

Biogáztermelő mikrobaközösségek molekuláris biológiai vizsgálata

Ph.D. értekezés

Ács Norbert

Témavezetők: Prof. Kovács L. Kornél

Dr. Bagi Zoltán

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

2014

Szeged

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	11
2	Irodalmi áttekintés.....	14
2.1	A biogáztermelés mikrobiológiai háttere.....	14
2.1.1	Hidrolizáló mikroorganizmusok.....	14
2.1.2	Acetogén baktériumok.....	15
2.1.3	Metanogén archaeabaktériumok.....	16
2.2	A biogáz felhasználása.....	20
2.3	A mikrobák azonosítására szolgáló módszerek.....	21
2.3.1	A DGGE módszer.....	24
2.3.2	A T-RFLP módszer.....	26
2.3.3	Real-Time PCR.....	28
3	CÉLKITŰZÉS.....	30
4	Anyagok és módszerek.....	31
4.1	Táploldatok, táptalajok illetve a felhasznált mikroorganizmusok.....	31
4.1.1	Luria-Bertani táptalaj.....	31
4.1.2	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> táploldata.....	31
4.1.3	<i>Enterobacter cloacae</i> táploldata (DSM1).....	32
4.1.4	A transzformálás során alkalmazott baktériumtörzs.....	33
4.1.5	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (DSM 8903).....	33
4.1.6	<i>Enterobacter cloacae</i> (DSM 16657).....	33
4.2	Folyamatos üzemű fermentáció.....	34
4.3	DNS izolálás.....	35

4.4	T-RFLP	36
4.4.1	PCR reakció.....	36
4.4.2	Restrikciós emésztés és kapilláris gélelektroforézis.....	38
4.4.3	T-RFLP adatfeldolgozás.....	40
4.5	Klónkönyvtárak készítése, elemzése valamint a T-RFLP mintázatokkal való összevetése.....	40
4.6	Real-Time PCR.....	43
5	Eredmények.....	45
5.1	Specifikus baktériumtörzsek monitorozása Real-Time PCR segítségével	45
5.1.1	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> nyomon követése	46
5.1.2	<i>Enterobacter cloacae</i> nyomon követése	49
5.2	A mikrobaközösségek monitorozása T-RFLP segítségével (<i>mcrA</i> gén)	53
5.2.1	A mikrobaközösség összetétele hagyományos fermentáció esetén.....	53
5.2.2	Fehérjében gazdag alapanyagon bekövetkező változások a mikrobaközösségben 59	
5.3	Mikrobiális mikrobaközösségek monitorozása T-RFLP segítségével (16S <i>rRNS</i> gén) 63	
5.3.1	OTU-1 (62 bp és 142 bp).....	64
5.3.2	OTU-2 (284 bp).....	65
5.3.3	OTU-3 (289-291 bp).....	65
5.4	Eubakteriális mikrobaközösségek monitorozása T-RFLP segítségével (16S <i>rRNS</i> gén) 66	
5.4.1	Fermentációs paraméterek és az azonosításhoz használt molekuláris biológiai módszerek.....	67
5.4.2	OTU -1 (84 bp).....	73
5.4.3	OTU-2 (150 bp).....	74

5.4.4	OTU-3 (179 bp).....	74
5.4.5	OTU-4 (533 bp).....	75
5.4.6	Kevésbé domináns csoportok.....	76
6	Összefoglalás.....	80
7	Irodalomjegyzék.....	84

Rövidítések jegyzéke

- 16S *rRNS*: a riboszomális ribonukleinsav kis alegysége
- ARDRA: Amplifikált riboszomális DNS restrikciós analízis
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, on-line szekvenciakereső alkalmazás
- bp: bázispár
- CHP: Combined Heat and Power, gázmotor, amelyet biogáz elégetésére alkalmaznak
- CTAB: cetil-trimetil-ammonium-bromid
- DGGE: denaturáló grádiens gélelektroforézis
- DNS: dezoxiribonukleinsav
- DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Német mikroba gyűjtemény
- *endA*: *Echerichia coli* endonukleáz nagy alegységének génje
- IPTG: Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
- LB: Luria-Bertani táptalaj
- LH-PCR: Hossz heterogenitás PCR
- *mcrA*: metil koenzim-M reduktáz enzim nagy alegységének génje
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- OD₆₀₀: 600 nanométeren mért optikai denzitás
- oTS: Szerves szárazanyag tartalom
- OTU: Működési taxonómiai egység
- PCR: Polimeráz láncreakció
- qPCR: Kvantitatív polimeráz láncreakció
- RDP: Riboszómális adatbázis projekt
- *recA*: *Echerichia coli* DNS hibajavító enzim nagy alegységének génje
- RFLP: Restrikciós fragment hossz polimorfizmus
- RISA: Riboszómális intergenikus kitöltőszakasz analízis
- rpm: Revolutions per minute (percenkénti fordulatszám)
- SDS: nátrium-dodecil-szulfát
- SET: Szukróz, TRIS, EDTA oldat

- TGGE: Hőmérséklet grádiens gélelektroforézis
- T-RF: Terminális restrikciós fragment
- T-RFLP: Terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus
- X-gal: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

Ábrajegyzék

1. ábra: Egy biogáz reaktorban található <i>Clostridium</i> faj elektronmikroszkópos képe a felszínén celluloszómákkal.	15
2. ábra: <i>Methanococcus jannaschii</i> elektronmikroszkópos képe	18
3. ábra: Egy biogáz üzemben működő gázmotor	20
4. ábra: Különböző baktériumok LB lemezen felnevelve	22
5. ábra: A polimeráz láncreakció elméleti működése.....	23
6. ábra: A 16S <i>rRNA</i> génekének sematikus felépítése.....	24
7. ábra: A DGGE analízis sematikus folyamatábrája	25
8. ábra: A T-RFLP analízis sematikus folyamatábrája.....	27
9. ábra: A klónkönyvtár készítés sematikus folyamatábrája	28
10. ábra: A Real-Time PCR sematikus működése	29
11. ábra: 5 literes folyamatos üzemű fermentorok sematikus felépítése.....	34
12. ábra: A polimeráz láncreakció során használt hőprofil	38
13. ábra: A termofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 4g oTS/l térterhelés mellett	46
14. ábra: <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 4g oTS/l térterhelés mellett.....	47
15. ábra: A termofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 8g oTS/l térterhelés mellett	48
16. ábra: <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 8g oTS/l térterhelés mellett.....	49

17. ábra: A mezofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 4g oTS/l térterhelés mellett	50
18. ábra: <i>Enterobacter cloacae</i> genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 4g oTS/l térterhelés mellett.....	51
19. ábra: A mezofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 8g oTS/l térterhelés mellett	52
20. ábra: <i>Enterobacter cloacae</i> genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 8g oTS/l térterhelés mellett.....	52
21. ábra: Az 1 hete kazeinnel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az <i>mcrA</i> gént vizsgálva	54
22. ábra: Az 1 hete vérrel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az <i>mcrA</i> gént vizsgálva....	55
23. ábra: Az 5 hétig kazeinnel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az <i>mcrA</i> gént vizsgálva.	60
24. ábra: Az 5 hétig vérrel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az <i>mcrA</i> gént vizsgálva. .	60
25. ábra: Az 1 hete kazeinnel táplált fermentor hasítási csúcissorozata a 16S <i>rRNS</i> gént vizsgálva	63
26. ábra: Az 1 hete vérrel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az 16S <i>rRNS</i> gént vizsgálva	64
27. ábra: A vizsgált fermentorok összesített gáztermelési görbéi	68
28. ábra: A vizsgált fermentorok napi gