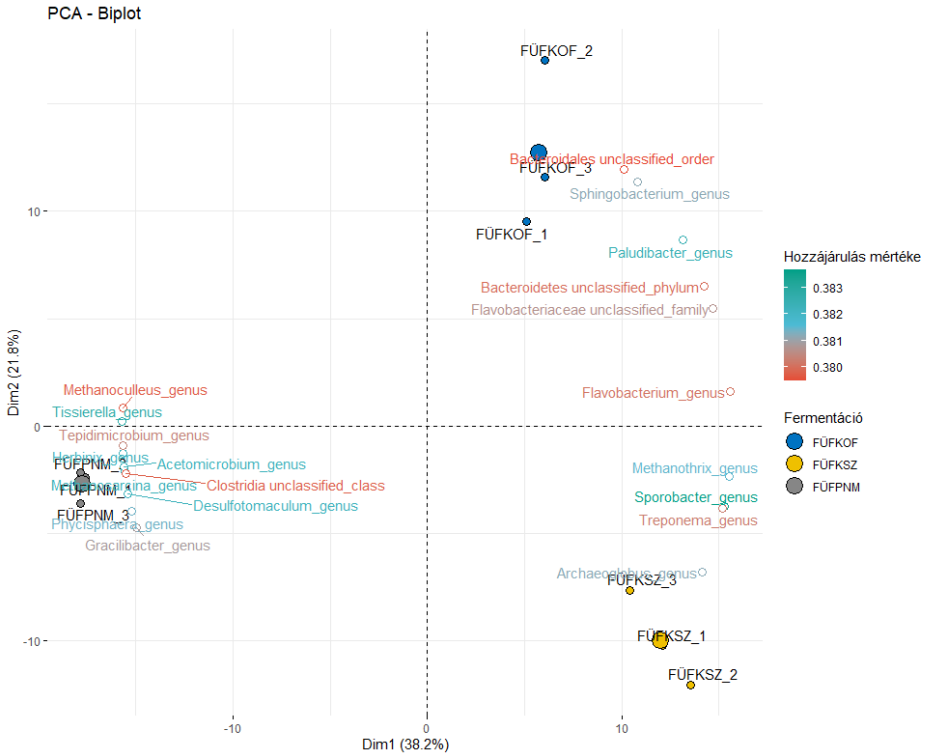
12. ábra

Az egyes fermentorok Shannon és Simpson indexei

Az egyes nyersanyagok esetében az eltérő színű pöttyök a technikai párhuzamosokat jelölik

A kalkulált indexek alapján a FÜFPNM minták diverzitás indexei jóval alacsonyabbak, mint a FÜFKSZ és FÜFKOF mintákéi. A PNM önmagában alkalmazva drasztikusan lecsökkentette a mikrobiális diverzitást. A FÜFKOF minták esetén, ahol a fermentációba mind PNM, mind KSZ nyersanyag is beadagolásra került, a diverzitás indexek magasabbak voltak, mint FÜFPNM minták esetén. Ezen elemzési eredmények valószínűsítik azt, hogy a PNM antimikrobiális összetevőket tartalmaz.

Annak érdekében, hogy a PNM hatását a mikrobiális közösségre még alaposabban meg tudjam vizsgálni, a mikrobiális közösségek főkomponens analízisét hajtottam végre (Principal Component Analysis, PCA), melyet az alábbi 13. ábra szemléltet.



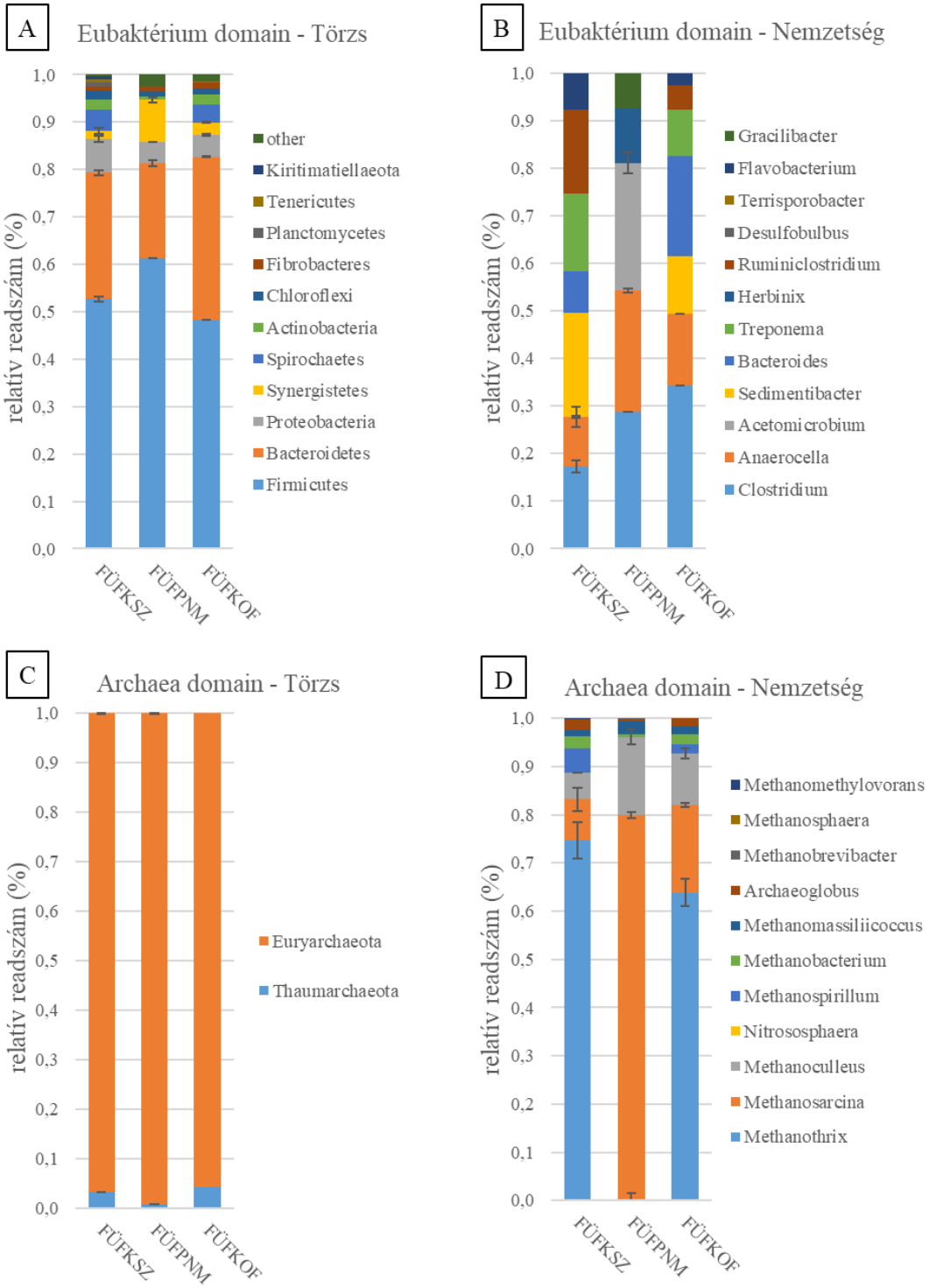
13. ábra

Az egyes nyersanyagokkal etetett fermentorokból származó minták metagenomikai elemzésének főkomponens analízise (PCA)

A nagyobb színes pöttyök a 3 technikai párhuzamos átlagát jelölik.

A két tengely a teljes variancia 60%-át magyarázza. Az első tengely 38,20%-át, a második tengely 21,80%-át magyarázza a változásoknak. A különböző nyersanyagok fermentációjának mikrobiális közösségei jól elkülönülő csoportokat alkotnak, a párhuzamos minták viszont közös csoportokat hoztak létre. A KOF anaerob emésztésének mikrobiális közössége közelebb helyezkedik el a kontrollhoz (KSZ), mint a PNM fermentáció mikrobiomja. A PCA eredmények szintén alátámasztották, hogy a PNM önmagában alkalmazva jelentősen, míg kofermentációs szubsztrátként alkalmazva kis mértékben ugyan, de befolyásolja a mikrobiális közösséget az anaerob emésztés folyamán.

A fentebb említett elemzések mellett oszlopdiagramon (14. ábra) is szemléltettem a vizsgált fermentorokban leggyakrabban előforduló mikroorganizmusokat Eubaktérium és Archaea doménkre bontva, mind törzs, mind pedig nemzetség szinten, hogy részletesebb képet kapjak arról, hogy az esetlegesen feldúsuló, vagy eltűnő mikroorganizmus csoportok milyen funkcióvesztéssel, vagy funkció nyeréssel párosulhatnak az egyes nyersanyagok anaerob emésztése során. Hogy az Archaea domében bekövetkező változásokat is megfelelően ábrázolni tudjam, ezért az Eubaktérium és Archaea domént külön grafikonon tüntettem fel.



14. ábra

Az egyes folyamatos üzemű fermentorok 16S rRNS gén alapú metagenom szekvenálásának eredménye a fermentációk 40. napján

A és B, az Eubaktérium doménhez tartozó readek százalékos megoszlása törzs (A), valamint nemzetség (B) szinten. C és D, az Archaea doménhez tartozó readek százalékos megoszlása törzs (C), illetve nemzetség (D) szinten.

Mindhárom fermentor esetén az Eubaktérium domén volt domináns a következő gyakorisággal: FÜFKSZ 94,97 %, FÜFPNM 94,54 %, FÜFKOF 95,72 %. A különbségek nem szignifikánsak. A legabundánsabb bakteriális törzsek a következők voltak: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Synergistetes, Spirochaetes, Actinobacteria, Chloroflexi és Fibrobacteres (14A. ábra). A 0,7 % gyakoriságot el nem érő törzsek összesítve, „egyéb" jelzéssel kerültek feltüntetésre a diagramon. Korábbi publikációk alapján ezekről a bakteriális törzsekről elmondható, hogy általánosan előfordulnak különböző anaerob emésztő rendszerekben, többek között biogáz reaktorokban [174]. Mindhárom reaktorból származó minta esetén a Firmicutes és a Bacteroidetes törzsek voltak a leggyakoribbak, azonban relatív readszámuk minden minta esetén eltérő volt. A FÜFKSZ minták esetében az összes read 52,7%-a, FÜFPNM esetében 61,3%-a, FÜFKOF esetében pedig 48,3%-a tartozott a Firmicutes törzshöz. A második leggyakoribb törzs (Bacteroidetes) ezzel ellentétes trendet mutatott, ugyanis a FÜFKSZ (26,7%) mintákhoz hasonlítva a FÜFPNM-es (20,0%) mintákban 6,7%-val csökkent, míg a FÜFKOF-os (34,3%) mintákban 7,7%-val nőtt az ezekhez a törzsekhez tartozó relatív readszám. A Synergistetes törzs esetén egy növekvő tendencia volt megfigyelhető. A FÜFKSZ-ból származó mintákhoz viszonyítva (1,7%) az ebbe a csoportba tartozó mikroorganizmusok előfordulása 1,46-szorosára (FÜFKOF, 2,6%), valamint 5,14-szeresére (FÜFPNM, 8,9%) nőtt. A Synergistetes törzs tagjairól korábban már leírták, hogy polipeptideket, illetve szerves savakat képesek fermentálni ecetsavvá, hidrogénné és szén-dioxiddá, valamint képesek szintrófikus kapcsolatot kialakítani hidrogenotróf metanogén törzsekkel [175,176]. A növekedés magyarázható a PNM magasabb nitrogén, így valószínűleg magasabb fehérje tartalmával (2. táblázat).

A törzs-szintű elemzés mellett nemzetség szinten is végrehajtottam az összehasonlítást (14B. ábra), hogy funkciókat is tudjak társítani az esetlegesen eltűnő, vagy megjelenő mikrobákhoz. Nemzetség szinten azon mikroba csoportok, melyek relatív readszáma nem érte el a 3%-ot, azokat a könnyebb átláthatóság érdekében „egyéb"-ként tüntettem fel. A PNM, mint monoszubsztrát az alábbi nemzetségek előfordulására volt legnagyobb hatással: *Clostridium* (Firmicutes), *Anaerocella* (Bacteroidetes), *Acetomicrobium* (Synergistetes), *Herbinix* (Firmicutes) *és Gracilibacter* (Firmicutes). A FÜFPNM mintákban a FÜFKSZ mintákhoz hasonlítva a *Clostridium* nemzetség előfordulása 1,88-, az *Anaerocella* 2,80-, az *Acetomicrobium* 14,00-, a *Herbinix* 6,00-, a *Gracilibacter* 3,86-szorosára emelkedett. A következőkben ezeknek a nemzetségeknek a jellezmő metabolikus funkciókat ismertetem a szakirodalom alapján.

A *Clostridium* nemzetség tagja az anaerob emésztés hidrolízis, acetogenezis és acidogenezis szakaszában is jelentős szerepet játszhatnak [177,178]. Az *Anaerocella* nemzetségbe tartozó mikrobák elsősorban szénhidrát alapú nyersanyagok lebontásában vesznek részt, azonban a fehérjegazdag nyersanyagok katabolizmusában is fontos szerepet töltenek be. A lebontás eredményeként pedig hidrogént és szerves savakat állítanak elő [178]. Az *Acetomicrobium* nemzetség tagjai képesek fermentálni mind az aminosavakat, mind pedig a különböző szénhidrátokat, ecetsavat és hidrogént előállítva [179]. Mind az *Anaerocella,* mind az *Acetomicrobium* nemzetség előfordulása megnövekedett a PNM alkalmazása esetén, mely magyarázható a PNM, KSZ-hoz képest mintegy 61%-kal magasabb nitrogén tartalmával (2. táblázat). A *Herbinix,* valamint a *Gracilibacter* nemzetségek pedig a szakirodalom alapján különböző szénhidrát monomerekből képesek VFA-kat, valamint etanolt előállítani [180,181]. Azonban fontos megjegyezni, hogy a PNM számos mikroba törzs jelenlétére volt negatív hatással, mint például a *Sedimentibacter* (Firmicutes), *Bacteroides* (Bacteroidetes), *Treponema* (Spirochaetes) *és Ruminiclostridium* (Firmicutes), melyek közül kiemelendő, hogy a FÜFPNM mintákban a *Ruminiclostridium* nemzetség teljesen eltűnt. A FÜFKOF mintákat figyelve megállapítható, hogy a PNM ugyanazokban a nemzetségekben is kifejtette negatív hatását, azonban nem olyan mértékben, mint a FÜFPNM mintákban, mely az alacsonyabb mennyiségben alkalmazott PNM-vel magyarázható. A *Bacteroides* csoport tagjai jól ismert növényi sejtfalbontó mikrobák, a *Ruminiclostridium* nemzetségbe tartozók jól ismert cellulóz-bontók, míg a *Treponema* nemzetség egyes képviselőiről korábban már leírták, hogy növényi poliszacharidok lebontására képesek [182–184]. A *Sedimentibacter* nemzetség tagjai pedig biogáz reaktorok core-mikrobiomjának tagjaiként vannak számon tartva [185]. Mindezeket figyelembe véve a PNM olyan mikrobacsoportok eltűnéséért felelős, melyek fontos szerepet töltenek be a növényi sejtalkotók lebontásában a biogáz fermentáció során, minek következménye lehet a csökkent biogáz képződés.

A *Eubaktérium* domén mellett az Archaea doménben bekövetkező változásokról is szeretnék szót ejteni. Az Archaea domén tagjai 5,03 (FÜFKSZ), 5,46 (FÜFPNM), valamint 4,28%-os (FÜFKOF) gyakorisággal voltak megfigyelhető az egyes mintákban. Törzs szinten vizsgálva az Archaea domént, megállapítható, hogy csak az Euryarchaeota és a Thaumarchaeota törzsek voltak jelen a mintákban (14C. ábra). Ezek közül minden esetben az előbbi a dominánsabb, valamint elmondható, hogy a Thaumarchaeota törzs előfordulása jelentősen lecsökkent a FÜFPNM reaktorban (FÜFKSZ: 3,2%, FÜFKOF: 4,2%, FÜFPNM: 0,7%). Ennek a törzsnek a tagjai számos környezeti mintában fellelhetők, mint például talajban, biogáz reaktorokban,

tengervizekben, édes vizekben, stb. [186,187] és fontos szerepet játszanak a szén és nitrogén globális körforgásában [188].

A mintákban megfigyelhető leggyakoribb Archaea nemzetségeket az 14D. ábra mutatja be. A FÜFKSZ és FÜFKOF minták esetében a *Methanothrix, Methanosarcina* és *Methanoculleus* nemzetségek, míg FÜFPNM minta esetén a *Methanosarcina* és *Methanoculleus* nemzetségek voltak a legdominánsabbak. A FÜFPNM reaktorban a *Methanothrix* csoport szinte teljesen eltűnt, míg a *Methanosarcina* csoport 70,03%-kal, a *Methanoculleus* csoport pedig 10,73%-kal nagyobb gyakoriságot mutatott a FÜFKSZ mintával szemben. A *Methanothrix* fajok acetotróf mikrobák, azaz ecetsavból képeznek metánt [189] és nem képesek metánt termelni szén-dioxidból és hidrogénből [190]. A *Methanoculleus* nemzetség tagja hidrogenotróf metanogének, hidrogén és szén-dioxid felhasználásával állítanak elő metánt [191–193]. A *Methanosarcina* fajok pedig képesek mind acetotróf, mind hidrogenotróf módon metánt előállítani [174]. A fentebb leírtak alapján úgy tűnik, hogy a hidrogenotróf útvonal irányában tolódott el a metánképződés a FÜFPNM reaktorok esetén. Egy korábbi tanulmány rávilágított arra, hogy stresszes környezetben, valamint magasabb oldható szerves anyag tartalom mellett a hidrogénotróf metanogenezis felé tolódik el a metánképződés és a hidrogént hasznosító metanogének elszaporodása figyelhető meg [189].

Összességében elmondható, hogy a PNM, vagy annak valamely komponense jelentősen befolyásolja az anaerob emésztésben résztvevő mikrobiális közösség összetételét, minek következtében a PNM alkalmazása esetén a biogáz képződés elmarad a kontroll fermentációhoz képest.

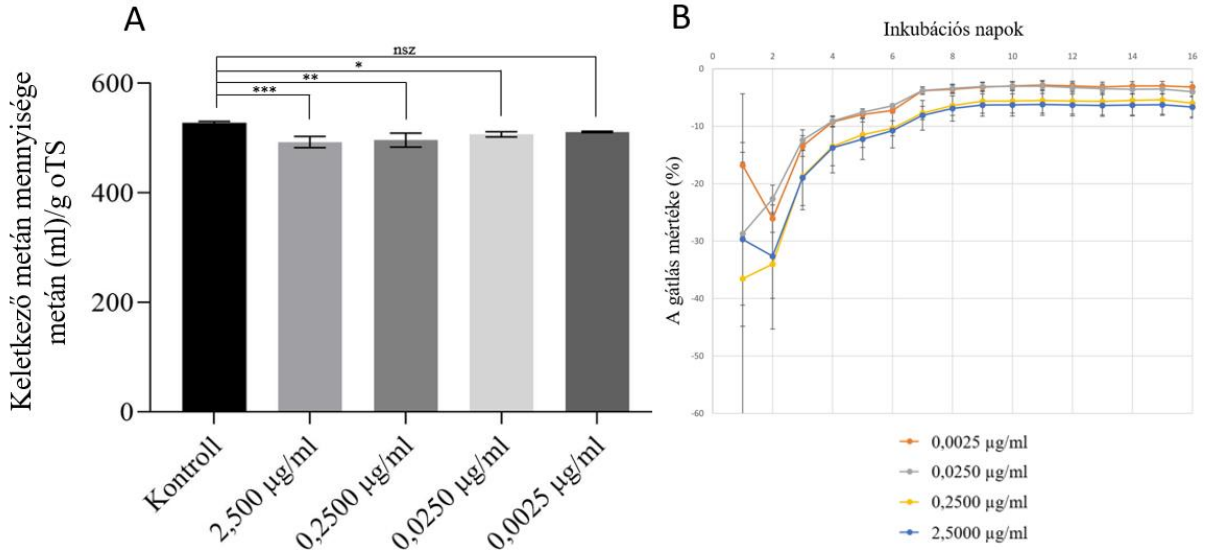
5.1.5. A tomatin és tomatidin hatása a szakaszos üzemű fermentációra

Mind a folyamatos üzemű fermentáció biogáz képződési eredményei, mind a metagenom szekvenálás eredményei (5.1.4. fejezet) alapján elmondható, hogy a PNM tartalmazhat valami olyan komponenst, mely gátolhat egyes mikroorganizmusokat, ezáltal a biogáz képződés folyamatát is. Szakirodalmi adatok alapján a paradicsom növényekben olyan biológiailag aktív molekulák találhatóak meg, mint például fenolok, glükoalkaloidok (pl.: tomatin és tomatidin), melyek közül számos tanulmány rávilágított már arra, hogy például a tomatin és a tomatidin antimikrobiális és antifungális hatással is rendelkezik [88–90]. Mind a tomatin, mind a tomatidin molekula a solanum-szteroid-alkaloidok csoportjába tartozik. Az α-tomatin egy glikoalkaloid, mely áll egy aglikon részből (tomatidin), illetve egy tetraszacharid részből (ß-likotetraóz), mely két glükózból, egy galaktózból és egy xilózból épül fel. Ez a

tetraszacharid rész C3-as pozícióban csatlakozik az aglikonhoz [89,194]. Emellett a paradicsom növény genomjában mostanában fedeztek fel négy potenciális defenzint is, melyek antimikrobiális, antifungális hatását éppen a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Karának Biológia Intézetben vizsgálják (Dr. Poór Péter, Dr. Galgóczi László, Dr Tóth Liliána, személyes közlés).

Mindezek alapján ezek a molekulák befolyásolhatják a biogáz képződését. Annak érdekében, hogy a feltevésemet igazoljam, olyan szakaszos üzemű fermentációs kísérleteket állítottam össze, ahol tomatint vagy tomatidint adtam a reaktorokhoz és vizsgáltam a metánképződést. Mindkét vegyület esetén az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: 0,0025, 0,0250, 0,2500, 2,5000 µg/ml.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a tomatidin egyik koncentrációban sem volt hatással a metánképződésre (ezeket az eredményeimet nem mutatom be), azonban a tomatin igen (15. ábra).



15. ábra

A tomatin hatása a kumulatív metántermelésre szakaszos üzemű fermentációkban

A: Kumulatív metán mennyisége, B: A gátlás mértéke az egyes inkubációs napokon a kontroll fermentációhoz viszonyítva

A grafikon alapján elmondható, hogy a szakaszos fermentorokhoz adagolt tomatin 0,0250, 0,2500 és 2,5000 µg/ml-es koncentrációban negatív hatással volt a metán képződésére. Az ilyen koncentrációkban adagolt tomatin esetén a keletkező metán kumulatív mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, míg 0,0025 µg/ml-es koncentrációban alkalmazva nem

mutatott szignifikáns különbséget a kontroll fermentációhoz képest (Dunnett teszt, n=3, $p \leq 0,05$). Elmondható továbbá, hogy a kísérlet kezdeti napjaiban a negatív hatás erősebb volt, majd az inkubációs napok előrehaladtával folyamatosan csökkent a fermentáció végéig (15B ábra). Feltételezéseink szerint a mikroorganizmusok adaptálódtak a tomatinhoz, vagy a tomatin degradálódik a fermentáció során, mely magyarázná a folyamatos üzemű fermentációban kapott eredményeket is.

Összegzés

Összességében elmondható, hogy a paradicsom növényi maradvány, bár szakaszos üzemű fermentációs eredményeim alapján mind mono-, mind pedig kofermentációs szubsztrátként egy ígéretes biogáz alapanyag, azonban folyamatos üzemű fermentációs kísérleteim alapján mind mono-, mind pedig koszubsztrátként alkalmazva negatív hatással volt a biogáz képződésére. A metagenomikai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy PNM alkalmazása esetén a fermentációban részt vevő mikrobiális közösség jelentős átalakuláson megy keresztül, a biodiverzitás csökken. Szakaszos üzemű gátlást vizsgáló kísérleteim igazolták, hogy a PNM-ben megtalálható glükoalkaloid (tomatin) gátolja a metán képződését. További kísérletek, pl.: a PNM koncentrácó további változtatása, a PNM hőkezelése, folyamatos üzemű fermentáció termofil hőmérsékleten, stb. lennének szükségesek ahhoz, hogy optimalizálni lehessen a PNM biogáz előállításra történő felhasználását. Ezek közül a folyamatos üzemű termofil kísérleteimet bár megkezdtem, azokat sajnos technikai okok miatt nem tudtam befejezni.

5.2. A juh- (JBT) és szarvasmarha bendőtartalom (SZBT) felhasználása biogáz előállítására

5.2.1. A bendőtartalom felhasználása inokulumként

Több tanulmány is kimutatta már, hogy a kérődző állatok bendőjében olyan olyan aktív mikrobiális közösség él, mely nagy hatékonysággal képes a (ligno)cellulóz hidrolízisére, valamint szerves savak előállítására, így akár biogáz képzés fokozására felhasználhatók [106,107].

Ennek megfelelően kísérleteim megkezdésekor célul tűztem ki, hogy olyan hosszú távon fenntartható, a kérődző állatok tápcsatornájából izolált konzorciumot izolálok, melynek inokulumként történő felhasználásával a későbbiekben a biogáz képződés hosszú távon fokozható lenne.

Ezen irányú kísérleteimet juh bendőtartalom vizsgálatával kezdtem meg. A levágott juh bendőtartalmát vágást követően azonnal a laboratóriumba szállítottam és 1:1 térfogatarányban vízzel hígítottam, majd folyamatos üzemű reaktorba helyeztem és folytonos kevertetés mellett 24 órán keresztül, 37°C-on inkubáltam, majd a TS, oTS tartalom meghatározást elvégeztem. A hígításra azért volt szükség, mert anélkül a bendőtartalom a keverőlapát szorulását okozta volna. Ezt a bendőtartalmat felhasználva, első lépésként olyan szakaszos üzemű fermentációs kísérletet végeztem, melyben a bendőtartalom hatását vizsgáltam a biogáz képződésére. Mivel a szakirodalom számos olyan cellulózbontó mikroorganizmust írt már le, mely a növényi rostokhoz tapad, a bendőtartalomnak nem csak a folyadék fázisát használtam fel, hanem a szilárd fázisát is [22].

A kísérlet során néhány esetben csak a bendőtartalmat, néhány esetben csak a sándorfalvi biogáz üzemből származó oltóiszapot, néhány esetben pedig mindkettőt alkalmaztam inokulumként. A reaktorok összeállítás az alábbi, 3. táblázat szerint történt:

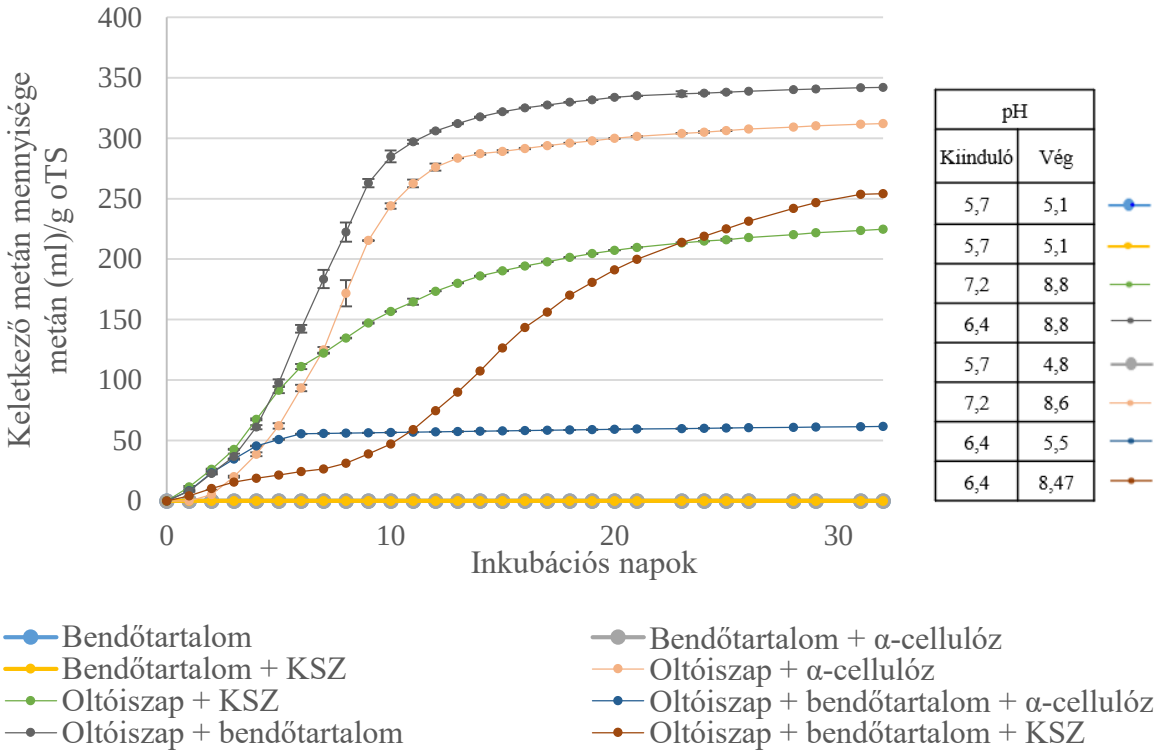
	Bevitt g oTS /40 ml			
	Oltóiszap	Bendőtartalom	KSZ	α-cellulóz
Oltóiszap + KSZ	0,6	0	0,3	0
Oltóiszap + α-cellulóz	0,6	0	0	0,3
Oltóiszap + bendőtartalom + KSZ	0,3	0,3	0,3	0
Oltóiszap + bendőtartalom + α-cellulóz	0,3	0,3	0	0,3
Oltóiszap + bendőtartalom	0,6	0,3	0	0
Bendőtartalom	0	0,6	0	0
Bendőtartalom + KSZ	0	0,6	0,3	0
Bendőtartalom + α-cellulóz	0	0,6	0	0,3

3. táblázat

A szakaszos üzemű fermentációs kísérlet bemenő anyagainak kezdeti összetétele

KSZ: kukoricaszár, oTS: szerves szárazanyag tartalom.

A reaktorokban keletkező kumulatív metántartalmakat az alábbi, 16. ábra szemlélteti:



16. ábra

A bendőtartalom BMP értékének tesztelése szakaszos üzemű fermentációban

KSZ: kukoricaszár, oTS: szerves szárazanyag tartalom.

A kontrollként összeállított reaktorok (Oltóiszap + KSZ, valamint Oltóiszap + α-cellulóz) a várt értékeket mutatták. Előbbi esetén a fermentáció végére a keletkező metán mennyisége 224,77, utóbbi esetében pedig 297,02 ml metán/g oTS volt. Abban az esetben amikor csak bendőtartalmat alkalmaztam, oltóiszapot pedig nem (Bendőtartalom, Bendőtartalom + KSZ, Bendőtartalom + α-cellulóz), azokban az esetekben csak minimális metánképződés volt tapasztalható, az is csak az első napokban, azt követően a metánképződés leállt. Azokban fermentációkban, ahol a bendőtartalmat oltóiszappal együtt alkalmaztam (Oltóiszap + bendőtartalom, Oltóiszap + bendőtartalom + KSZ, Oltóiszap + bendőtartalom + α-cellulóz) ott azonban volt megfigyelhető metántermelődés. Oltóiszap + bendőtartalom esetén 342,85; Oltóiszap + bendőtartalom + KSZ esetén 254,19; Oltóiszap + bendőtartalom + α-cellulóz esetén pedig csak 31,35 ml metán/g oTS volt a kumulatív metán mennyisége. Utóbbi esetén a

metánképződés a 4-5 nap környékén megállt. Feltehetően az α-cellulózból keletkező szerves savak felhalmozódása miatt, ugyanis az α-cellulóz könnyebben hasznosítható, mint a KSZ, tekintve, hogy tiszta cellulóz. Az Oltóiszap + bendőtartalom + KSZ összeállítású fermentor esetén pedig kiemelném, hogy egy eltolódott metánképződés volt megfigyelhető a kísérlet kezdeti fázisában. A metánképződés eltolódása a KSZ nehezebb emészthetőségének köszönhető, ugyanis abból ezáltal lassabban képződik szerves sav, így az nem tud felhalmozódni. A legjobb gázkihozatali értéket az Oltóiszap + bendőtartalom minta esetén értem el, ami 342,85 ml metán/g oTS.

Megvizsgálva az egyes reaktorok kiindulási, valamint végponti pH értékeit, megfelelő magyarázatot kaphatunk. A Bendőtartalom, Bendőtartalom + KSZ, Bendőtartalom + α-cellulóz minták esetén már a kiindulási pH érték is igen alacsony volt (5,7), mely a kísérlet végére tovább csökkent (5,1; 4,8; 5,1, a fenti felsorolásnak megfelelően, 16. ábra). Az Oltóiszap + bendőtartalom + α-cellulóz minta esetén bár a kiindulási pH érték (6,4) nem volt túl alacsony a fermentáció szempontjából, azonban a fermentáció végére a pH 5,5-re csökkent. A metántermelés elmaradása, vagy megszűnése (Oltóiszap + bendőtartalom + α-cellulóz) magyarázható az alacsony pH értékkel, ugyanis ilyen alacsony pH-n a metanogének inaktiválódnak, így nincs metánképződés. Ugyanez a tény magyarázza a Bendőtartalom, Bendőtartalom + KSZ, Bendőtartalom + α-cellulóz-os minták esetén is a metántermelés elmaradását.

A fenti eredményeket figyelembe véve igazolást nyert, hogy a bendőtartalom mikroflórája egy igen erős cellulolitikus, illetve savképző potenciállal rendelkezik. Ennek következtében, habár nyersanyag tekintetében a fermentorok egyik esetben sem voltak túlterhelve, mégis több esetben azok savanyodása volt megfigyelhető. Az aktív szerves sav képződés néhány esetben felborította az anaerob emésztés egyes lépései közötti egyensúlyt. Mindezeket figyelembe véve, valamint azt a tényt, hogy hány millió kérődző állatot vágnak le évente (4. táblázat) és abból mennyi hulladék keletkezik, egy olyan koncepciót dolgoztam ki, mellyel a bendőtartalom mikrobiótájának cellolitikus és savképző potenciálja megfelelően kiaknázásra kerül, valamint a nagy mennyiségben keletkező vágóipari hulladék is hasznosításra kerülhet (17. ábra). Kísérleteimben a két leggyakoribb húsipari kérődző állat (juh, szarvasmarha) példáján keresztül mutatom be ezen hulladékok hasznosíthatóságát.

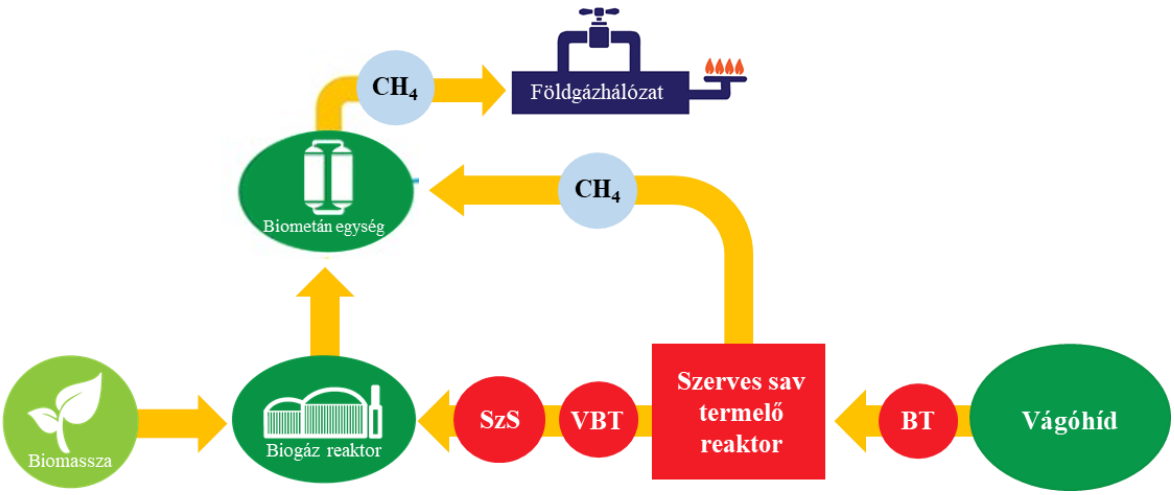
Az intenzív húsipari termelésnek köszönhetően kalkulációim alapján évente mintegy 5,46-7,64 millió tonna (Mt) JBT és 18-36 Mt SZBT keletkezik hulladékként világszerte (2018-as adatok alapján).

	darab/év	élő súly (ÉS), kg	bendőtartalom súlya (ÉS %)	bendőtartalom hulladék (nedves tömeg, kg)	huladék/év (Mt)
juh	573 781 178*	~50**	9-13***	4,5-6,5	2,58-3,73
szarvasmarha	302 128 113*	~500**	9-13***	45-65	13,6-19,6

Bendőtartalom hulladék (nedves tömeg, kg) = élő súly (ÉS), kg × bendőtartalom súlya (%); hulladék/év (Mt)= darab/év × bendőtartalom hulladék (nedves tömeg, kg);
* http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL; ** G.Chishti et al., 2019; *** Moyo et al., 2018

4. táblázat
A vágóipari termelés következtében, hulladékként keletkező juh- és szarvasmarha bendőtartalom mennyiségének becslése

Mint a 4. táblázatból látszik, igen jelentős mennyiségű bendőtartalom hulladék keletkezik a húsipari termelés következtében. Ezen hulladékok lehetséges ipari szintű feldolgozását a 17. ábra szemlélteti.



17. ábra

A juh- és szarvasmarha bendőtartalom, mint hulladék szerves sav-, és biogáz előállításra való felhasználásának sematikus ábrája

BT: bendőtartalom, VBT: visszamaradó bendőtartalom, SzS: szerves savak, CH_4: metán

Koncepcióm alapján a hulladékként keletkező bendőtartalom biogázzá történő átalakítása egy kétlépcsős fermentációban valósulna meg. Első lépésként a hulladék egy olyan gyűjtő reaktorba kerülne (Szerves savtermelő reaktor), melyben a bendő saját mikroflórája előemésztés révén szerves savakat állítana elő (SzS, folyadék fázis), valamint némi metánt a

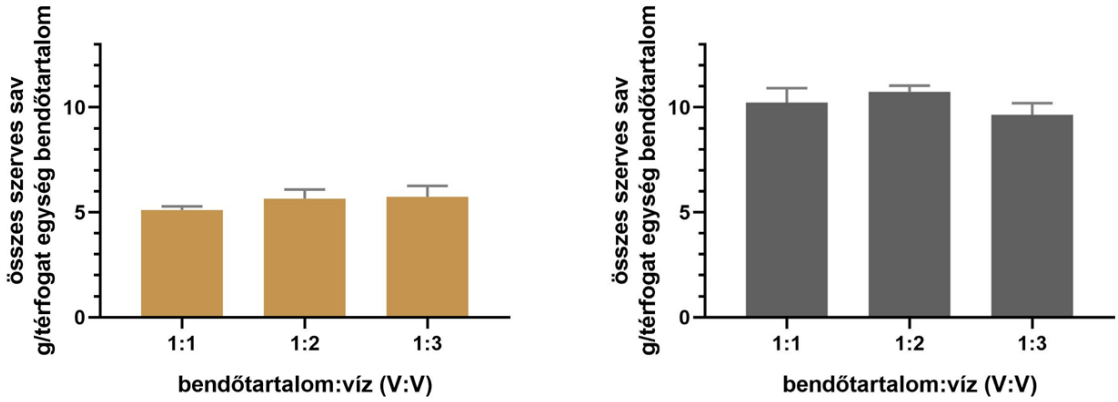
bendőtartalomból, mely a 17. ábra alapján szintén összegyűjtésre kerül. Ezt indokolja az is, hogy a bendőtartalom eljuttatása a biogáz üzembe időt igényel, ami alatt – hűtés nélkül a savasodás gyorsan végbemegy. Hűtéssel a folyamat esetleg gátolható, de komoly energiaigénye van. Ezt követően a második lépésben az előemésztett/visszamaradó bendőtartalom (VBT, szilárd fázis), vele együtt a szerves savak (SzS, folyadék fázis) betáplálásra kerülnének egy normál biogáz reaktorba és metánná alakíthatók lennének. Itt azonban tekintettel kell arra lenni, hogy a két fázis eltérő fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, valamint azok HRT értéke eltérő, így azok csak szeparáltan és/vagy körültekintést igénylő módon juttathatók be a biogáz reaktorba.

A fermentáció két szakaszra (savképző szakasz (előemésztés), metánképző szakasz) történő szeparációja több szempontból is pozitívan befolyásolhatja a fermentációt. Bár mind a bendőben, mind egy biogáz fermentorban optimális esetben ezek a szakaszok nem szeparált környezetben mennek végbe és a két szakasz között egyensúly alakul ki, azonban fontos megjegyezni, hogy a hidrolízis és metánképzés eltérő pH értékeken zajlik optimálisan. Szakirodalmi adatok alapján pedig a bendő endogén mikroflórája olyan mikroorganizmusokat tartalmaz, melyek hatékonyan képesek a növényi poliszacharidokat hidrolizálni, illetve szerves savakat előállítani belőlük [107], mely révén a későbbiekben a biogáz kihozatal fokozható. Mindennek megfelelően olyan kísérletsorozatot állítottam össze, melyben a 17. ábrán látható séma alapján, a juh- és szarvasmarha bendőtartalom optimálisan lenne felhasználható biogáz előállítására.

5.2.2. A bendőtartalmak vízzel történő hígítási mértékének meghatározása

Tekintettel arra, hogy mind a JBT, mind a SZBT TS tartalma igen magas (10-15%), azok kevertetése egy reaktorban igen nehézkes, ezért azt hígítani szükséges. Első lépésként tehát megvizsgáltam, hogy a hígítás mértéke befolyásolja-e a keletkező szerves savak mennyiségét. A cél elérése érdekében a bendőtartalmakat 1:1, 1:2, 1:3 (bendőtartalom:víz) térfogatarányban kevertem vízzel, majd napi szinten nyomon követtem a keletkező szerves savak mennyiségét HPLC készülék segítségével. A hígítások végrehajtását követően a mintáimat 37°C-on inkubáltam 5 napon keresztül, ugyanis korábbi kísérleteimből már megállapítottam, hogy 5 nap alatt minden esetben elértem a maximális szerves sav koncentrációt.

A kísérleteim eredményeit az alábbi ábrákon szeretném bemutatni:



18. ábra

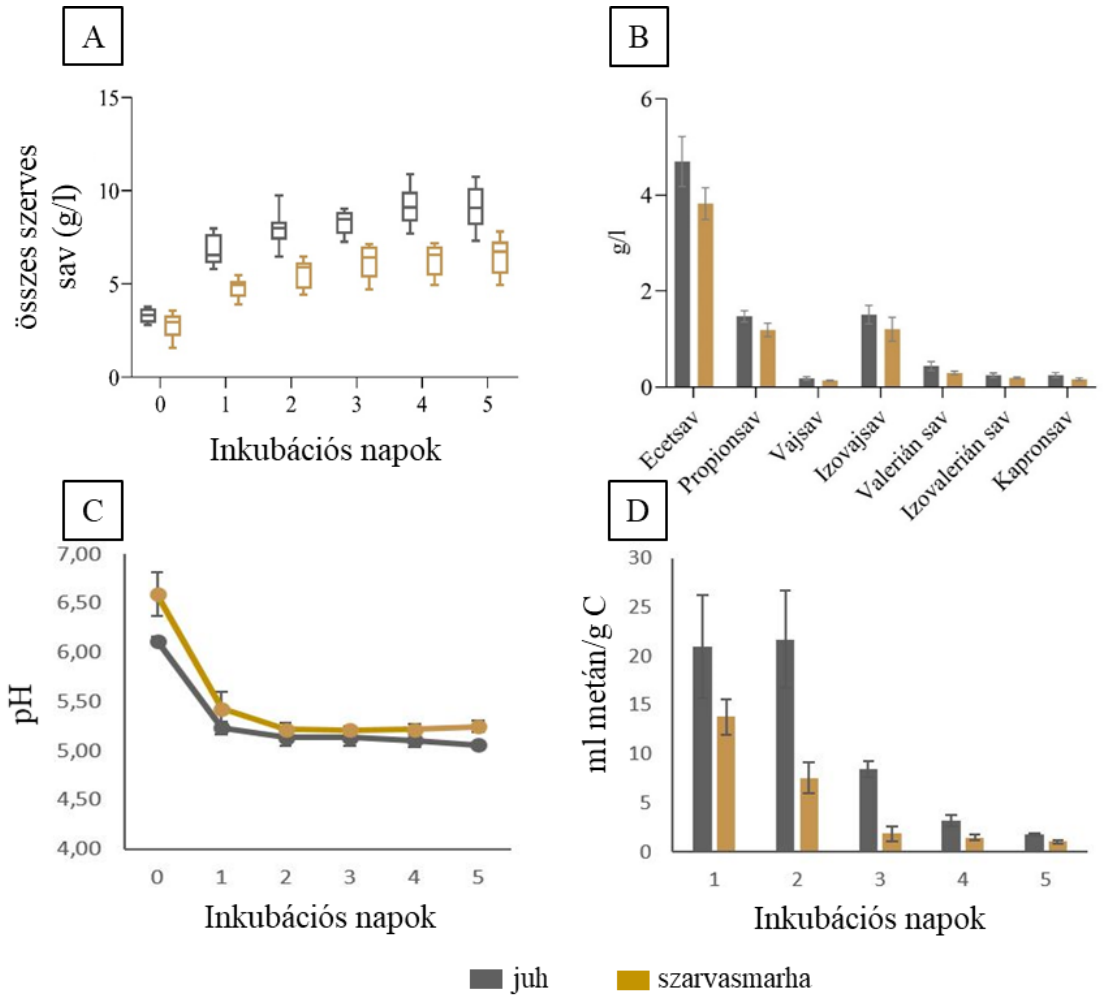
A juh-(szürke), és szarvasmarha (arany) bendőtartalmak szerves savtartalma különféle higításoknál az 5.napon

Az ötödik napra szarvasmarha bendőtartalom esetén az alábbi szerves sav koncentrációkat mértem: 5,11±0,17 (1:1), 5,65±0,44 (1:2), 5,74±0,52 (1:3) g/térfogategység bendőtartalom, míg juh bendőtartalom esetén 10,23±0,68 (1:1), 10,74±0,29 (1:2), 9,65±0,55 (1:3) g/ térfogategység bendőtartalom. A statisztikai elemzés alapján sem a juh-, sem a szarvasmarha bendőtartalom tekintetében, a hígítás mértéke nem okozott szignifikáns különbséget az egységnyi bendőtartalomból keletkező szerves savak mennyiségében (Dunnett teszt, n=3, $p \leq 0,05$). Ennek megfelelően további kísérleteimet minden esetben a bendőtartalom 1:1 térfogatarányú vízzel történő hígításával végeztem el, ugyanis ez környezetvédelmi szempontból előnyösebb a kevesebb vízfelhasználás miatt.

Érdemes azonban megemlíteni, hogy a juh bendőtartalom mikroflórája mindhárom hígításban mintegy kétszer nagyobb mennyiségű szerves savat volt képes előállítani egységnyi térfogatú bendőtartalomból 5 nap alatt, mint a szarvasmarha bendőtartalom. E tény okának kiderítésére a következő kísérleteimet úgy terveztem meg, hogy a szerves savkoncentráció mellett egyéb más paramétereket is tudjak monitorozni, mint pl.: pH, szerves savösszetétel, mikrobiális változás, metánképződés (5.2.3. fejezet). Majd az így keletkező szerves savtartalmú bendőfolyadékot, valamint a visszamaradó bendőtartalmat használtam fel biogáz előállítására (5.2.5. fejezet).

5.2.3. Kétlépcsős fermentáció: Savképző szakasz

Ezeket a kísérleteket az Anyagok és módszerek 4.1.3-as fejezete alapján végeztem el. A kísérletek során mért egyes paraméterek változásait (pH, szerves sav összetétel és mennyiség, metántermelés) a 19. ábra szemlélteti.



19. ábra

A kétlépcsős fermentáció első, savképző szakaszának egyes paraméterei juh- és szarvasmarha bendőtartalom esetén

A, kumulatív, összes szerves sav tartalom a napok függvényében, B, szerves savak megoszlása az 5. napon, C, a fermentorok pH értékének változása napi bontásban, D, a fermentorok napi metántermelése

Mindkét bendőtartalom fermentációjáról elmondható, hogy a szerves savak képződése az első napon megugrik, majd termelődésük fokozatosan csökken az idő előre haladtával (19A. ábra,). Az 5. nap végére juh bendőtartalom esetén az összes szerves savkoncentráció 9,13±1,11 g/l, míg szarvasmarha bendőtartalom tekintetében 6,54±0,99 g/l volt. Statisztikai analízis alapján a napi szerves sav mennyiségekben mutatkozó különbség magyarázható az állatok fajával (n=3, faktor analízis). A termelődött szerves sav profilt vizsgálva (19B. ábra) megállapítható, hogy a két állat között - bár mennyiségi különbség megfigyelhető az összes szerves sav tekintetében, azonban - az egyes szerves savakat tekintve - azok megoszlása a két állat esetén hasonló. Mindkét állat vonatkozásában a legnagyobb mennyiségben ecetsav keletkezett. A növekvő szerves sav koncentráció következtében a fermentlevek pH értéke folyamatosan csökkent (19C. ábra). A 0. naphoz viszonyítva az 5. nap végére juh esetén a pH 6,12-ről 5,06-ra, míg szarvasmarha esetén 6,59-ről 5,25-re csökkent. Ezzel párhuzamosan a fermentorok metántermelése is napról-napra kevesebb volt (19D. ábra), mely magyarázható a fermentáció sav-bázis egyensúlyának savas irányba történő eltolódásával, ugyanis az alacsony pH a metanogének inaktiválódását okozza. A metántartalom vizsgálatakor fontos megjegyezni, hogy ebben az esetben nem a szokásos oTS tartalomra történtő normálást alkalmaztam, hanem széntartalomra normáltam, ugyanis a fermentlevek nagy szerves savtartalma miatt azok oTS értékének meghatározása valótlan eredményekhez vezetett volna, tekintve, hogy a TS, oTS mennyiségének meghatározás során a szerves savak elillannak a mintákból. Mindemellett, a szerves savtermelő lépés reaktoraiból mintákat vettem metagenom analízis elvégzése céljából a 0., 2. és 5. napon, hogy feltérképezzem, mely mikroorganizmusok játsszák a legfontosabb szerepet a szerves savak előállításában mind juh, mindszarvasmarha esetén.

5.2.4. A savképző szakasz mikrobiális közösségeinek vizsgálata

Ezekkel vizsgálatokkal célom volt, hogy a) összehasonlítsam a két állat bendőjének mikrobiális közösségét (0. nap, kiindulási állapot), b) megvizsgáljam a savképző szakaszban bekövetkező változásokat a napok múlásával (0., 2., és 5. napon); c) azonosítsam a mintáimban megtalálható, a növényi poliszacharidok bontásában, valamint az ecetsav képződésben szerepet játszó fehérjéket kódoló géneket.

5.2.4.1. A metagenom szekvenálás alapinformációi

A savtermelő szakasz vizsgálatához az 5.2.2-es fejezet kísérletét vettem alapul. Az 5 nap alatt 3 alkalommal (0., 2. és 5. nap) vettem mintát metagenom elemzéshez, így összesen 18 mintát dolgoztam fel (1-3: juh 0. nap; 4-6: juh 2. nap; 7-9: juh 5. nap; 10-12: szarvasmarha 0. nap; 13-15: szarvasmarha 2. nap; 16-18: szarvasmarha 5. nap). A 18 mintából származó metagenom minták statisztikai eredményeit az alábbi, 5. táblázatban foglaltam össze.

Állat	Inkubációs napok	minták	nyers, párosított readek	vágott, párosított readek	readek hossza (bp)	GC (%)	
						forward	reverz
juh	0.	1	2 641 440	2 174 984	125-151	44	44
		2	2 490 323	2 018 854	125-151	46	47
		3	2 643 082	2 200 966	125-151	46	46
	2.	4	2 444 545	2 031 791	125-151	51	51
		5	2 103 373	1 846 756	125-151	51	51
		6	2 523 219	2 031 789	125-151	51	51
	5.	7	2 626 023	2 158 389	125-151	51	51
		8	2 462 041	1 953 225	125-151	51	51
		9	2 579 572	2 133 175	125-151	49	49
szarvasmarha	0.	10	2 656 272	2 240 100	125-151	50	50
		11	2 482 092	1 520 084	125-151	49	49
		12	2 577 812	2 109 418	125-151	49	49
	2.	13	2 840 238	2 320 968	125-151	50	50
		14	2 813 521	2 296 300	125-151	50	51
		15	2 953 381	2 379 066	125-151	50	50
	5.	16	2 753 681	2 202 905	125-151	50	50
		17	2 739 525	2 244 230	125-151	51	52
		18	2 782 494	2 285 162	125-151	49	49

5. táblázat

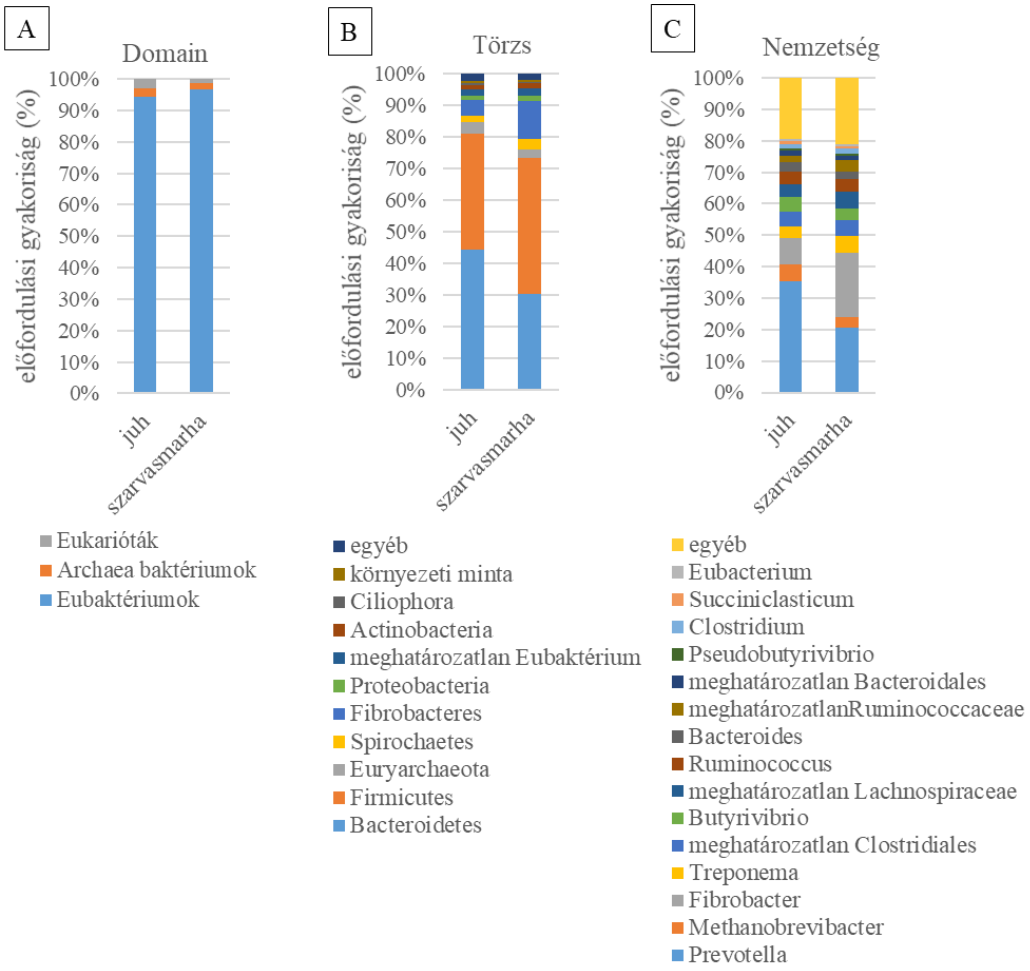
A teljes metagenom szekvenálás egyes mintákra vonatkozó statisztikai paraméterei

A táblázatból jól látszódik, hogy az egyes mintákra jutó nyers readek száma 2 103 373 - 2 953 381 között mozgott. A readek minőségi vágását követően (Anyagok és módszerek 4.2.2. fejezete alapján) az egyes minták elemzése 1 520 084 - 2 379 066 közötti readszám

alkalmazásával történt, melyek mindegyike paired-end read volt, hosszuk pedig 125-151 bázis között változott.

5.2.4.2. A juh és szarvasmarha bendő mikrobiotájának taxonómiai vizsgálata

Kezdő lépésként elvégeztem a juh- és szarvasmarha bendő mikrobiális közösségének összehasonlítását közvetlenül a vágást követően (0. nap; juh: 1-3 minta, szarvasmarha: 10-12 minta), melyet a 20. ábra szemléltet.



20. ábra

A juh- és szarvasmarha bendőtartalom mikrobiális közösségének összehasonlítása a vágást követően

A: Domén szinten, B: Törzs szinten, C: Nemzetség szinten.

A grafikonokon rendszertani kategóriánként csak azokat a mikroorganizmus csoportokat tüntettem fel, amelyek előfordulási gyakorisága elérte a minimum 1%-ot, az ez alatti értékekkel rendelkező kategóriákat „egyéb”-ként tüntettem fel. A 20A ábrán a két állat bendőjének mikroba populációja látható domén szinten. Juh esetén az Eubaktérium domén előfordulási gyakorisága 94,3±0,6%, az Archaea csoporté 2,7±0,7%, míg az Eukarióta csoporté 3±0,4% volt. A szarvasmarhát illetőleg ugyan ezen értékek 96,8±0,1%-nak, 1,9±0,2%-nak, valamint 1,3±0,2%-nak adódtak. Juh tekintetében mind az Eukarióta, mind az Archaea domén előfordulási gyakorisága közel kétszer nagyobb, mint a szarvasmarha mintáké. Az ábra „B” részén a két állat bendőjének mikrobiális közösségét hasonlítottam össze törzs szinten. Mindkét állat bendőjében a leggyakoribb törzsek a következők voltak: Bacteroidetes, Firmicutes, Euryarchaeota, Spirochaetes és Proteobacteria. Összehasonlítva a juhot és a szarvasmarhát, juh tekintetében a Bacteroidetes törzs előfordulási gyakorisága 14,2%-kal, az Euryarchaeota törzsé 1,1%-kal volt magasabb, míg a Firmicutes csoporté 6,8%-kal, a Spirochaetes törzsé 1,0%-kal, míg a Fibrobacteres törzsé 7,1%-kal volt alacsonyabb, mint szarvasmarha esetén. Nemzetség szinten, egymáshoz viszonyítva (20C. ábra) az alábbi mikroba csoportok mutattak 1%-nál nagyobb előfordulási gyakoriságot mindkét állatban: *Prevotella, Methanobrevibacter, Fibrobacter, Treponema, meghatározatlan Lachnospiraceae* és *meghatározatlan Ruminococcacea*. A *Prevotella*, illetve a *Methanobrevibacter* nemzetség előfordulási gyakorisága 14,9%-kal, valamint 1,8%-kal volt magasabb a juh, mint a szarvasmarha bendőben. Ezzel ellentétben a *Fibrobacter* nemzetség 12,0%-kal, a meghatározatlan *Clostridiales* 1,7%-val, a meghatározatlan *Lachnospiraceae* 1,3%-val, míg a meghatározatlan *Ruminococcaceae* 1,5%-val volt magasabb szarvasmarha, mint juh esetén.

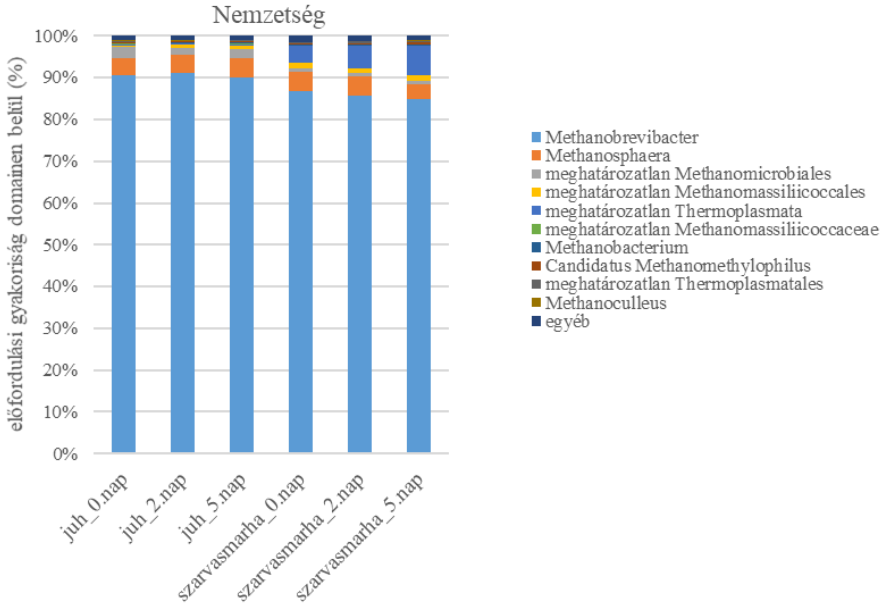
A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy mindkét állat bendőjében a leggyakrabban előforduló mikroorganizmus csoportok azonosak, azonban az állat fajától függően azok előfordulási gyakorisága fajonként változhat kisebb-nagyobb mértékben.

5.2.4.3. A mikrobiota változásai és különbségei a savtermelési szakaszban

A két állat bendőtartalmának összehasonlítása mellett vizsgáltam a savtermelő szakasz 0. (bendő kiindulási állapota), 2. és 5. napján vett minták metagenomikai változásait is, hogy a fermentorokban lezajlódó savtermelésről részletesebb információkat tudjak gyűjteni. Ebben az esetben már az Archaea, Eubaktérium és Eukarióta doméneket külön-külön tárgyalom,

hogy a kisebb abundanciával rendelkező mikroba csoportok változásait is nyomon tudjam követni.

Ennek megfelelően a következő ábrán (21. ábra) a savtermelési szakasz Archaea doménjében bekövetkező változások láthatóak juh és szarvasmarha esetén is, nemzetség szinten. A törzs szinten való bemutatást azért nem tüntettem itt fel, mert minden esetben az Euryarchaeota törzs dominált, magasabb, mint 99%-os előfordulási gyakorisággal.



21. ábra

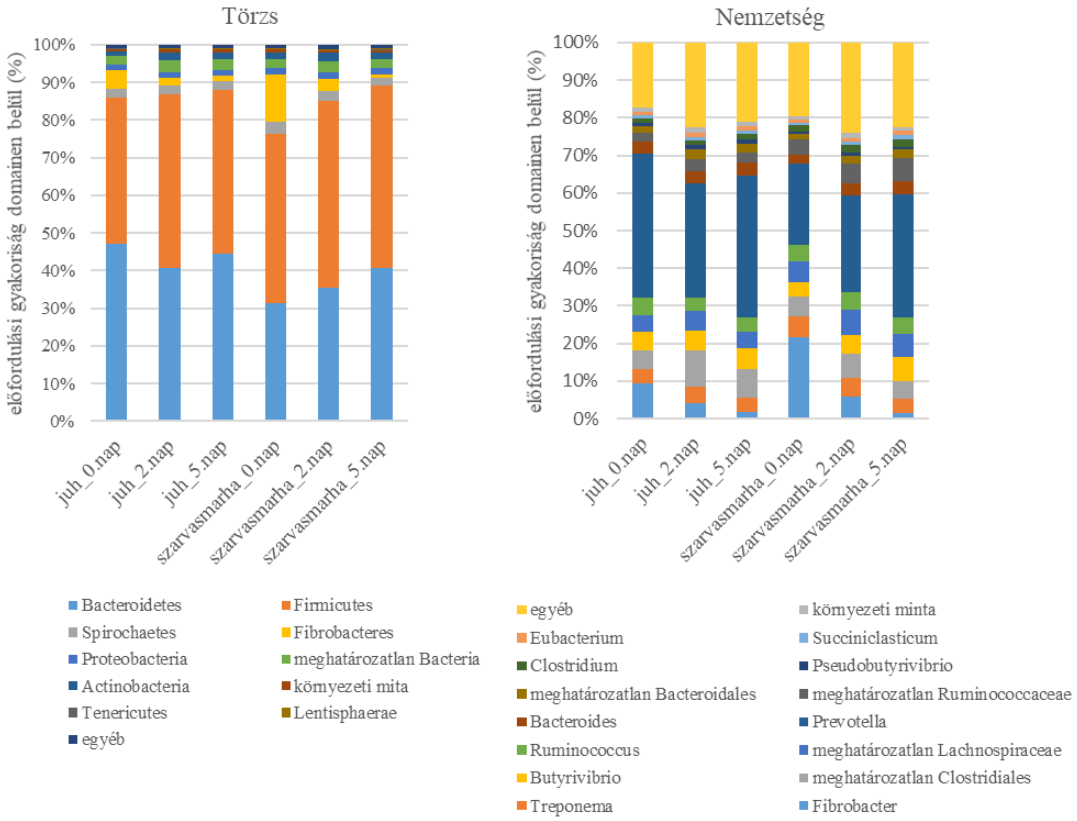
A savtermelő szakasz mikrobiomjának összehasonlítása (Archaea domén) nemzetség szinten, juh- és szarvasmarha bendőtartalom esetén a 0., 2. és 5. inkubációs napokon

Mindkét állat esetében, valamint minden mintavételi napon szinte ugyanazok az Archaea doménbe tartozó mikroba nemzetségek voltak megfigyelhetőek. Az Archaea doménen belül nem voltak jelentős változások juh esetében az inkubációs napok között, azonban szarvasmarha esetén igen. Mind a juhot, mind a szarvasmarhát tekintve a legdominánsabb a *Methanobrevibacter* nemzetség volt. A szarvasmarha mintákban a *Methanobrevibacter* nemzetség előfordulási gyakorisága némileg megváltozott, mintegy 2%-kal csökkent az 5. napra a 0. naphoz képest, míg a viszonylag ismeretlen *Thermoplasmata* törzsek előfordulása az 5. napra 3,2%-kal nőtt. A *Methanobrevibacter* nemzetséget a szakirodalom már korábban leírta, hogy számos gerinces és gerinctelen élőlény tápcsatornájában előfordul és hidrogenotróf metanogenezisre képes [195]. A *Thermoplasmata* csoport tagjait pedig már

kimutatták szarvasmarha bendőben, illetve egyéb környezeti mintákban, melyek pH értéke savasabb karaktert mutatott [196,197].

Figyelembe véve a szakirodalmi adatokat, valamint a reaktorok pH értékében bekövetkező csökkenést, igen meglepő az az eredmény, hogy az Archaea csoport taxonómiai összetétele csak ilyen csekély mértékben változott, annak ellenére, hogy a metántermelés a napok előrehaladtával fokozatosan csökkent. Feltehetően az Archaea domén tagjai a savas környezetben csak inaktiválódtak és nem pusztultak el, ezért mutathatók ki a mintákból még az 5. napon is. Szakirodalmi adatok alapján a metanogenezis bár csökkent aktivitással, de akár pH=4.0 tartományban is megvalósulhat, illetve ez a metántermelés fokozódhat ilyen alacsony pH tartományban, ha a metanogéneknek megfelelő időt biztosítunk az adaptációhoz [198].

Az Archaea domén mellett vizsgáltam az Eubaktérium domében bekövetkező változásokat és különbségeket is, melyeket a 22. ábra szemléltet:



22. ábra

A savtermelő szakasz mikrobiomjának összehasonlítása (Eubaktérium domén) juh- és szarvasmarha bendőtartalom esetén a 0., 2. és 5. inkubációs napokon, törzs, illetve nemzetség szinten

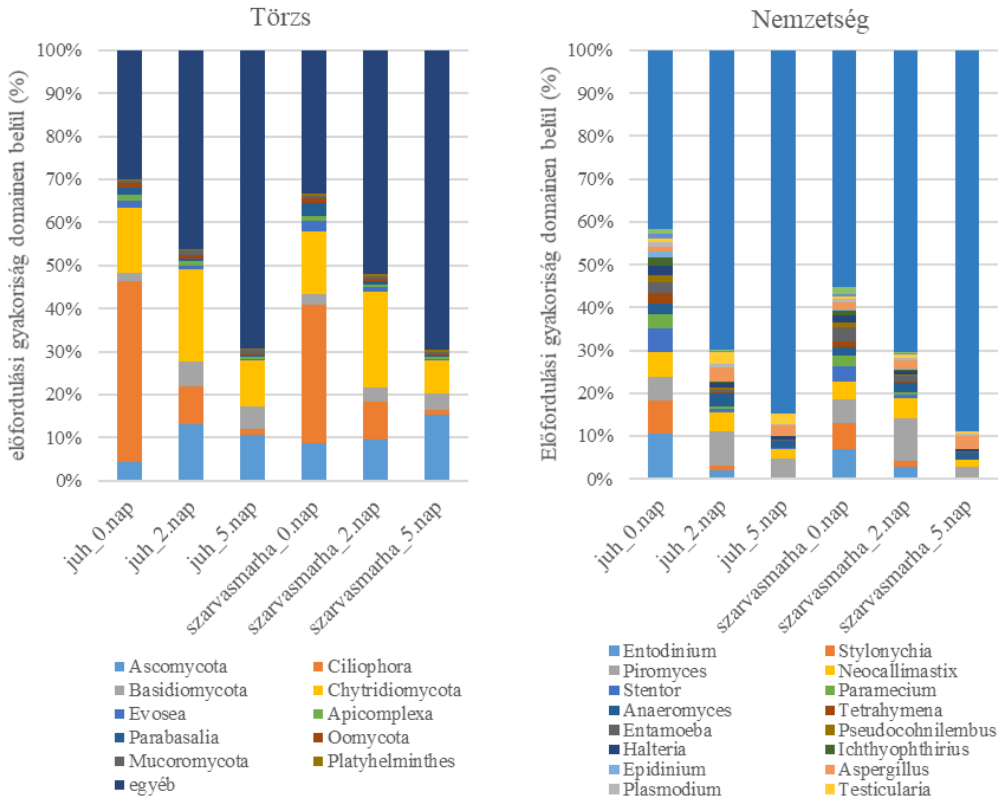
Az elemzésekből megállapítható, hogy mind törzs, mind pedig nemzetség szinten megfigyelhetőek változások mindkét állat tekintetében. Törzs szinten a juh mintákban a Bacteroides, Firmicutes és Fibrobacteres törzsekben, míg a szarvasmarha mintákban ugyan ezek, valamint a Spirochaetes törzs esetén volt 1%-nál nagyobb változás detektálható a 0. és az 5. nap között. A juhot illetőleg a Bacteroides törzs 47,2%-ról 44,7%-ra (2,5%-os csökkenés), a Firmicutes törzs 38,7%-ról 43,5%-ra (4,8%-os növekedés), a Fibrobacteres törzs pedig 5,14%-ról 1,4%-ra csökkent (3,7%-os csökkenés).

A szarvasmarha mintákat elemezve a Bacteroides törzs 9,2%-os (31,4%-ról 40,7%-ra), a Firmicutes törzs 3,6%-os (44,9%-ról 48,5%-ra) növekedést, míg a Fibrobacteres törzs 11,6%-os (12,4%-ról 0,8%-ra), a Spirochaetes törzs pedig 1,3%-os (3,3%-ról 2%-ra) csökkenést mutatott a 0. és az 5. inkubációs napokat összevetve. A legdrasztikusabb változás mindkét állat tekintetében, hogy a Fibrobacteres törzs szinte teljesen eltűnt a mintákból az 5. napra.

Nemzetség szinten juh esetén a *Fibrobacter* (9,31%-ról 1,7%-ra), a meghatározatlan *Clostridiales* (4,9%-ról 7,9%-ra) és a *Ruminococcus* nemzetség (4,7%-ról 3,7%-ra) mutatott 1%-nál nagyobb eltérést a 0. és az 5. nap között, míg a szarvasmarhát illetőleg a *Fibrobacter* (21,7%-ról 1,6%-ra), a *Prevotella* (21,6%-ról 32,6%-ra), a *Butyrivibrio* (4,0%-ról 6,4%-ra), a meghatározatlan *Ruminococcaceae* (3,9%-ról 6,2%-ra), a *Treponema* (5,65%-ról 3,7%-ra) és a *Bacteroides* nemzetség (2,3%-ról 6,2%-ra) populációjában bekövetkezett változások említésre méltóak.

A *Fibrobacter* nemzetségbe jelen tudásunk szerint két mikroorganizmus tartozik, melyek a *Fibrobacter succinogenes*, valamint a *Fibrobacter intestinalis* és mindkettő elsődleges cellulóz-bontóként van számon tartva a növényevő állatok tápcsatornájában [199]. Típustörzse, a *F. succinogenes* S85 pH=5,5 érték alatt nem képes növekedni [200], mely egybevág a mi mérési eredményeinkkel is (19C. ábra, és 22. ábra). A szakirodalom alapján a *Fibrobacter* és *Ruminococcus*, valamint a *Treponema* nemzetség képviselői a növényi poliszacharidok lebontásában játszanak szerepet, mint cellulotlitikus mikroorganizmusok [182,184]. A *Butyrivibrio*, valamint *Prevotella* nemzetség pedig xilanolitikus aktivitással bírnak [201]. A *Clostridium*, illetve *Bacteroides* nemzetségről korábbi tanulmányban igazolták, hogy savtermelésük révén csökkentik a pH-t, ezáltal növelik az adaptív fajok előfordulását és csökkentik a nem adaptív fajokét [202]. Mindent összevetve a hidrolizáló mikroorganizmusok előfordulási gyakorisága az inkubációs napok előrehaladtával csökkent, míg a savtermelő mikroorganizmusok előfordulása nőtt.

Végül, de nem utolsósorban az Eukarióta doménbe tartozó egysejtű organizmusokat is vizsgáltam, melyeket a következő, 23. ábra szemléltet:



23. ábra

A savtermelő szakasz mikrobiótája az *Eukarióta* domében, azon belül is törzs és nemzetség szinten juh- és szarvasmarha bendőtartalom esetén a 0., 2. és 5. inkubációs napokon

A mintáimban számos eukarióta élőlényt sikerült azonosítanom, melyek protozoák és egysejtű gombák. Törzs szinten mind a szarvasmarha, mind a juh mintákban a Ciliophora törzs mutatta a legmagasabb gyakoriságot a 0. napon, mely mindkét állat esetében az 5. napra szinte nullára esett vissza (juh: 42,1%-ról 5,2%-ra, szarvasmarha: 32,3%-ról 3,8%-ra). Emellett megfigyelhető volt az is, hogy az inkubáció előrehaladtával az Ascomycota, valamint a Basidiomycota törzs tagjai nyertek teret.

Nemzetség szinten vizsgálódva megállapítható, hogy az 5. napra csak a gombák között voltak olyan nemzetségek megfigyelhetőek, melyek 1%-nál nagyobb előfordulási gyakoriságot mutattak (*Piromyces, Neocallimastix, Anaeromyces, Aspergillus* és *Testicularia*). Azonban két nemzetség kivételével (*Aspergillus* és *Testicularia*) azoknál is csökkenő előfordulási gyakoriság volt megfigyelhető.

A bendőben található protozoák korábbi adatok szerint a teljes bendő mikroflóra tömegének mintegy 50%-át teszik ki, komplex szénhidrát molekulák degradációjára képesek, végeredményként pedig szerves savakat, szén-dioxidot, laktátot, valamint hidrogént állítanak elő. Emellett pedig baktériumokkal is táplálkoznak [203]. Az irodalmi adatok szerint protozoák mellett a gombák is jelentős mennyiségben vannak jelen a bendőben, ugyanis a bendő mikroflóra tömegének akár a 20%-át is kitehetik. Fibrolitikus enzimeik révén ők is részt vesznek a komplex növényi sejtfalak struktúrájának megbontásában, ezáltal elősegítik a baktériumok számára a növényi poliszacharidok lebontását [203]. Mindezeket figyelembe véve, az inkubációs napok előrehaladtával az eukarióták esetében is visszaesés volt megfigyelhető, miáltal a poliszacharidok lebontása is visszaesett.

A savképző szakasz mikrobiomjának vizsgálata során megállapítást nyert, hogy a fermentáció előrehaladtával a mikrobiális aktivitás következtében a feldúsuló szerves savak a fermentlé pH értékét jelentősen lecsökkentették, minek következtében számos mikroorganizmus - elsősorban poliszacharid bontó mikrobák – előfordulási gyakorisága lecsökkent. Csak azok a mikroorganizmusok voltak képesek teret nyerni, melyek a jóval alacsonyabb pH érték mellett is képesek voltak életben maradni.

5.2.4.4. A savtermelő szakasz mikrobiotájának szénhidrát bontó enzimkészletének vizsgálata

Hogy feltérképezzem a juh-, illetve szarvasmarha bendőtartalom, valamint a fermentáció savtermelő szakaszának poliszacharid bontó aktivitással rendelkező enzimeit, a szekvenálás során kapott readeket, minőségi szűrést követően, az anyagok és módszerek 4.2.2. fejezetében leírtak alapján összeszereltem. Az összeszerelés során kapott statisztikai adatokat a következő, 6. táblázatban foglaltam össze:

Paraméterek	db/bp
kontigok száma	7 485 958
kontigok (>= 1000 bp)	163 562
kontigok (>= 5000 bp)	5 983
kontigok (>= 10000 bp)	1 646
kontigok (>= 25000 bp)	264
kontigok (>= 50000 bp)	42
legnagyobb kontig	121 013
teljes hossz	312 330 308
N50	1 852
N75	1 281
L50	42 241
L75	93 943

6. táblázat

Az összeszerelés során kapott kontigok statisztikai összefoglaló táblázata

Az összeszerelés eredményeként összesen 7 485 958 db kontigot kaptunk, melyből 163 562 db kontig volt nagyobb, mint 1000 bázis. Ezt követően 22 olyan bin-t sikerült összeszerelnem, melyek teljessége meghaladta a 70%-ot, kontaminációja pedig alacsonyabb volt, mint 5%. Az egyes binek statisztikai, valamint egyéb paramétereit az 7. táblázatban mutatom be.

Bin	Taxonómia (GTDB-adatbázis)	Rendszertani kategória	Teljesség (%)	Kontamináció (%)	N50	Teljes méret (Mb)	Binelő program
bin.1	Prevotella sp900315075	faj	94,93	3,01	13683	5,25	binsAC
bin.2	UBA7018 (Selenomonadales)	nemzetség	96,13	2,53	8310	2,64	binsBC
bin.3	UBA3857 (Catabacter)	nemzetség	95,8	1,42	23841	2,44	binsC
bin.4	Ruminococcus_E sp900317315	faj	71,25	1,57	2182	1,51	binsC
bin.5	UBA2922 (Oscillospiracea)	nemzetség	81,26	0,67	12397	1,93	binsAC
bin.6	Ruminococcus_E sp900316555	faj	91,62	0,89	13033	1,73	binsA
bin.7	RC9 sp900321655 (Bacteroidales)	faj	87,74	1,90	7762	2,58	binsC
bin.8	UBA3207 (Bacillales)	nemzetség	96,06	1,17	37510	0,93	binsABC
bin.9	RF16 sp900317745 (Paludibacteraceae)	faj	84,26	0,90	10422	2,16	binsABC
bin.10	Prevotella sp900315455	faj	97,56	1,34	18813	3,99	binsB
bin.11	UBA1407 (Lentisphaeria)	nemzetség	77,68	2,36	2806	3,99	binsC
bin.12	RUG844 sp900313875 (Coriobacteriales)	faj	74,89	3,43	2152	1,16	binsC
bin.13	Prevotella	nemzetség	87,18	2,08	6013	2,47	binsC
bin.14	Prevotella sp900314715	faj	88,43	2,56	5855	3,07	binsAB
bin.15	UBA3663 sp900319235 (Prevotellaceae)	faj	85,66	3,58	6225	2,98	binsAC
bin.16	F082 (Bacteroidales)	nemzetség	83,31	0,38	5059	2,36	binsC
bin.17	Prevotella sp900314935	faj	80,09	1,38	4789	2,37	binsC
bin.18	F082 (Bacteroidales)	nemzetség	74,51	2,46	5958	2,63	binsA
bin.19	RUG420 sp900317085 (Acutalibacteraceae)	faj	88,98	1,06	4736	1,66	binsBC
bin.20	Methanobrevibacter sp900314635	faj	91,67	1,60	4178	1,78	binsC
bin.21	UBA1777 (Oscillospiracea)	nemzetség	74,25	3,02	3993	2,12	binsC
bin.22	Methanobrevibacter	nemzetség	77,86	3,43	2150	1,37	binsC

7. táblázat

A sikeresen összeillesztett binek és azok jellemzői

Az összeszerelés során nyert 22 bin-t a Genome Taxonomy Database (GTDB) alapján rendszertani kategóriákba soroltam. A 22 bin-ből 10-et (2, 3, 5, 8, 11, 13, 16, 18, 21, 22) nemzetség szinten, míg 12-t (1, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20) fajszinten sikerült azonosítanom. Az egyes binek teljessége 71,25 és 97,56% között van, kontaminációjuk pedig minden esetben alacsonyabb mint 3,43%. Méretük 0,93 és 5,25 megabázis közötti, átlagos N50 értékük pedig 9176 bázis. Összességében elmondható róluk, hogy magas és közepes minőségűek [204]. Az azonosított binek közül 6 a *Prevotella* nemzetségbe, 2 a *Methanobrevibacter* nemzetségbe, 2 a *Ruminococcus* nemzetségbe, 3 a Bacteroidales rendbe, 2 az *Oscillospiraceae* családba, 1 a Selenomonadales rendbe, 1 a *Catabacter* nemzetségbe, 1 a Bacillales rendbe, 1 a *Paludibacteraceae* családba, 1 a Lentisphaeria osztályba, 1 a Coriobacteriales rendbe és 1 pedig az *Acutalibacteraceae* családba tartozik.

A *Prevotella* nemzetség képviselői a poliszacharidok széles skáláját képesek hasznosítani a bendőben és mint a xilán hidrolízisében fontos szerepet játszó mikrobák vannak számontartva. Emellett számos GH család jelenlétét is igazolták már a *Prevotella* nemzetség tagjai között [205]. A *Ruminococcus* nemzetség képviselőit korábban már izolálták szarvasmarha bendőből, valamint humán tápcsatornából is. Az ebbe a csoportba tartozó mikroorganizmusok növekedésükhöz fermentálható szénhidrátokat igényelnek [206]. A *Methanobrevibacter* nemzetség tagjait is már számos környezetből izolálták, pl.: gerincesek-, gerinctelenek tápcsatornájából, környezeti mintából, stb. Ezen Archaea doménbe tartozó mikrobák elsősorban hidrogenotróf metanogének, CO_2-t, illetve H_2-t használnak fel a metán előállítására [195]. A Bacteroidales rend tagjai másodlagos poliszacharid bontók, elszaporodásuk akkor figyelhető meg, amikor különböző oligoszacharidok feldúsulnak [207]. Az *Oscillospiracea* családról nem található kielégítő szakirodalom, de elmondható róla, hogy a Clostridiales rendbe sorolható, valamint eredményeim alapján szintén jelentős szénhidrátbontó képességgel rendelkezik, ugyanis 32 szénhidrát aktív enzimet (CAZy) kódoló gént sikerült azonosítani ebben a bin-ben. A Selenomonadales (Negativicutes) szintén szegényes irodalommal bír, de szintén jelentős CAZy génkészlettel rendelkezik eredményeim alapján (69 db gén). A *Catabacter* nemzetség egyik tagjáról kimutatták, hogy ß-glükozidáz aktivitással rendelkezik és képes fermentálni a glükózt, mannózt, arabinózt és a xilózt [208]. A Bacillales rend képviselői gyakorta előfordulnak biogáz reaktorokban és számos biokémiai reakció katalízisére képesek [209].

Az egyes binek-ben elvégeztük a CAZy-ket kódoló gének keresését, hogy feltérképezzük azok (ligno)cellulóz bontó képességét. A 22 bin-ben összesen 1295 CAZy gént sikerült

azonosítani, melyek közül 246 db olyan volt, mely terméke egynél több szénhidrát bontó aktivitással rendelkezett. Az egyes binekben azonosított CAZy gének számát az alábbi, 8. táblázatban foglaltam össze:

binek	taxonómia (GTDB adatbázis)	szénhidrát bontó enzimeket kódoló gének (CAZy) száma	egynél több aktivitás
bin1	Prevotella sp900315075	129	24
bin2	UBA7018 (Selenomonadales)	59	10
bin3	UBA3857 (Catabacter)	40	15
bin4	Ruminococcus_E sp900317315	26	5
bin5	UBA2922 (Oscillospiracea)	30	2
bin6	Ruminococcus_E sp900316555	82	13
bin7	RC9 sp900321655 (Bacteroidales)	82	13
bin8	UBA3207 (Bacillales)	17	7
bin9	RF16 sp900317745 (Paludibacteraceae)	69	17
bin10	Prevotella sp900315455	124	29
bin11	UBA1407 (Lentisphaeria)	88	17
bin12	RUG844 sp900313875 (Coriobacteriales)	7	1
bin13	Prevotella	82	19
bin14	Prevotella sp900314715	108	19
bin15	UBA3663 sp900319235 (Prevotellaceae)	102	13
bin16	F082 (Bacteroidales)	54	14
bin17	Prevotella sp900314935	69	11
bin18	F082 (Bacteroidales)	53	7
bin19	RUG420 sp900317085 (Acutalibacteraceae)	27	7
bin20	Methanobrevibacter sp900314635	6	2
bin21	UBA1777 (Oscillospiracea)	37	1
bin22	Methanobrevibacter	4	0
összesen		1295	246

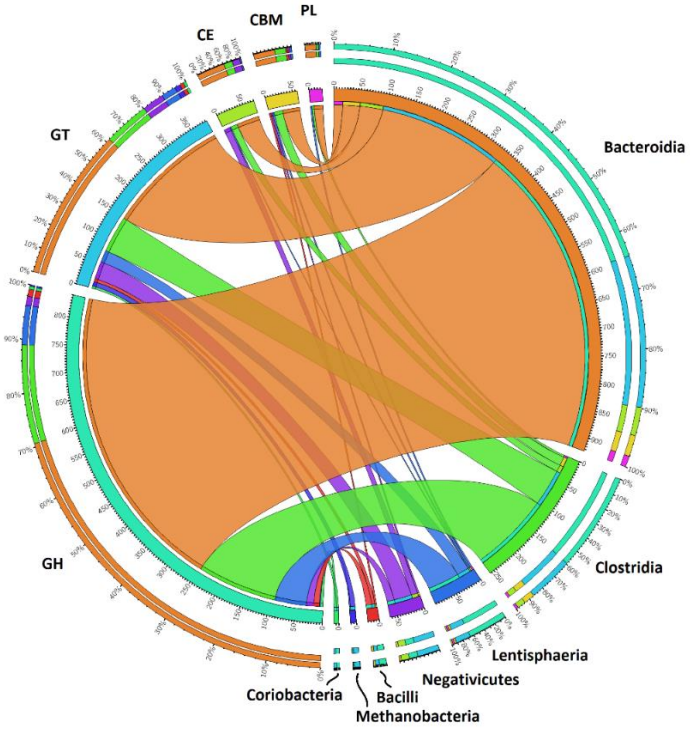
8. táblázat

Az egyes binekben fellelhető CAZy gének száma, illetve azok, amelyek egynél több enzimaktivitással rendelkeznek

Az egyes binek közül jól látszódik, hogy a *Prevotella* binek azok, amelyek a legtöbb szénhidrát bontó enzimet kódoló génnel rendelkeznek (bin1: 129 db; bin10: 124 db; bin14: 108 db; bin15: 102 db). Azonban kijelenthető, hogy a 12, 21 és 22-es bin kivételével mindegyik bin jelentős mennyiségű CAZy génnel rendelkezik, ezáltal fontos szerepet tölthetnek be a lignocellulóz lebontásában. Az összes azonosított CAZy gént (1295 db) további öt funkcionális osztályba soroltam, melyek a következők: glikozil hidrolázok (GH),

glikozil transzferázok (GT), poliszacharid liázok (PL), szénhidrát észterázok (carbohydrate esterases: CE), szénhidrát-kötő modulok (carbohydrate-binding modul: CBM). A GH-ok képesek a glikozidos kötések hasítására két vagy több szénhidrát molekula vagy szénhidrát és nem-szénhidrát molekula között. A GT-ok a di-, oligo- és poliszacharid molekulák szintézisében játszanak fontos szerepet és a szacharid molekulák között hoznak létre glikozidos kötéseket. A szénhidrát észterázok a szubsztituált szacharidok O vagy N acetilációját katalizálják, míg a poliszacharid liázok a cukorsav tartalmú poliszacharidok bontására képesek, a hasítás eredményeképpen pedig cukorsav maradék, valamint egy új redukáló vég keletkezik. A CBM-vel rendelkező CAZy enzimek pedig olyan aminosav szekvenciával rendelkeznek, mely révén képesek a szénhidrátokat megkötni (www.cazy.org).

Összesen 59 CBM-t, 840 GH-t, 71 CE-t, 383 GT-t és 24 PL-t azonosítottam a 22 bin-ben. Az azonosított CAZy gének 61%-a GH, 27,8%-a GT, 5,2%-a CE, 4,3%-a CBM és mindössze 1,7%-a volt PL. Ezt követően az egyes bineket osztály szinten összevontam a jobb átláthatóság érdekében. A Bacteroidia osztályba az 1, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17 és 18-as bin, a Bacilli osztályba a 8-as, a Clostridia osztályba a 3, 4, 5, 6, 19 és 21-es, a Coriobacteria osztályba a 12-es, a Lentisphaeria osztályba a 11-es, a Methanobacteria osztályba a 20-as és 22-es, míg a Negativicutes osztályba a 2-es bin tartozik. Az egyes funkcionális osztályokba sorolt CAZy enzimeket az előzetesen összevont rendszertani osztályok rendszertani kategóriáihoz rendeltem. Így az azonosított CAZy gének funkcionális és taxonómiai osztályozását a következő, 24. ábra szemlélteti.



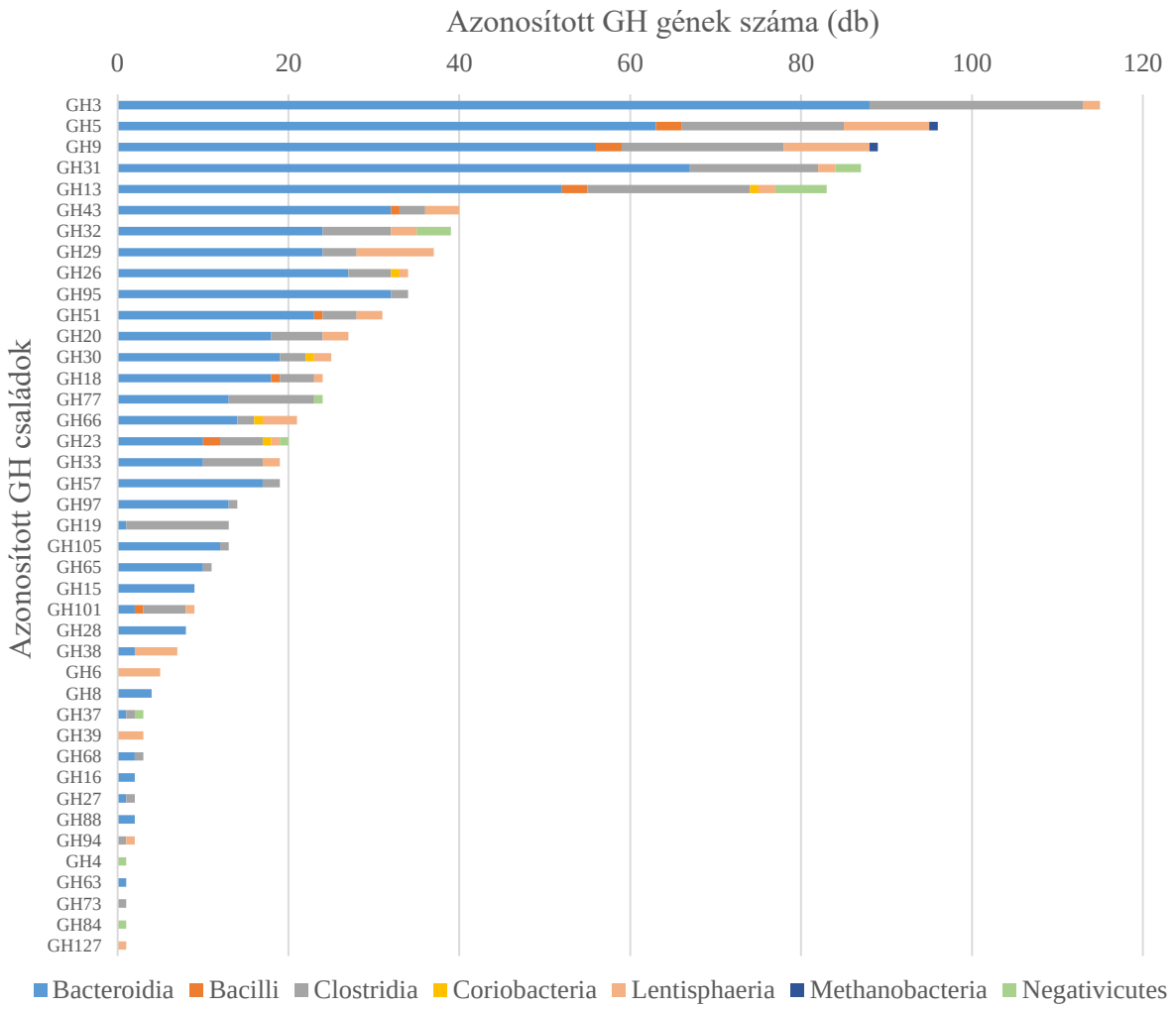
24. ábra

A 22 binben azonosított CAZy gének funkcionális és taxonómiai eloszlása

Az eredményeim alapján megállapítható, hogy az azonosított GH-ok 70%-a a Bacteroidia, 18%-a a Clostridia, 8%-a a Lentisphaeria osztályokhoz köthető, míg a fennmaradó mintegy 4% pedig a Negativicutes, Bacilli, Methanobrevibacter és Coriobacteria osztályokhoz. A GT-ok esetén a Bacteroidia osztályra a GT-ok 62%-a jutott, a Clostridia osztályra 18%, 9% a Negativicutes osztályra, 6% a Lentisphaeria osztályra és a visszamaradó 5% pedig a Bacilli, Methanobrevibacter és Coriobacteria osztályokra. A szénhidrát észterázok túlnyomó többsége (60%) ugyancsak a Bacteroidia osztályhoz volt hozzárendelhető, 20%-a a Clostrida, 10%-a pedig a Negativicutes osztályhoz. Az azonosított CBM-ek 90%-a két osztályra volt jellemző (Bacteroidia, 60%; Clostridia 30%). A PL-ok tekintetében pedig szintén a Bacteroidia osztály tagjai rendelkeztek túlnyomó többségben ezekkel az enzimekkel.

A binekben azonosított CAZy enzimek kódoló gének (1295 db) mintegy 65%-a volt GH (840 db). Szerettem volna feltérképezni, hogy mely GH családok mely rendszertani kategóriákhoz rendelhetőek, azáltal közelebbi képet kaphatok arról, hogy az egyes rendszertani

kategóriákhoz (család szinten) milyen glikozil hidroláz funkciók rendelhetők. Az egyes GH családok rendszertani kategóriánkénti előfordulását az alábbi, 25. ábrán szeretném bemutatni:



25. ábra

Az azonosított GH családok előfordulása az egyes rendszertani kategóriákban

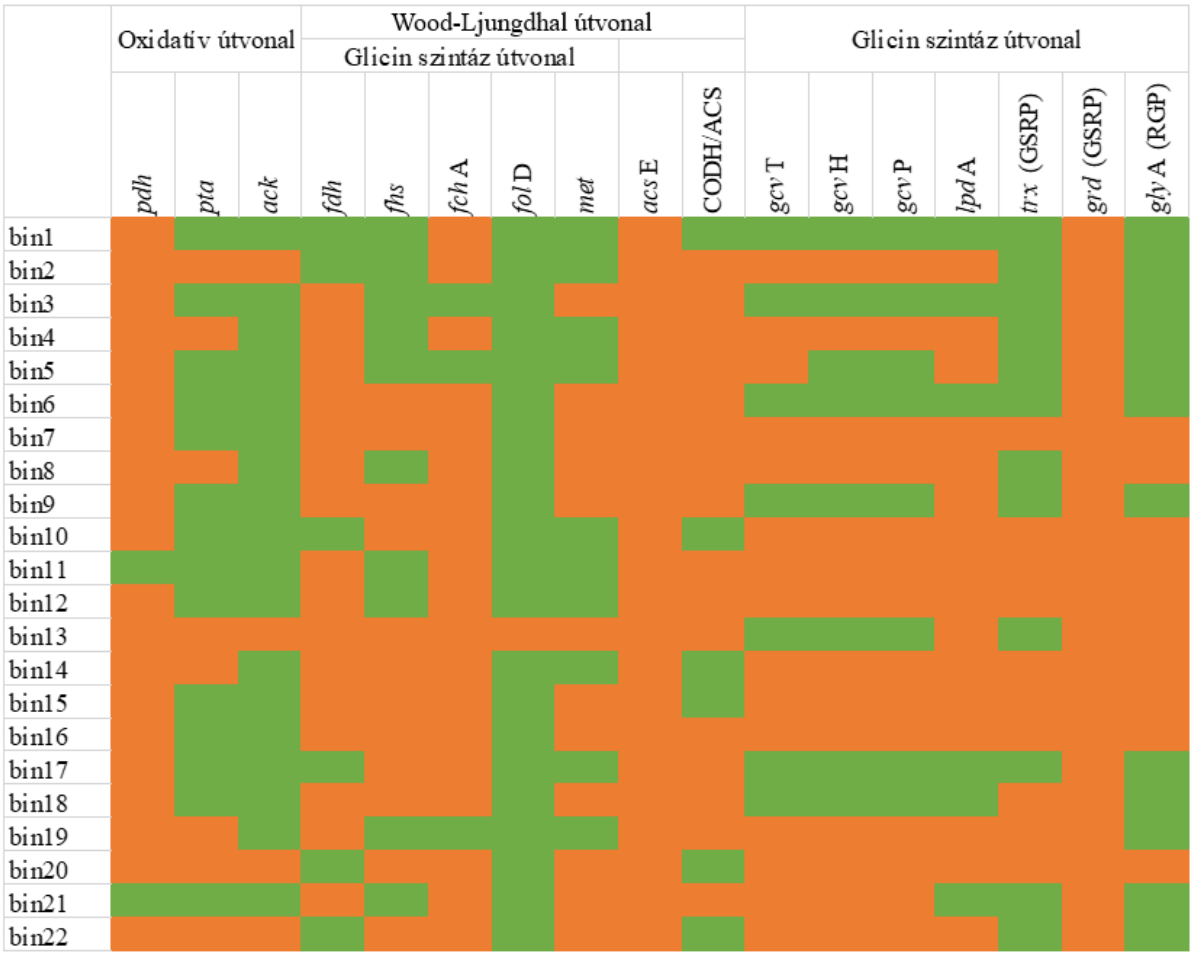
A binekben összesen 840 db GH-t sikerült azonosítani, melyek 41 GH családba sorolhatók be (25. ábra y tengely). Az azonosított GH-ok 56%-a öt GH családba volt besorolható (GH3, GH5, GH9, GH31 és GH13. A GH3 családba sorolható enzimek előfordulhatnak baktériumokban, gombákban és növényekben. Lehetséges szerepük a cellulóz tartalmú biomassza lebontásában, valamint a bakteriális és növényi sejtfal átalakításában, újra hasznosításában és a patogének elleni védekezésben van. Az ide sorolható enzimek képesek a poliszacharid lánc nem redukáló végén, a terminális glikozidos kötés hasítására. A család tagja diverz aktivitásokkal rendelkeznek, mint például ß-D-glükozidáz, β-D-xilozidáz, α-L-arabino-furanozidáz és β-*N*-acetil-D-glükozaminidáz [210]. A GH5 család, korábbi nevén

„celluláz A” családba sorolható enzimek szintén széles specifitással rendelkeznek, mint például celluláz, mannanáz, xilanáz, galaktanáz, xiloglükanáz, stb. [211]. A GH9 családba sorolható enzimek túlnyomó többsége celluláz, azonban jó néhánynál megfigyeltek mellék aktivitást is olyan poliszacharidokon, mint például a β-1,3–1,4-gükánon, xilánon, xiloglükánon, cellodextrinen vagy karboxi-metil cellulózon [212]. A szakirodalom alapján a GH13 családba tartozó enzimek az α-glikozidos kötések hasítására képesek, főleg α-amiláz aktivitással bírnak. Emellett azonban, az ezekbe a csoportba tartozó hidrolázok a keményítő mellett mutattak aktivitást glikogénen és egyéb kapcsolódó oligo- és poliszacharidokon is [213]. A GH31-es családba sorolt enzimek szintén különböző aktivitásokkal bírnak, legtöbbjük azonban α-glükozidáz aktivitással bír, mely eredményeképpen α-D-glükóz molekula szabadul fel malto-oligoszacharidokból. Egyes tagjainál pedig α-1,3-glükozidáz, α-xilozidáz, maltáz-glükoamiláz, szukráz-izomaltáz, α-glükán liáz és glükozil transzferáz aktivitásokat is kimutattak [214].

A legtöbb GH3, GH5, GH9, GH13 és GH31 családba sorolható glikozil hidroláz gént túlnyomó többségben a Bacteroidia, valamint a Clostridia osztályoknál sikerült kimutatni. Emellett számos olyan GH családot is sikerült detektálni, melyek csak egy-egy rendszertani osztályhoz voltak köthetőek. Ilyenek például a GH8, GH15, GH16, GH28, GH63, GH88 (Bacteroidia), a GH6, GH39, GH127 (Lentisphaeria), GH4, GH84 (Negativicutes) és a GH73 (Clostridia). Mindezen eredményekből jól látszódik, hogy az azonosított binek közül a legjelentősebb szénhidrát bontó képességgel a Bacteroidia, illetve a Closridia család rendelkezik, azonban a növényi sejtfal lebontásához szükséges számtalan enzimaktivitás biztosításához a fentebbi két rendszertani osztályon kívül más osztályok aktivitása is szükséges lehet.

5.2.4.5. Az egyes binekben fellelhető ecetsav képzésre alkalmas gének vizsgálata

A glikozil hidrolázok mellett szerettem volna megvizsgálni, hogy az azonosított binekben milyen, az ecetsav képződésben résztvevő gének vannak jelen. Ehhez az irodalmi áttekintés során, az acetogén mikrobákban leírt három ecetsav képződési útvonal (oxidatív-, Wood-Ljungdhal- (WLP), és glicin szintáz útvonal) génjeit kerestem az egyes binekben. Az útvonalak egyes binekben való fellelhetőségét az alábbi, 26. ábra szemlélteti.



26. ábra

Az egyes ecetsav képződési útvonalak génjeinek jelenléte az azonosított binekben

(zöld: a gén jelen van az adott bin-ben; narancssárga: a gén nincs jelen az adott bin-ben). pdh: piruvát dehidrogenáz; pta: foszfotranszatiláz; ack: acetát kináz; fdh: formát dehidrogenáz; fhs: formát-tetrahidrofolát ligáz; fchA: metilén tetrahidrofolát ciklohidroláz; folD: metilén tetrahidrofolát dehidrogenáz; met: metilén tetrahidrofolát reduktáz; acsE: metil transzferáz; CODH/ACS: CO dehidrogenáz/Acetil-CoA szintáz; gcvT: glicin hasító rendszer T fehérje; gcvH: glicin hasító rendszer H fehérje; gcvP: glicin dehidrogenáz; lpdA: dihidrolipoil dehidrogenáz; trx: tioredoxin reduktáz; grd: glicin reduktáz; glyA: szerin hidroximetil transzferáz

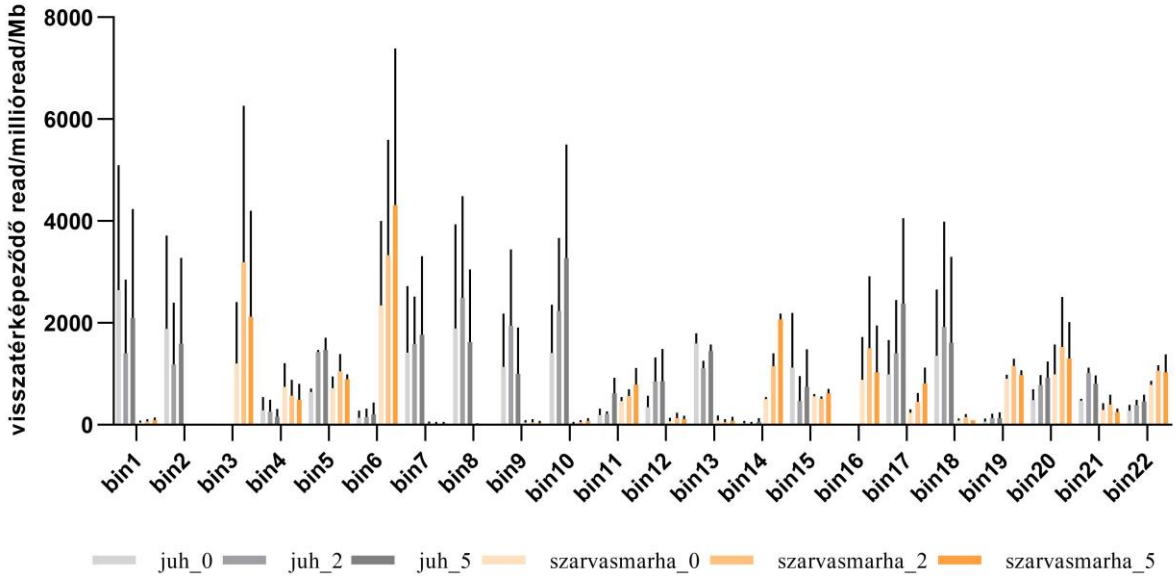
Eredményeim alapján megállapítható, hogy az azonosított binek mindegyikében sikerült azonosítani olyan géneket, melyek az egyes ecetsav képződési útvonalakhoz kapcsolódhatnak. Az oxidatív útvonal génjei az 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 és 21-es binekben voltak megtalálhatóak. Itt fontos megjegyeznem, hogy bár az acetát kinázt (*ack*) kódoló gént a

fentebbi felsoroláson kívül azonosítottam még a 8, 14 és 19-es bin-ben is, azonban azért nem soroltam őket fel, mert az *ack* a WLP útvonalban is szerepel, így ezen binek esetén nem biztos, hogy oxidatív úton is megvalósul az ecetsav képzés, mivel az *ack* génen kívül más oxidatív útvonalhoz kapcsolódó gént nem sikerült kimutatni. A WLP útvonal génjei az 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21 és 22-es binekben, míg a glicin szintáz útvonal génjei az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 17, 18, 21és 22-es binekben. Összevetve az eredményeimet, négy olyan bin-t sikerült azonosítani (1, 5, 17 és 21), melyekben mindhárom útvonal génjei megtalálhatóak. A négy binből 2 a *Prevotella* nemzetségbe tartozik, kettő pedig az *Oscillospiracea* családba. A 20 és 22-es binek *Methanobrevibacter* nemzetség tagjaként lettek azonosítva, melyek közül a 20-as binben csak a WLP volt kimutatható, míg a 22-es bin-ben a WLP mellett a glicin szintáz útvonal génjei is azonosíthatóak voltak.

Összegzésként elmondható, hogy az azonosított binek, amellett, hogy jelentős poliszachrid bontó enzimkészlettel rendelkeznek, az ecetsav szintéziséhez szükséges gének is fellelhetők bennük. Ezáltal ezen mikroorganizmusok nem csak a hidrolizáló, de az acetogenezis lépésének is fontos tagjai lehetnek.

5.2.4.6. A szekvenálás során kapott readek visszatérképezése az egyes binekre

A binelést követően megvizsgáltam, hogy az egyes binek mely mintákban és milyen gyakorisággal fordultak elő. Ezen célom elérése érdekében az 4.2.2. fejezetben leírtak alapján elvégeztem a readek visszatérképezését az egyes binekre, mely eredményemet a 27. ábra mutatja.



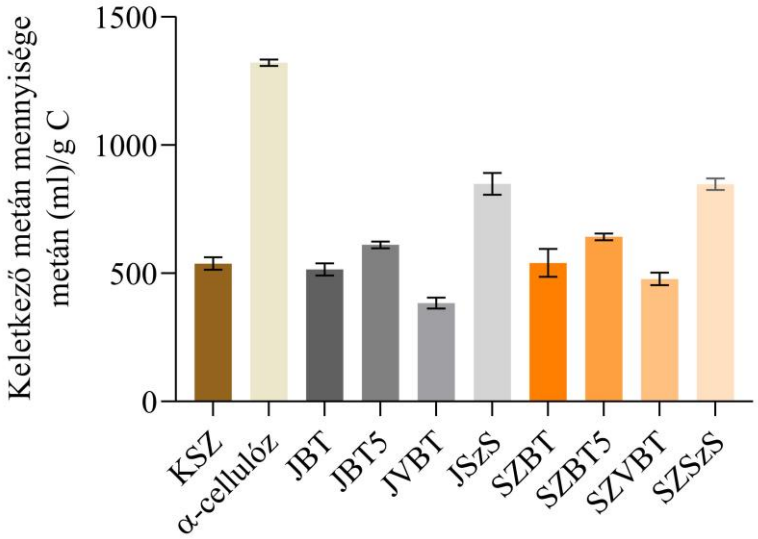
27. ábra

A szekvenálás során kapott readek visszatérképezése az egyes binekre

Bár egyes esetekben nagy a szórás, de jól látszik, hogy mely binek, mely állatcsoportban fordulnak elő leginkább. Ezek alapján elmondható, hogy az 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 18 és a 21-es binek inkább a juh, a 3, 4, 6, 11, 14, 16, 19, 20 és 22-es binek inkább a szarvasmarha mintákra voltak jellemzőek. A Prevotellaként azonosított binek (1, 10, 13, 14, 15, 17-es binek) közül 5 a juh mintákhoz, és csak egy, a 14-es bin tartozott a szarvasmarha mintákhoz. Az 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11 és 18-as binek jellemzően csak a juh mintákban fordultak elő. Míg a 3 és 16-os binek csak a szarvasmarha mintákban. Néhány esetben az inkubáció előrehaladtával növekvő tendencia volt megfigyelhető a mikroorganizmusok tekintetében, pl.: juh mintáknál az 5, 10, 12, 17, 20 és 21-es bin (*UBA2922* (Oscillospiracea); *Prevotella sp900315455; RUG844 sp900313875* (Coriobacteriales); *Prevotella sp900314935*; *Methanobrevibacter sp900314635; Methanobrevibacter*), szarvasmarha mintáknál a 6, 11, 14, 17 és 22-es binek (*Ruminococcus_E sp900316555; UBA1407* (Lentisphaeria); *Prevotella sp900314715; Prevotella sp900314935; Methanobrevibacter*). Ezek a mikroorganizmusok, melyek az inkubáció előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségben fordultak elő, feltehetően aktív résztvevői a szerves savtermelésnek.

5.2.5. Kétlépcsős fermentáció: metántermelés

Ezen kísérletsorozatban az 5.2.3.-as fejezetben leírt savképző lépés folytatását végeztem el. Vizsgáltam, hogy a juh- és szarvasmarha bendőtartalom (JBT, SZBT), az első lépcső során 5 nap alatt előemésztett juh- és szarvasmarha bendőtartalom (JBT5, SZBT5), az előemésztés után visszamaradó szilárd fázis (juh: JVBT, szarvasmarha: SZVBT) és a folyadék fázis, mely a megtermelődött szerves savakat tartalmazza (juh: JSzS, szarvasmarha: SZSzS), milyen BMP értékekkel rendelkeznek. Kontroll nyersanyagként α-cellulózt és kukoricaszárat is alkalmaztam. A szerves savakat tartalmazó folyadék fázis esetében a fermentációban alkalmazandó nyersanyag mennyiségét úgy határoztam meg, hogy az egyes fermentorokban az összes szerves sav mennyisége 2g/l legyen. A szilárd halmazállapotú nyersanyagok esetében pedig a beadagolandó mennyiségeket úgy állapítottam meg, hogy megmértem azok TS és oTS tartalmát, majd ez alapján a VDI I-es szabványnak megfelelően annyi nyersanyagot adtam a fermentorokhoz, hogy az inokulum/nyersanyag aránya 2 legyen. A kumulatív metánhozamokat a 28. ábra szemlélteti:



28. ábra

A kétlépcsős fermentáció második, metántermelő lépése

KSZ: kukoricaszár, JBT: juh bendőtartalom (vágást követően), JBT5: JBT, 1:1 arányban vízzel hígítva, 5 nap inkubáció után, JVBT: juh visszamaradó bendőtartalom 5 nap után, JSzS: SZBT: szarvasmarha bendőtartalom (vágást követően). A betűk eltérő szignifikancia szintet mutatnak a Duncan teszt alapján (n=3, p≤0.05)

A 28. ábrán jól látszik, hogy a SZBT statisztikailag ugyanolyan, a JBT pedig közel azonos BMP értékkel rendelkezik, mint a kontrollként alkalmazott KSZ. Emellett a szerves savtermelő/előemésztő lépés (első lépcső) bevezetése a JBT esetében 18,60%-kal (515,57 ml-ről 611,47 ml metán/g C-re), míg SZBT esetén 18,85%-kal (541,03 ml-ről 643,03 ml metán/g C-re) növelte a rendszer BMP értékeit. Mindezek alapján elmondható, hogy az első lépcső bevezetése, mindkét bendőtartalom esetén, mintegy 20%-kal növelte az egységnyi bendőtartalomból keletkező biometán mennyiségét.

Összegzés

Összességében, a hulladékként keletkező bendőtartalmak hasznosíthatóságára tervezett séma (17. ábra) hatékonyabb módon képes a bendőtartalmakból biometánt előállítani, mintha csak a bendőtartalmakat közvetlenül hasznosítanánk biogáz reaktorokban. Ez az eredmény elsősorban a bendő endogén mikroba közösségének aktív szénhidrát és szerves savképző tulajdonságának köszönhető. Vizsgálataim során arra is fény derült (5.2.1. fejezet), hogy ennek köszönhetően a bendőtartalom önálló inokulumként nem minden esetben alkalmazható, mert az intenzív savtermelés következtében a reaktorok pH értéke oly mértékben lecsökken, hogy az AD lépései közötti egyensúly felborul és a metántermelés leáll. Azonban kétlépcsős fermentációban képes volt eredményesen működni (28. ábra), normál fermentációs eljárásban (egy lépcsős) viszont már kevésbé volt hatékony. Bendőtartalommal történő „inokulálás” esetén mindenképpen figyelembe kell venni és kalkulálni kell azzal a ténnyel, hogy az inokuláció során jelentős mennyiségű szerves savat is a rendszerbe juttatunk, mely nagymértékben képes a biogáz reaktorok gázkihozatalát fokozni. További kísérletek lennének szükségesek, melyekkel megállapítható lenne, hogy a bendőtartalom mikroflórája valóban képes-e fennmaradni egy egylépcsős fermentáció esetén, valamint, hogy a bendőtartalom valójában inokulum, szubsztrát, vagy esetleg mindkettő-e egyszerre.

6. Összefoglalás

Napjaink egyik legnagyobb kihívása, hogy a kimerülő félben levő fosszilis tüzelőanyagok helyett, új-, megújuló energiaforrásokat keressen. A kőszén, kőolaj és földgáz – korlátozott mennyiségük miatt - már csak rövid ideig képesek az emberiség egyre növekvő energiaigényének kielégítésére, továbbá használatuk súlyos környezeti károkat is okoz. Mindezek mellett, az intenzív ipari és mezőgazdasági termelés következtében nagy mennyiségű szerves hulladék is keletkezik világszerte melynek kezelése szintén sürgető kérdés. Korunk kutatói számára egyre jobban körvonalazódik az a szemlélet, hogy ezen hulladékokat hasznos célokra kellene fordítani és fel kell őket használni, pl. mint energiaforrás, mely törekvés egyezik a körkörös gazdaság modelljének célkitűzéseivel. Ezen szemlélet mentén az egyik legjelentősebb hasznosítási mód, azok biogázzá történő átalakítása. A biogáz reaktorban az anaerob emésztés során komplex szerves vegyületek (fehérjék, lipidek, szénhidrátok) biodegradációja történik meg egy összetett mikrobiális közösség által. A folyamat négy lépésének (hidrolízis, acidogenezis, acetogenezis és metanogenezis) végeredményeképpen biogázt, illetve ásványi anyagokban gazdag fermentációs maradékot kapunk. Az így nyert biometán - tisztítást követő - fűtőértéke megegyezik a földgázéval, a fermentációból visszamaradó iszap pedig felhasználható talajjavításra. A növényi biomasszából előállított biogáz karbonsemlegesnek tekinthető, ugyanis a belőle származó energia a növények által megkötött szén-dioxidból és napenergiából származtatható. Ezek alapján jól látszódik, hogy az anaerob emésztés kiváló megoldást kínál napjaink két, környezeti szempontból talán legjelentősebb problémájának megoldására, az energiaválságra, illetve a szerves hulladékok felhalmozódására. A XXI. század tudományos szempontból talán legnagyobb vívmányának köszönhetően (szekvenálás és bioinformatika módszerek) lehetőségünk nyílik arra, hogy az anaerob emésztés folyamatát, annak mikrobiológiai hátterét még alaposabban tanulmányozhassuk, megérthessük az egyes mikrobák szerepét, így a nyersanyagokból kinyerhető biogáz mennyiségét maximalizálhassuk.

A fenti tényeket szem előtt tartva dolgozatomban bemutattam, hogy a mezőgazdasági, illetve az ipari termelés következtében nagy mennyiségben, hulladékként keletkező paradicsom növényi maradvány (PNM, szár és levél), valamint juh- és szarvasmarha bendőtartalom (JBT, SZBT) alkalmazható biogáz előállítására. Emellett feltérképeztem a folyamatban szerepet játszó mikrobiális közösségeket 16S rRNS gén alapú amplikon, valamint shotgun teljes metagenom szekvenálásokkal.

A fiziko-kémiai paraméterek alapján megállapítást nyert, hogy a PNM a kukoricaszárhoz (KSZ) viszonyítva alacsonyabb lignin és hemicellulóz, magasabb szolubilis tartalommal, valamint alacsonyabb C/N aránnyal rendelkezik, ezért ígéretes biogáz alapanyag.

A szakaszos üzemű fermentációk során igazolást nyert, hogy a PNM mind mono-, mind pedig kukoricaszárral (KSZ) keverve koszubsztrátként valóban ígéretes nyersanyag. A PNM mono- és koszubsztrátként is a KSZ-val megegyező biometán potenciállal rendelkezik (egyszeres és kétszeres nyersanyag bevitel esetén is).

Folyamatos üzemű fermentációs kísérletemben fény derült arra, hogy a PNM jelentősen csökkenti a keletkező biogáz mennyiségét a kontrollként alkalmazott KSZ-hoz képest, mind mono-, mind pedig kofermentációban alkalmazva. A fontosabb fermentációs paraméterek tekintetében (pH, összes szerves sav tartalom/pufferkapacitás (FOS/TAC), NH_4^+ ion koncentráció) azonban nem volt megfigyelhető a normál értékektől való eltérés. Szakirodalmi adatok alapján a PNM olyan bioaktív komponenseket tartalmazhat (pl.: fenolok, glükoalkalodik, pl.: tomatin és tomatidin), melyek antimikrobiális hatással rendelkeznek, ezáltal gátolhatják az anaerob emésztésben részt vevő mikroorganizmusok aktivitását, ezáltal hatással lehetnek a keletkező biogáz mennyiségére.

Az előző bekezdésben említett okok miatt 16S rRNS gén alapú amplicon szekvenálással feltérképeztem a PNM alkalmazása következtében bekövetkező mikrobiális változásokat. Igazoltam, hogy a PNM alkalmazása esetén, jelentős változás következett be a mikrobiális közösségben, valamint a biodiverzitás is csökkent a KSZ-val táplált fermentorhoz képest.

Szakaszos üzemű fermentációkban különböző koncentrációkban teszteltem két, a PNM-ben potenciálisan fellelhető glükoalkaloid, a tomatin és a tomatidin biometán képződésre gyakorolt hatását. Kísérleteim során igazoltam, hogy a tomatin már 0,025 µg/ml koncentrációban is gátolja a metán képződését. Tomatidin esetén, a vizsgált koncentrációk esetén (0,0025 - 2.5µg/ml) a gátlás nem volt megfigyelhető.

Összességében elmondható, hogy a PNM egy jó nyersanyag szakaszos üzemű fermentáció esetén, vagy pedig KSZ-szel megfelelő arányban keverve koszubsztrátként folyamatos üzemű fermentációban. Azonban fontos megjegyezni azt, hogy további vizsgálatok (pl.: termofil rendszer, előkezelés) szükségesek ahhoz, hogy maximalizálni lehessen a PNM-ből kinyerhető biogáz mennyiségét.

Kísérlet sorozatom továbbá rávilágított arra is, hogy egy újonnan alkalmazni kívánt nyersanyag esetén mindenképpen ajánlatos a folyamatos üzemű fermentáció elvégzése, hogy a vizsgált nyersanyag hosszútávú hatásaira is fény derülhessen.

A juh-, (JBT) és a szarvasmarha bendőtartalom (SZBT) igen aktív hidrolitikus és szerves savképző mikrobiális közösséggel bír, mely aktivitásnak köszönhetően igen rövid idő alatt a fermentorok sav-bázis egyensúlyát savas irányba tolja el, így a metánképződés leáll. Ennek köszönhetően ezek – az irodalomban közölt példákkal összevetve - inokulumként való alkalmazása helyett, nyersanyagként való alkalmazás lenne célszerűbb.

JBT és SZBT estén felállítottam egy koncepciót, mely azt mutatja be, hogy ilyen típusú hulladékok milyen módon lennének hasznosíthatók szerves savak, valamint biogáz előállításra. A fenti megfontolások alapján a bendőtartalom hulladék hasznosítása egy kétlépcsős fermentációban valósul meg, ahol az első lépcsőben a bendőtartalomból annak saját mikroflóráját felhasználva szerves savakat állítanak elő a mikrobák, majd az első lépcsőben előemésztett bendőtartalom, illetve a megtermelt szerves savak a második lépcsőben metánná alakíthatók.

Mind a JBT-nak, mind a SZBT-nak igen magas a szárazanyag tartalma, ezért folyadék üzemű fermentációjuk esetén szükséges azokat hígítani vízzel, hogy a fermentor kevertetése zavartalan legyen. Ennek megfelelően különböző arányokban hígítottam azt vízzel és a keletkező szerves savak mennyiségéből következtettem a hígítás megfelelő mértékére. Megállapítást nyert, hogy a hígítás mértéke (1:1, 1:2, 1:3, $V_{bendőtartalom}$:$V_{víz}$) nem befolyásolja az egységnyi térfogatú bendőtartalomból keletkező szerves savak mennyiségét.

Vizsgálataim során kimutattam, hogy egységnyi JBT-ból mintegy kétszer több szerves sav keletkezik, mint egységnyi SZBT-ból.

Mindkét bendőtartalom esetén elmondható, hogy a savtermelési szakasz 1-2, maximum 5 napig tart, addigra a szerves sav koncentráció eléri a maximumot. Ezzel párhuzamosan az inkubációs napok előrehaladtával mindkét esetben a pH drasztikusan lecsökken, akárcsak a metántermelés. A legnagyobb mennyiségben keletkező szerves sav mind JBT, mind SZBT esetén az ecetsav, propionsav, illetve az izovajsav volt.

Összehasonlítottam a két állat bendőjének mikroflóráját, mely során megállapítást nyert, hogy a két állat esetén a leggyakoribb mikroba csoportok azonosak, azonban az egyes csoportok előfordulási gyakorisága kisebb-nagyobb mértékben változik az állat fajától függően.

Vizsgáltam az mikroflóra változását az egyes állatok esetén a savtermelési lépcső 0., 2. és 5. napján, annak érdekében, hogy megállapítsam mely mikroba csoportok nyernek teret, illetve mely mikroba csoportok szorulnak vissza a felhalmozódó szerves savak következtében. Az elemzéseim megmutatták, hogy az Archaea domain tagjainak előfordulási gyakorisága nem változott érdemben egyik állat esetén sem, így azok valószínűleg csak inaktiválódtak és nem pusztultak el. Ez szolgálhat magyarázatul az időben csökkenő metántermelésre. A Bacteria domain esetén már jelentősebb változások voltak megfigyelhetők, míg az Eukarióta domain tekintetében egyes csoportok szinte teljesen eltűntek az inkubáció 5. napjára.

Az összes mintából kinyert szekvenciákon további metagenom elemzéseket végezve, összesen 22 bin-t sikerült összeszerelnem, majd azonosítanom faj-, illetve nemzetség szinten.

Az egyes binek esetén számos CAZy gént sikerült azonosítani, melyek mintegy 90%-a a Bacteroidia (70%) és Clostridia (18%) családokhoz tartozott.

Összesen 840 glikozil hidrolázt (GH) azonosítottam melyek 41 GH családba sorolhatók be és 56%-uk 5 GH családhoz tartozik (GH3, GH5, GH9, GH31 és GH13).

A binekben azonosított gének alapján vizsgáltam az egyes binekben fellehető ecetsav képződési útvonalakat is. Mindhárom ecetsav képződési útvonalhoz (oxidatív-, Wood-Ljungdhal- és glicin szintáz útvonal) kapcsolódó géneket sikerült azonosítanom, így megállapítható, hogy az azonosított mikroorganizmusok amellett, hogy jelentős poliszacharid-bontó képességgel rendelkeznek, fontos szerepet tölthetnek be az ecetsav képződés folyamatában is.

Végezetül pedig igazoltam, hogy mind JBT, mind SZBT esetén az általam felvázolt séma alkalmazásával a bendőtartalom biometán potenciál értéke, mintegy 20%-val fokozható, ahhoz képest mintha a bendőtartalmat rögtön a vágást követően biogáz képzésre alkalmaznánk.

Summary

One of the biggest challenges on the planet Earth to solve the energy-, pollution- and waste crisis. Fossil fuels are exhausted and can only satisfy the energy demand of mankind just for a short period of time. Besides, their usage can cause serious environmental problems such as air-, water, and soil pollutions, as well. Moreover, intensive industrial- and agricultural activities result in a huge amount of organic wastes all over the world causing organic excess in the environment. Researchers have to find alternatives and solutions for these problems. One of the most promising solutions is the application of anaerobic digestion (AD) process which can convert the organic wastes into energy carriers such as biogas (mostly methane and carbon-dioxide). This endeavor is consistent with the aims of the circular economy model. Biogas production is a well-known process which is a widely applied environmentally friendly technology and suitable for reducing the emission of organic wastes, by-products and greenhouse gases. AD takes place in four main stages: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. Throughout the hydrolysis step, the microbial consortium breaks down the complex biopolymers such as carbohydrates, lipids and proteins into monomers. In the next steps, the monomers are converted into volatile organic acids then acetic acid and/or CO_2 and finally into methane. This biomethane is equivalent – after purification – with the natural gas and the remaining sludge is suitable as fertilizer in the agriculture due to its high mineral content. The methane produced from the residual plant materials is carbon neutral considering that the energy from it is generated by photosynthesis via CO_2 fixation. Taking all these into consideration, the AD process provides a good solution for the previously mentioned environmental problems. Owing to the development of sequencing techniques and bioinformatics we have a good opportunity to get deeper insight into the microbiological background of the AD processes.

In my Ph.D. dissertation, I demonstrated that the tomato waste (TW, stems and leaves) and the sheep- (sRC) and cattle rumen contents (cRC) produced by the agro-industrial operation are promising substrate for biogas production. Besides, I disclosed the microbial background and functions of the AD processes with 16S rRNA gene and shotgun metagenomic sequencing techniques when the fermenters were fed with TW or sRD or cRD.

According to the physico-chemical parameters, TW had lower lignin, hemicellulose content and C/N ratio than corn stover (CS), so it was a promising substrate for biogas production.

In batch fermentation experiments, TW was tested as mono- and co-substrate (with CS) and it was shown that both had the same biomethane potential (BMP) as CS did, which was used as a control substrate.

In continuous fermentation tests, it was highlighted that the presence of TW apparently decreased the biogas production both for mono- and co-substrate (with CS) as compared to the control substrate CS. However, the most important fermentation parameters (pH, Volatile Organic Acid/Total Inorganic Carbon (VOA/TIC), ammonium-ion cc.) did not differ from the normal values. According to the literature, tomato plant materials contain flavonoids, glycoalcaloids (such as tomatine and tomatidine), which are known as antimicrobial and antifungal agents thereby it might have a negative effect on the microbial activity of the AD processes and biogas formation.

16S rRNA gene metagenomic sequencing approach was carried out to follow the microbial compositions when the fermenters were fed with TW as mono- and co-substrate. According to my results, significant differences were observed in the microbial community in the presence of TW as compared to that of CS. Besides, the biodiversity was substantially dropped in the case of TW compared to the control fermenter.

TW is known to contain antimicrobial and antifungal agents such as glycoalcaloids (tomatine and tomatidine) which can influence the composition of the microbial community thereby the biomethane formation. In batch fermentation experiments, tomatine and tomatidine were tested at various concentrations (0.0025-2.5µg/mL). Tomatidine had no effect on biomethane production, however the tomatine apparently decreased it at 0.025µg/mL and above.

Summary. The TW is a good substrate in batch fermentation or as a co-substrate with CS in a proper ratio in continuous fermentation. However, further examinations are needed to maximize the biomethane formation from TW, such as pre-treatment, thermophilic system, etc.

Moreover, my experiments highlighted and confirmed that in the case of a novel substrate, continuous fermentation is necessary for evaluation of its long-term effect.

Sheep -, (sRC) and cattle rumen contents (cRC) have an active hydrolizing and organic acid producing microbial communities. Therefore, our primary aim was to use the micobial activity of the rumens for intensifying the biogas production. However, due to the intensive microbial activity, the usage for inoculation biogas reactors did not performed according to our expectations. Therefore, I made a concept about the application of residual rumen

contents as a substrate in biogas fermentation. According to the results, rumen contents are suitable for organic acid and/or biogas production in a two stage AD process. In the first stage, the endogenous microbial community pre-digest the RC and converts it into methane but mainly into organic acids. In stage two, the pre-digested RC and the organic acids are converted into methane.

Both sRC and cRC have high Total Solid (TS) content so it was needed to dilute the samples with water to promote easy mixing. Three dilution ratios were tested (1:1, 1:2, 1:3, V_{RD}:V_{water}) and the amount of the produced organic acid contents was measured. According to my measurements, the degree of dilution had no effect on organic acid production from one unit of RC respectively.

In the case of sRC, the amount of the produced organic acids were two times higher than in cRC.

Both sRC's and cRC's microbiome needed 1-2, at longest but 5 days to achieve the maximal organic acid production. In parallel, the pH significantly dropped in all cases similarly to the methane production. Acetic acid, propionic acid and iso-butyric acid were produced in the largest quantities in the case of both RCs.

Several metagenomic analyses were carried out on the RCs and on the samples which were collected on the 0., 2nd and 5th day of the first stage.

The microbiomes of rumen samples of the sheep and cattle were compared to each other. According to the analyses, the most important microbial groups were the same in both cases thereby the relative incidences of some microbial groups differed.

I examined the changes of the microbiome in the fermenters in the organic acid accumulating phase. The results have proven that the Archaea domain remained unchanged during the examined period in the rumen digestates. Therefore, they were likely in inactive forms. Bacteria domain changes were more prominent while the Eukaryotes have shown a more drastic decline: some of them completely disappeared from the system by the 5th day of the incubation.

Binnig was carried out on all samples pooled. As a result, 22 bins were identified at genus and/or species level. Their completeness was higher than 70% and their contamination were lower than 5%.

Due to the analysis, many Carbohydrate Active Enzyme (CAZy) genes were identified. Almost 70% of the identified genes belonged to the Bacteroidia and 18 % of them belonged to the Clostridia families.

Altogether, 840 Glycosyl Hydrolase (GH) genes were identified which were classified into 41 GH families. Overall, 56% of these identified GH genes belonged to 5 different GH families (GH3, GH5, GH9, GH31, and GH13).

Acetic acid was produced in the highest amount in every case, so genes belonging to the acetic acid production pathways (oxidative-, Wood-Ljungdhal- and glycine synthase pathway) searched in the bins. Genes of all three pathways were identified so the microorganisms genomically identified are probably important members of the organic acid production, as well.

To summarize this part of my work, the two stage procedure of RC utilization increased the BMP of sRC and cRC with approximately 20%.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik bármilyen formában is, de hozzájárultak ahhoz, hogy ezen dolgozat elkészülhessen!

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, **Dr. Rákhely Gábornak**, aki az elmúlt évek alatt odaadóan segítette kutatásaimat és bármikor fordulhattam hozzá tanácsért és szakmai útmutatásért. Nélküle ez a doktori dolgozat biztosan nem születhetett volna meg.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Kovács L. Kornélnak** és **Dr. Bagi Zoltánnak**, akik a biogázzal kapcsolatos kutatásaimat segítették szakmai precizitásukkal, ötleteikkel és jó tanácsaikkal.

Köszönöm **Dr. Laczi Krisztiánnak**, **Dr. Wirth Rolandnak** és **Kakuk Balázsnak**, hogy a metagenomikai elemzések során a segítsemre voltak.

Külön köszönetet szeretnék mondani **Dr. Molnár Erikának**, aki a nehéz és reménytelennek tűnő pillanatokban mindig mellettem állt és bíztatott, hogy sikerülni fog, nem szabad feladni, „meg kell csinálni!”.

Hálás vagyok a **Biotechnológiai Tanszék minden jelenlegi és volt munkatársának** is, akik az elmúlt évek alatt számtalan ötlettel, jó tanáccsal és tapasztalattal segítették kutatómunkámat, így hozzájárulva munkám sikeréhez.

Külön köszönöm **Dr. Nyilasi Andreának, Erdeiné Dr. Kis Ágnesnek, Dr. Kovács Etelkának, Dr. Duzs Ágnesnek, Dr. Tóth Liliánának, Dr. Tengölics Rolandnak, Dr. Galgóczi Lászlónak, Zsiros Szilviának, Bodor Attilának, Papp Saroltának, Bende Gábornak, Szűcs Csillának**, és **Bounedjoum Nailanak** a számtalan örömteli pillanatot, a sok segítséget, szakmai tanácsot, a beszélgetéseket és a rengeteg támogatást, amit kaptam tőlük.

Hálával tartozom szakdolgozóimnak is, **Ördög Katalinnak, Hódi Barbarának, Zseni Mariettának, Tripolszki Violettának, Oláh Kittinek, Markó Viktóriának, Csihi Tibornak, Friman Balázsnak, Tóth Albertnek** és **Domokos Antalnak**, akik munkájukkal szintén hozzájárultak nem csak eme dolgozathoz, hanem a jellemem és tapasztalatom fejlődéséhez is.

Köszönöm a lelki támogatást szegedi barátaimnak **Martinának, Tibinek, Ákosnak, Marinak, Dórának**, **Erikának, Zsófinak,** akik mindig meghallgattak, támogattak és erőt adtak a folytatáshoz!

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak, **anyukámnak, Mamának, a nagyszüleimnek, a testvéremnek**, hogy támogattak egyetemi tanulmányaim alatt és hozzásegítettek ahhoz, hogy azzá váljak, aki vagyok!

8. Irodalomjegyzék

1. Smil V. Energy Transitions: Global and National Perspectives (Second expanded and updated edition). 2016. Available: http://vaclavsmil.com/2016/12/14/energy-transitions-global-and-national-perspectives-second-expanded-and-updated-edition/

2. Renewables 2019: Global Status report 2019. [cited 16 Jun 2020]. Available: https://y3i6c3u4.rocketcdn.me/wp-content/uploads/2019/05/gsr_2019_full_report_en.pdf

3. Inganäs O, Sundström V. Solar energy for electricity and fuels. Ambio. 2016;45: 15–23. doi:10.1007/s13280-015-0729-6

4. Hammarström L. Overview: Capturing the sun for energy production. Ambio. Springer; 2012. pp. 103–107. doi:10.1007/s13280-012-0263-8

5. Boretti A, Castelletto S. Cost of wind energy generation should include energy storage allowance. Sci Rep. 2020;10. doi:10.1038/s41598-020-59936-x

6. Ackermann T, Söder L. Wind energy technology and current status: a review. Renew Sustain Energy Rev. 2000;4: 315–374. doi:10.1016/S1364-0321(00)00004-6

7. Bagher AM, Vahid M, Mohsen M, Parvin D. Hydroelectric Energy Advantages and Disadvantages. Am J Energy Sci. 2015;2: 17–20.

8. Mehmood A, Yao J, Fan D, Bongole K, Liu J, Zhang X. Potential for heat production by retrofitting abandoned gas wells into geothermal wells. PLoS One. 2019;14. doi:10.1371/journal.pone.0220128

9. Bogdanov D, Farfan J, Sadovskaia K, Aghahosseini A, Child M, Gulagi A, et al. Radical transformation pathway towards sustainable electricity via evolutionary steps. Nat Commun. 2019;10. doi:10.1038/s41467-019-08855-1

10. Reid W V., Ali MK, Field CB. The future of bioenergy. Glob Chang Biol. 2020;26: 274–286. doi:10.1111/gcb.14883

11. Creutzig F, Ravindranath NH, Berndes G, Bolwig S, Bright R, Cherubini F, et al. Bioenergy and climate change mitigation: an assessment. GCB Bioenergy. 2015;7: 916–944. doi:10.1111/gcbb.12205

12. Senés-Guerrero C, Colón-Contreras FA, Reynoso-Lobo JF, Tinoco-Pérez B, Siller-Cepeda JH, Pacheco A. Biogas-producing microbial composition of an anaerobic

digester and associated bovine residues. Microbiologyopen. 2019;8. doi:10.1002/mbo3.854

13. Kushkevych I, Vítězová M, Vítěz T, Kováč J, Kaucká P, Jesionek W, et al. A new combination of substrates: Biogas production and diversity of the methanogenic microorganisms. Open Life Sci. 2018;13: 119–128. doi:10.1515/biol-2018-0017

14. Anna Schnürer; Asa Jarvis. Microbiological Handbook for Biogas Plants. 2009.

15. Atelge MR, Krisa D, Kumar G, Eskicioglu C, Nguyen DD, Chang SW, et al. Biogas Production from Organic Waste: Recent Progress and Perspectives. Waste and Biomass Valorization. 2020;11: 1019–1040. doi:10.1007/s12649-018-00546-0

16. Silva OB da, Carvalho LS, Almeida GC da, Oliveira JD de, Carmo TS, Parachin NS. Biogas - Turning Waste into Clean Energy. Fermentation Processes. InTech; 2017. doi:10.5772/64262

17. Himmel ME. Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels. Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels. Elsevier; 2015. doi:10.1016/c2011-0-09652-7

18. Zoghlami A, Paës G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. Frontiers in Chemistry. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 874. doi:10.3389/fchem.2019.00874

19. Streffer F. Lignocellulose to Biogas and other Products. JSM Biotechnol Bioeng. 2014;2: 1023.

20. Kumar Gupta P, Sai Raghunath S, Venkatesh Prasanna D, Venkat P, Shree V, Chithananthan C, et al. An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. Cellulose. IntechOpen; 2019. doi:10.5772/intechopen.84727

21. Xu N, Liu S, Xin F, Zhou J, Jia H, Xu J, et al. Biomethane production from lignocellulose: Biomass recalcitrance and its impacts on anaerobic digestion. Front Bioeng Biotechnol. 2019;7: 191. doi:10.3389/fbioe.2019.00191

22. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66: 506–577. doi:10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002

23. Wi SG, Cho EJ, Lee DS, Lee SJ, Lee YJ, Bae HJ. Lignocellulose conversion for

biofuel: A new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. Biotechnol Biofuels. 2015;8: 228. doi:10.1186/s13068-015-0419-4

24. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J Food Eng. 2013;117: 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

25. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. Food and Bioproducts Processing. Institution of Chemical Engineers; 2018. pp. 52–73. doi:10.1016/j.fbp.2018.03.001

26. Miklós G-K, Abét B. A biogáz-anaerob erjesztés.

27. Bond T, Templeton MR. History and future of domestic biogas plants in the developing world. Energy Sustain Dev. 2011;15: 347–354. doi:10.1016/j.esd.2011.09.003

28. Hanum F, Yuan LC, Kamahara H, Aziz HA, Atsuta Y, Yamada T, et al. Treatment of Sewage Sludge Using Anaerobic Digestion in Malaysia: Current State and Challenges. Front Energy Res. 2019;7: 19. doi:10.3389/fenrg.2019.00019

29. Shah FA, Mahmood Q, Shah MM, Pervez A, Asad SA. Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. Sci World J. 2014;2014. doi:10.1155/2014/183752

30. Plugge CM. Biogas. Microb Biotechnol. 2017;10: 1128–1130. doi:10.1111/1751-7915.12854

31. Cysneiros D, Banks CJ, Heaven S, Karatzas KAG. The effect of pH control and “hydraulic flush” on hydrolysis and Volatile Fatty Acids (VFA) production and profile in anaerobic leach bed reactors digesting a high solids content substrate. Bioresour Technol. 2012;123: 263–271. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.060

32. Venkiteshwaran K, Bocher B, Maki J, Zitomer D. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function : Supplementary Issue: Water Microbiology. Microbiol Insights. 2015;8s2: MBI.S33593. doi:10.4137/MBI.S33593

33. Dussadee N, Unpaprom Y, Ramaraj R. Grass Silage for Biogas Production. Advances in Silage Production and Utilization. InTech; 2016. doi:10.5772/64961

34. Laiq Ur Rehman M, Iqbal A, Chang C, Li W, Ju M. Anaerobic digestion. Water Environ Res. 2019;91: 1253–1271. doi:10.1002/wer.1219

35. Harris AD, Ramalingam C. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. J Exp Sci. 2010;1: 1–11. Available: www.jexpsciences.com

36. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev. 2005;29: 3–23. doi:10.1016/j.femsre.2004.06.005

37. Shallom D, Shoham Y. Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology. Elsevier Ltd; 2003. pp. 219–228. doi:10.1016/S1369-5274(03)00056-0

38. Jiang Z, Deng W, Yan Q, Zhai Q, Li L, Kusakabe I. Subunit composition of a large xylanolytic complex (xylanosome) from Streptomyces olivaceoviridis E-86. J Biotechnol. 2006;126: 304–312. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.05.006

39. Artzi L, Bayer EA, Moraïs S. Cellulosomes: Bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group; 2017. pp. 83–95. doi:10.1038/nrmicro.2016.164

40. Meegoda JN, Li B, Patel K, Wang LB. A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI AG; 2018. doi:10.3390/ijerph15102224

41. Anukam A, Mohammadi A, Naqvi M, Granström K. A Review of the Chemistry of Anaerobic Digestion: Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. Processes. 2019;7: 504. doi:10.3390/pr7080504

42. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour Technol. 2010;101: 4851–4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093

43. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol. 2005;96: 673–686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025

44. Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science. Elsevier Ltd; 2012. pp. 522–550. doi:10.1016/j.pecs.2012.02.002

45. Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S. Chemical

and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. Enzyme Research. 2011. doi:10.4061/2011/787532

46. Lee JW, Kim HY, Koo BW, Choi DH, Kwon M, Choi IG. Enzymatic saccharification of biologically pretreated Pinus densiflora using enzymes from brown rot fungi. J Biosci Bioeng. 2008;106: 162–167. doi:10.1263/jbb.106.162

47. Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez ÁT, Martínez MJ. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. Bioresour Technol. 2011;102: 7500–7506. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.027

48. Sun L, Pope PB, Eijsink VGH, Schnürer A. Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. Microb Biotechnol. 2015;8: 815–827. doi:10.1111/1751-7915.12298

49. Van DP, Fujiwara T, Tho BL, Toan PPS, Minh GH. A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: Configurations, operating parameters, and current trends. Environmental Engineering Research. Korean Society of Environmental Engineers; 2020. pp. 1–17. doi:10.4491/eer.2018.334

50. Noike T, Endo G, Chang J -E, Yaguchi J -I, Matsumoto J -I. Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. Biotechnol Bioeng. 1985;27: 1482–1489. doi:10.1002/bit.260271013

51. Merlin Christy P, Gopinath LR, Divya D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Elsevier Ltd; 2014. pp. 167–173. doi:10.1016/j.rser.2014.03.010

52. Buyukkamaci N, Filibeli A. Volatile fatty acid formation in an anaerobic hybrid reactor. Process Biochem. 2004;39: 1491–1494. doi:10.1016/S0032-9592(03)00295-4

53. Mao C, Feng Y, Wang X, Ren G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Elsevier Ltd; 2015. pp. 540–555. doi:10.1016/j.rser.2015.02.032

54. Stronach SM, Rudd T, Lester JN. Anaerobic Digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1986. doi:10.1007/978-3-642-71215-9

55. Jin S, Bae J, Song Y, Pearcy N, Shin J, Kang S, et al. Synthetic Biology on Aceto-

genic Bacteria for Highly Efficient Conversion of C1 Gases to Biochemicals. Int J Mol Sci. 2020 [cited 20 Feb 2021]. doi:10.3390/ijms21207639ï

56. Vidra A, Németh Á. Bio-produced Acetic Acid: A Review. 2018;62: 3. doi:10.3311/PPch.11004

57. Chassard C, Bernalier-Donadille A. H_2 and acetate transfers during xylan fermentation between a butyrate-producing xylanolytic species and hydrogenotrophic microorganisms from the human gut. FEMS Microbiol Lett. 2006;254: 116–122. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00016.x

58. Pyzik A, Ciezkowska M, Krawczyk PS, Sobczak A, Drewniak L, Dziembowski A, et al. Comparative analysis of deep sequenced methanogenic communities: Identification of microorganisms responsible for methane production. Microb Cell Fact. 2018;17: 197. doi:10.1186/s12934-018-1043-3

59. Berghuis BA, Yu FB, Schulz F, Blainey PC, Woyke T, Quake SR. Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum Verstraetearchaeota reveals the shared ancestry of all methanogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116: 5037–5044. doi:10.1073/pnas.1815631116

60. Ferry JG. Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. Current Opinion in Biotechnology. NIH Public Access; 2011. pp. 351–357. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.011

61. Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB. Methanogenesis. Current Biology. Cell Press; 2018. pp. R727–R732. doi:10.1016/j.cub.2018.05.021

62. Megonigal JP, Hines ME, Visscher PT. Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. Treatise on Geochemistry: Second Edition. Elsevier Inc.; 2013. pp. 273–359. doi:10.1016/B978-0-08-095975-7.00808-1

63. Kothari R, Pandey AK, Kumar S, Tyagi V V., Tyagi SK. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Elsevier Ltd; 2014. pp. 174–195. doi:10.1016/j.rser.2014.07.011

64. Weiland P. Biogas production: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;85: 849–860. doi:10.1007/s00253-009-2246-7

65. Esposito G, Frunzo L, Giordano A, Liotta F, Panico A, Pirozzi F. Anaerobic co-digestion of organic wastes. Reviews in Environmental Science and Biotechnology.

Springer; 2012. pp. 325–341. doi:10.1007/s11157-012-9277-8

66. Qiang H, Lang DL, Li YY. High-solid mesophilic methane fermentation of food waste with an emphasis on Iron, Cobalt, and Nickel requirements. Bioresour Technol. 2012;103: 21–27. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.036

67. Maile I, Muzenda E, Mbohwa C. Optimization of Biogas Production through Anaerobic Digestion of Fruit and Vegetable Waste: A Review. 2016. doi:10.7763/IPCBEE

68. Maleki E, Bokhary A, Liao BQ. A review of anaerobic digestion bio-kinetics. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. Springer Netherlands; 2018. pp. 691–705. doi:10.1007/s11157-018-9484-z

69. Rabii A, Aldin S, Dahman Y, Elbeshbishy E. A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration. Energies. 2019;12: 1106. doi:10.3390/en12061106

70. Bai Attila. Biogáz előállításának technológiája. 2013.

71. Donoso-Bravo A, Mailier J, Martin C, Rodríguez J, Aceves-Lara CA, Wouwer A Vande. Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review. Water Research. Elsevier Ltd; 2011. pp. 5347–5364. doi:10.1016/j.watres.2011.08.059

72. Holliger C, Alves M, Andrade D, Angelidaki I, Astals S, Baier U, et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. Water Sci Technol. 2016;74: 2515–2522. doi:10.2166/wst.2016.336

73. Lim H, Shin HS. Fed-batch cultures: Principles and applications of semi-batch bioreactors. Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors. Cambridge University Press; 2013. doi:10.1017/CBO9781139018777

74. Yang Y, Sha M. A Beginner's Guide to Bioprocess Modes-Batch, Fed-Batch, and Continuous Fermentation.

75. Dr. Kutasi József. Fermentációs biotechnológia | Digitális Tankönyvtár. 2007 [cited 9 Jun 2020]. Available: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/fermentacios/index.html

76. Yvonne Vögeli; Christian Riu Lohri; Amalia Gallardo; Stefan Diener CZ. Anaerobic Digestion of biowaste in developing countries - Practical information and case studies.

2014.

77. Robaina M, Villar J, Pereira ET. The determinants for a circular economy in Europe. Environ Sci Pollut Res. 2020;27: 12566–12578. doi:10.1007/s11356-020-07847-9

78. Morseletto P. Targets for a circular economy. Resour Conserv Recycl. 2020;153: 104553. doi:10.1016/j.resconrec.2019.104553

79. (No Title). [cited 1 Apr 2021]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0098&from=EN

80. Achinas S, Euverink GJW. Theoretical analysis of biogas potential prediction from agricultural waste. Resour Technol. 2016;2: 143–147. doi:10.1016/j.reffit.2016.08.001

81. Li Y, Xu F, Li Y, Lu J, Li S, Shah A, et al. Reactor performance and energy analysis of solid state anaerobic co-digestion of dairy manure with corn stover and tomato residues. Waste Manag. 2018;73: 130–139. doi:10.1016/j.wasman.2017.11.041

82. Martínez M, Driller L, Chamy R, Schuch W, Nogueira M, Fraser P. Biogas potential of residues generated by the tomato processing industry under different substrate and inoculum conditions. Acta Hortic. 2017; 151–158. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1159.23

83. Torres-León C, Ramírez-Guzman N, Londoño-Hernandez L, Martinez-Medina GA, Díaz-Herrera R, Navarro-Macias V, et al. Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. Front Sustain Food Syst. 2018;2: 52. doi:10.3389/fsufs.2018.00052

84. Kutató A. A MAGYARORSZÁGI PARADICSOMHAJTATÁS HELYZETÉNEK ELEMZÉSE. Available: www.aki.gov.hu

85. Luengo E, Álvarez I, Raso J. Improving carotenoid extraction from tomato waste by pulsed electric fields. Front Nutr. 2014;1: 12. doi:10.3389/fnut.2014.00012

86. Atem AD, Indiveri ME, Llamas S. Biomass storage for further energy use through biogas production. Int J Hydrogen Energy. 2010;35: 6048–6051. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.075

87. Saev M, Koumanova B. ANAEROBIC CO-DIGESTION OF WASTED TOMATOES AND CATTLE DUNG FOR BIOGAS PRODUCTION. Iv Simeonov J Univ Chem Technol Metall. 2009.

88. Silva-Beltrán NP, Ruiz-Cruz S, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Ornelas-Paz JDJ, López-Mata MA, et al. Total Phenolic, Flavonoid, Tomatine, and Tomatidine Contents and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts of Tomato Plant. Int J Anal Chem. 2015;2015. doi:10.1155/2015/284071

89. Mitchell G, Gattuso M, Grondin G, Marsault É, Bouarab K, Malouin F. Tomatidine inhibits replication of Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55: 1937–1945. doi:10.1128/AAC.01468-10

90. Bednarek P, Osbourn A. Plant-microbe interactions: Chemical diversity in plant defense. Science. 2009. pp. 746–748. doi:10.1126/science.1171661

91. Cherdthong A. Potential use of rumen digesta as ruminant diet—a review. Tropical Animal Health and Production. Springer; 2020. pp. 1–6. doi:10.1007/s11250-019-02018-6

92. Moukazis I, Pellera F-M, Gidarakos E. Slaughterhouse by-products treatment using anaerobic digestion. Waste Manag. 2018;71: 652–662. doi:10.1016/J.WASMAN.2017.07.009

93. Vágóhidak élőállat-vágása Magyarországon, éves adatok. [cited 1 Apr 2021]. Available: https://elir.aki.gov.hu/cikk/vagohidak-eloallat-vagasa-magyarorszagon-eves-adatok

94. Elfaki MOA, Elfaki MOA, Abdelatti KA. Nutritive Evaluation of Rumen Content from Cattle, Camel, Sheep and Goat. Glob J Anim Sci Res. 2015;3: 617–621. Available: http://www.gjasr.com/index.php/GJASR/article/view/312

95. Pathak AK. Various factors affecting microbial protein synthesis in the rumen. Vet World. 2008. doi:10.14202/vetworld.2014.168-171

96. Sakaba AM, Hassan AU, Harande IS, Maiyama FA, Danbare BM. Proximate composition of rumen digesta from sheep slaughtered in Zuru Abattoir, Kebbi State, Nigeria. J Agric Sci Pract. 2017;2: 86–89. doi:10.31248/JASP2017.057

97. Uddin MJ, Hossain MN, Kawsar MH. Recycling of rumen digesta: A substitute of goat feed and means of decreasing environmental pollution. 2018;11: 1–07. doi:10.9790/2380-1102010107

98. Budiyono B, Widiasa IN, Johari S, Sunarso S. Increasing Biogas Production Rate from

Cattle Manure Using Rumen Fluid as Inoculums. Int J Sci Eng. 2014;6. doi:10.12777/ijse.6.1.31-38

99. Rabiu A, Yaakub H, Liang JB, Samsudin. Increasing biogas production of rumen fluid using cattle manure collected at different time as a substrate. 2014. Available: www.iosrjournals.orgwww.iosrjournals.org

100. Hackmann TJ, Spain JN. Invited review: Ruminant ecology and evolution: Perspectives useful to ruminant livestock research and production. J Dairy Sci. 2010;93: 1320–1334. doi:10.3168/jds.2009-2071

101. Gabriella NDD. Állatélettan. Debrecen; 2012. Available: http://www.agr.unideb.hu/ebook/allatelettan/index.html

102. Cammack KM, Austin KJ, Lamberson WR, Conant GC, Cunningham HC. Ruminnat nutrition symposium: Tiny but mighty: The role of the rumen microbes in livestock production. J Anim Sci. 2018;96: 752–770. doi:10.1093/jas/skx053

103. Russell JB, Rychlik JL. Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. Science (80-). 2001;292: 1119–1122. doi:10.1126/science.1058830

104. Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. ISME J. 2013;7: 1069–1079. doi:10.1038/ismej.2013.2

105. Flint HJ, Bayer EA. Plant Cell Wall Breakdown by Anaerobic Microorganisms from the Mammalian Digestive Tract. Ann N Y Acad Sci. 2008;1125: 280–288. doi:10.1196/annals.1419.022

106. Pertiwinin A, Susilowati E, . R, Agus Fitri N, Soeherman Y, Fahmi Habi M. Potential Test on Utilization of Cow's Rumen Fluid to Increase Biogas Production Rate and Methane Concentration in Biogas. Asian J Anim Sci. 2017;11: 82–87. doi:10.3923/ajas.2017.82.87

107. Ozbayram EG, Akyol Ç, Ince B, Karakoç C, Ince O. Rumen bacteria at work: bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure. J Appl Microbiol. 2018;124: 491–502. doi:10.1111/jam.13668

108. Jin W, Xu X, Yang F. Application of Rumen Microorganisms for Enhancing Biogas Production of Corn Straw and Livestock Manure in a Pilot-Scale Anaerobic Digestion System: Performance and Microbial Community Analysis. Energies. 2018;11: 920. doi:10.3390/en11040920

109. Yue Z-B, Li W-W, Yu H-Q. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol. 2013;128: 738–744. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.073

110. Hu ZH, Yu HQ. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. Process Biochem. 2005;40: 2371–2377. doi:10.1016/j.procbio.2004.09.021

111. Bayané A, Guiot SR. Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. Kluwer Academic Publishers; 2011. pp. 43–62. doi:10.1007/s11157-010-9209-4

112. Wirth R, Kádár G, Kakuk B, Maróti G, Bagi Z, Szilágyi Á, et al. The planktonic core microbiome and core functions in the cattle rumen by next generation sequencing. Front Microbiol. 2018;9: 2285. doi:10.3389/fmicb.2018.02285

113. Ghosh A, Mehta A, Khan AM. Metagenomic analysis and its applications. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics. Elsevier; 2018. pp. 184–193. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7

114. Ács N, Bagi Z, Rákhely G, Minárovics J, Nagy K, Kovács KL. Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. Bioresour Technol. 2015;186: 286–293. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.098

115. Balázs M, Rónavári A, Németh A, Bihari Z, Rutkai E, Bartos P, et al. Effect of DNA polymerases on PCR-DGGE patterns. Int Biodeterior Biodegrad. 2013;84: 244–249. doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.011

116. Escobar-Zepeda A, De León AVP, Sanchez-Flores A. The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. Frontiers in Genetics. Frontiers Media S.A.; 2015. p. 348. doi:10.3389/fgene.2015.00348

117. Qiang-long Z, Shi L, Peng G, Fei-shi L. High-throughput Sequencing Technology and Its Application. J Northeast Agric Univ (English Ed. 2014;21: 84–96. doi:10.1016/s1006-8104(14)60073-8

118. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. New Biotechnology. Elsevier; 2009. pp. 195–203. doi:10.1016/j.nbt.2008.12.009

119. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and

applications. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. Elsevier B.V.; 2014. pp. 1932–1941. doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.015

120. Kchouk M, Gibrat J-F, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. 2017. doi:10.4172/0974-8369.1000395

121. Xiao T, Zhou W. The third generation sequencing: The advanced approach to genetic diseases. Translational Pediatrics. AME Publishing Company; 2020. pp. 163–173. doi:10.21037/TP.2020.03.06

122. Van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology A Brief History of Sequencing Technology. Trends Genet. 2018;34: 666–681. doi:10.1016/j.tig.2018.05.008

123. Rausch P, Rühlemann M, Hermes BM, Doms S, Dagan T, Dierking K, et al. Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms. Microbiome. 2019;7: 133. doi:10.1186/s40168-019-0743-1

124. Escobar-Zepeda A, Godoy-Lozano EE, Raggi L, Segovia L, Merino E, Gutiérrez-Rios RM, et al. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. Sci Rep. 2018;8: 1–13. doi:10.1038/s41598-018-30515-5

125. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J Clin Microbiol. 2007;45: 2761–4. doi:10.1128/JCM.01228-07

126. Morris R, Schauer-Gimenez A, Bhattad U, Kearney C, Struble CA, Zitomer D, et al. Methyl coenzyme M reductase (mcrA) gene abundance correlates with activity measurements of methanogenic H2/CO2-enriched anaerobic biomass. Microb Biotechnol. 2014;7: 77–84. doi:10.1111/1751-7915.12094

127. Graspeuntner S, Loeper N, Künzel S, Baines JF, Rupp J. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. Sci Rep. 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-27757-8

128. Bukin YS, Galachyants YP, Morozov I V., Bukin S V., Zakharenko AS, Zemskaya TI. The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. Sci Data. 2019;6. doi:10.1038/sdata.2019.7

129. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. Nat Commun. 2019;10. doi:10.1038/s41467-019-13036-1

130. Peker N, Garcia-Croes S, Dijkhuizen B, Wiersma HH, van Zanten E, Wisselink G, et al. A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S–23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification. Front Microbiol. 2019;10: 620. doi:10.3389/fmicb.2019.00620

131. Potts LD, Perez Calderon LJ, Gubry-Rangin C, Witte U, Anderson JA. Characterisation of microbial communities of drill cuttings piles from offshore oil and gas installations. Mar Pollut Bull. 2019;142: 169–177. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.03.014

132. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology. Nature Publishing Group; 2019. pp. 852–857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9

133. BenIsrael M, Wanner P, Fernandes J, Burken JG, Aravena R, Parker BL, et al. Quantification of toluene phytoextraction rates and microbial biodegradation functional profiles at a fractured bedrock phytoremediation site. Sci Total Environ. 2020;707. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135890

134. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods. 2016;13: 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869

135. Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC. MEGAN analysis of metagenomic data. Genome Res. 2007;17: 377–386. doi:10.1101/gr.5969107

136. Huson DH, Beier S, Flade I, Górska A, El-Hadidi M, Mitra S, et al. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. PLoS Comput Biol. 2016;12. doi:10.1371/journal.pcbi.1004957

137. Hall M, Beiko RG. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2018. pp. 113–129. doi:10.1007/978-1-4939-8728-3_8

138. Keegan KP, Glass EM, Meyer F. MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function. Methods in Molecular Biology. Humana

Press Inc.; 2016. pp. 207–233. doi:10.1007/978-1-4939-3369-3_13

139. Minot SS, Krumm N, Greenfield NB. One Codex: A Sensitive and Accurate Data Platform for Genomic Microbial Identification. bioRxiv. 2015; 027607. doi:10.1101/027607

140. Mejeha OK, Head IM, Sherry A, McCann CM, Leary P, Jones DM, et al. Beyond N and P: The impact of Ni on crude oil biodegradation. Chemosphere. 2019;237. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124545

141. Shin B, Kim M, Zengler K, Chin KJ, Overholt WA, Gieg LM, et al. Anaerobic degradation of hexadecane and phenanthrene coupled to sulfate reduction by enriched consortia from northern Gulf of Mexico seafloor sediment. Sci Rep. 2019;9. doi:10.1038/s41598-018-36567-x

142. Sharma M, Nandy A, Taylor N, Venkatesan SV, Ozhukil Kollath V, Karan K, et al. Bioelectrochemical remediation of phenanthrene in a microbial fuel cell using an anaerobic consortium enriched from a hydrocarbon-contaminated site. J Hazard Mater. 2020;389. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121845

143. Wooley JC, Ye Y. Metagenomics: Facts and artifacts, and computational challenges. J Comput Sci Technol. 2010;25: 71–81. doi:10.1007/s11390-010-9306-4

144. Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. Nature. 2013;499: 431–437. doi:10.1038/nature12352

145. Walsh AM, Crispie F, O'Sullivan O, Finnegan L, Claesson MJ, Cotter PD. Species classifier choice is a key consideration when analysing low-complexity food microbiome data. Microbiome. 2018;6: 50. doi:10.1186/s40168-018-0437-0

146. Beghini F, McIver LJ, Blanco-Míguez A, Dubois L, Asnicar F, Maharjan S, et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. bioRxiv. bioRxiv; 2020. p. 2020.11.19.388223. doi:10.1101/2020.11.19.388223

147. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biol. 2014;15: R46. doi:10.1186/gb-2014-15-3-r46

148. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and

functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics. 2008;9: 386. doi:10.1186/1471-2105-9-386

149. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. Nature Methods. Nature Publishing Group; 2014. pp. 59–60. doi:10.1038/nmeth.3176

150. Pérez-Cobas AE, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Metagenomic approaches in microbial ecology: An update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. Microb Genomics. 2020;6: 1–22. doi:10.1099/mgen.0.000409

151. Laczi K, Erdeiné Kis Á, Szilágyi Á, Bounedjoum N, Bodor A, Vincze GE, et al. New Frontiers of Anaerobic Hydrocarbon Biodegradation in the Multi-Omics Era. Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 2886. doi:10.3389/fmicb.2020.590049

152. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. J Dairy Sci. 1991;74: 3583–3597. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(91)78551-2

153. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2019.

154. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. J Stat Softw. 2008;25: 1–18. doi:10.18637/jss.v025.i01

155. Kassambara A, Mundt F, Kassambara, A.; Mundt F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. URL http//www.sthda.com/english/rpkgs/factoextra BugReports. 2017.

156. McMurdie PPJ, Holmes S, Kindt R, Legendre P, O'Hara R, Metzker M, et al. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. Watson M, editor. PLoS One. 2013;8: e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217

157. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014;15: 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8

158. Kassambara A. ggpubr: "ggplot2" Based Publication Ready Plots. R package version 0.2. https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr. https://CRANR-project.org/package=ggpubr. 2018. doi:R package version 0.1.8

159. Andrews S. FastQC : A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

160. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics. 2016;32: 3047–3048. doi:10.1093/bioinformatics/btw354

161. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30: 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170

162. Bağcı C, Beier S, Górska A, Huson DH. Introduction to the analysis of environmental sequences: Metagenomics with MEGAN. Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2019. pp. 591–604. doi:10.1007/978-1-4939-9074-0_19

163. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. MetaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. Genome Res. 2017;27: 824–834. doi:10.1101/gr.213959.116

164. Mikheenko A, Saveliev V, Gurevich A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. Bioinformatics. 2015;32: 1088–1090. doi:10.1093/bioinformatics/btv697

165. Uritskiy G V., Diruggiero J, Taylor J. MetaWRAP - A flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis 08 Information and Computing Sciences 0803 Computer Software 08 Information and Computing Sciences 0806 Information Systems. Microbiome. 2018;6: 158. doi:10.1186/s40168-018-0541-1

166. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. 2015;25: 1043–1055. doi:10.1101/gr.186072.114

167. Chaumeil P-A, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Bioinformatics. 2019;36: 1925–1927. doi:10.1093/bioinformatics/btz848

168. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, Hernández-Plaza A, Forslund SK, Cook H, et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. Nucleic Acids Res. 2019;47: D309–D314. doi:10.1093/nar/gky1085

169. Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, von Mering C, et al. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by

eggNOG-Mapper. Mol Biol Evol. 2017;34: 2115–2122. doi:10.1093/molbev/msx148

170. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. Genome Res. 2009;19: 1639–1645. doi:10.1101/gr.092759.109

171. dos Santos AC, Ximenes E, Kim Y, Ladisch MR. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. Trends in Biotechnology. Elsevier Ltd; 2019. pp. 518–531. doi:10.1016/j.tibtech.2018.10.010

172. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, prcedures, and some applications). USDA Agr Handb. 1970 [cited 4 Jun 2019]. Available: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301156229

173. Wu M, Ye X, Chen K, Li W, Yuan J, Jiang X. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. Environ Pollut. 2017;223: 657–664. doi:10.1016/j.envpol.2017.01.079

174. Detman A, Mielecki D, Pleśniak Ł, Bucha M, Janiga M, Matyasik I, et al. Methane-yielding microbial communities processing lactate-rich substrates: A piece of the anaerobic digestion puzzle. Biotechnol Biofuels. 2018;11. doi:10.1186/s13068-018-1106-z

175. Zamanzadeh M, Hagen LH, Svensson K, Linjordet R, Horn SJ. Biogas production from food waste via co-digestion and digestion- effects on performance and microbial ecology. Sci Rep. 2017;7: 17664. doi:10.1038/s41598-017-15784-w

176. Westerholm M, Schnürer A. Microbial Responses to Different Operating Practices for Biogas Production Systems. Anaerobic Digestion. IntechOpen; 2019. doi:10.5772/intechopen.82815

177. Tapadia-Maheshwari S, Pore S, Engineer A, Shetty D, Dagar SS, Dhakephalkar PK. Illustration of the microbial community selected by optimized process and nutritional parameters resulting in enhanced biomethanation of rice straw without thermo-chemical pretreatment. Bioresour Technol. 2019;289. doi:10.1016/j.biortech.2019.121639

178. Abe K, Ueki A, Ohtaki Y, Kaku N, Watanabe K, Ueki K. Anaerocella delicata gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium in the phylum Bacteroidetes isolated from

a methanogenic reactor of cattle farms. J Gen Appl Microbiol. 2013;58: 405–412. doi:10.2323/jgam.58.405

179. Cook LE, Gang SS, Ihlan A, Maune M, Tanner RS, McInerney MJ, et al. Genome sequence of Acetomicrobium hydrogeniformans OS1. Genome Announc. 2018;6. doi:10.1128/genomeA.00581-18

180. Rettenmaier R, Duerr C, Neuhaus K, Liebl W, Zverlov V V. Comparison of sampling techniques and different media for the enrichment and isolation of cellulolytic organisms from biogas fermenters. Syst Appl Microbiol. 2019;42: 481–487. doi:10.1016/J.SYAPM.2019.05.002

181. Kim W, Hwang K, Shin SG, Lee S, Hwang S. Effect of high temperature on bacterial community dynamics in anaerobic acidogenesis using mesophilic sludge inoculum. Bioresour Technol. 2010;101. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.029

182. Weiß S, Tauber M, Somitsch W, Meincke R, Müller H, Berg G, et al. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite. Water Res. 2010;44: 1970–1980. doi:10.1016/j.watres.2009.11.048

183. Gharechahi J, Zahiri HS, Noghabi KA, Salekdeh GH. In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen. Syst Appl Microbiol. 2015;38: 67–76. doi:10.1016/j.syapm.2014.09.004

184. Koeck DE, Wibberg D, Maus I, Winkler A, Albersmeier A, Zverlov V V., et al. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile Ruminoclostridium cellulosi wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. J Biotechnol. 2014;188: 136–137. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.08.024

185. Rui J, Li J, Zhang S, Yan X, Wang Y, Li X. The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters. Biotechnol Biofuels. 2015;8: 158. doi:10.1186/s13068-015-0339-3

186. Costa OYA, Souto BM, Tupinambá DD, Bergmann JC, Kyaw CM, Kruger RH, et al. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. J Ind Microbiol Biotechnol. 2015;42: 73–84. doi:10.1007/s10295-014-1533-1

187. Brochier-Armanet C, Gribaldo S, Forterre P. Spotlight on the Thaumarchaeota. ISME Journal. 2012. pp. 227–230. doi:10.1038/ismej.2011.145

188. Pester M, Schleper C, Wagner M. The Thaumarchaeota: An emerging view of their phylogeny and ecophysiology. Curr Opin Microbiol. 2011;14: 300–306. doi:10.1016/j.mib.2011.04.007

189. Liu Y, Wachemo AC, Yuan HR, Li XJ. Anaerobic digestion performance and microbial community structure of corn stover in three-stage continuously stirred tank reactors. Bioresour Technol. 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.121339

190. Patel GB, Sprott GD. (No Title). Int J Syst Bacteriol. International Union of Microbiological Societies; 1990.

191. Cheng L, Qiu TL, Li X, Wang WD, Deng Y, Yin XB, et al. Isolation and characterization of Methanoculleus receptaculi sp. nov. from Shengli oil field, China. FEMS Microbiol Lett. 2008;285: 65–71. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01212.x

192. Wirth R, Kovács E, Maráti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Biotechnol Biofuels. 2012;5. doi:10.1186/1754-6834-5-41

193. Kakuk B, Kovács KL, Szuhaj M, Rákhely G, Bagi Z. Adaptation of continuous biogas reactors operating under wet fermentation conditions to dry conditions with corn stover as substrate. Anaerobe. 2017;46: 78–85. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.05.015

194. Huang H, Chen S, Van Doren J, Li D, Farichon C, He Y, et al. α-tomatine inhibits growth and induces apoptosis in HL-60 human myeloid leukemia cells. Mol Med Rep. 2015;11: 4573–4578. doi:10.3892/mmr.2015.3238

195. Poehlein A, Schneider D, Soh M, Daniel R, Seedorf H. Comparative genomic analysis of members of the genera methanosphaera and methanobrevibacter reveals distinct clades with specific potential metabolic functions. Archaea. 2018;2018. doi:10.1155/2018/7609847

196. Golyshina O V., Kublanov I V., Tran H, Korzhenkov AA, Lünsdorf H, Nechitaylo TY, et al. Biology of archaea from a novel family Cuniculiplasmataceae (Thermoplasmata) ubiquitous in hyperacidic environments. Sci Rep. 2016;6: 1–12. doi:10.1038/srep39034

197. Pampillón-González L, Ortiz-Cornejo NL, Luna-Guido M, Dendooven L, Navarro-Noya YE. Archaeal and Bacterial Community Structure in an Anaerobic Digestion Reactor (Lagoon Type) Used for Biogas Production at a Pig Farm. J Mol Microbiol Biotechnol. 2017;27: 306–317. doi:10.1159/000479108

198. Taconi KA, Zappi ME, Todd French W, Brown LR. Methanogenesis under acidic pH conditions in a semi-continuous reactor system. Bioresour Technol. 2008;99: 8075–8081. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.068

199. Abdul Rahman N, Parks DH, Vanwonterghem I, Morrison M, Tyson GW, Hugenholtz P. A Phylogenomic Analysis of the Bacterial Phylum Fibrobacteres. Front Microbiol. 2016;6: 1469. doi:10.3389/fmicb.2015.01469

200. Chow JM, Russell JB. Effect of pH and monensin on glucose transport by Fibrobacter succinogenes, a cellulolytic ruminal bacterium. Appl Environ Microbiol. 1992;58: 1115–1120. doi:10.1128/aem.58.4.1115-1120.1992

201. Kelly WJ, Leahy SC, Altermann E, Yeoman CJ, Dunne JC, Kong Z, et al. The glycobiome of the rumen bacterium butyrivibrio proteoclasticus B316T highlights adaptation to a polysaccharide-rich environment. PLoS One. 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0011942

202. Wang S, Hou X, Su H. Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions. Sci Rep. 2017;7: 1149. doi:10.1038/s41598-017-01298-y

203. Mishra P, Tulsani NJ, Jakhesara SJ, Dafale NA, Patil N V., Purohit HJ, et al. Exploring the eukaryotic diversity in rumen of Indian camel (Camelus dromedarius) using 18S rRNA amplicon sequencing. Arch Microbiol. 2020;202: 1861–1872. doi:10.1007/s00203-020-01897-w

204. Bowers RM, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Harmon-Smith M, Doud D, Reddy TBK, et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. Nature Biotechnology. Nature Publishing Group; 2017. pp. 725–731. doi:10.1038/nbt.3893

205. Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiology Reviews. Elsevier; 2003. pp. 663–693. doi:10.1016/S0168-6445(03)00072-X

206. La Reau AJ, Meier-Kolthoff JP, Suen G. Sequence-based analysis of the genus Ruminococcus resolves its phylogeny and reveals strong host association. Microb genomics. 2016;2: e000099. doi:10.1099/mgen.0.000099

207. Hanreich A, Schimpf U, Zakrzewski M, Schlüter A, Benndorf D, Heyer R, et al. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. Syst Appl Microbiol. 2013;36: 330–338. doi:10.1016/j.syapm.2013.03.006

208. Lau SKP, McNabb A, Woo GKS, Hoang L, Fung AMY, Chung LMW, et al. Catabacter hongkongensis gen. nov., sp. nov., isolated from blood cultures of patients from Hong Kong and Canada. J Clin Microbiol. 2007;45: 395–401. doi:10.1128/JCM.01831-06

209. Ács N, Szuhaj M, Wirth R, Bagi Z, Maróti G, Rákhely G, et al. Microbial Community Rearrangements in Power-to-Biomethane Reactors Employing Mesophilic Biogas Digestate. Front Energy Res. 2019;7. doi:10.3389/fenrg.2019.00132

210. Ara KZG, Månberger A, Gabriško M, Linares-Pastén JA, Jasilionis A, Friðjónsson ÓH, et al. Characterization and diversity of the complete set of GH family 3 enzymes from Rhodothermus marinus DSM 4253. Sci Rep. 2020;10: 1329. doi:10.1038/s41598-020-58015-5

211. Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer H, Henrissat B. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). BMC Evol Biol. 2012;12: 186. doi:10.1186/1471-2148-12-186

212. Ravachol J, Borne R, Tardif C, De Philip P, Fierobe HP. Characterization of all family-9 glycoside hydrolases synthesized by the cellulosome-producing bacterium Clostridium cellulolyticum. J Biol Chem. 2014;289: 7335–7348. doi:10.1074/jbc.M113.545046

213. Stam MR, Danchin EGJ, Rancurel C, Coutinho PM, Henrissat B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: Towards improved functional annotations of α-amylase-related proteins. Protein Eng Des Sel. 2006;19: 555–562. doi:10.1093/protein/gzl044

214. Gozu Y, Ishizaki Y, Hosoyama Y, Miyazaki T, Nishikawa A, Tonozuka T. A glycoside hydrolase family 31 dextranase with high transglucosylation activity from *Flavobacterium johnsoniae*. Biosci Biotechnol Biochem. 2016;80: 1562–1567. doi:10.1080/09168451.2016.1182852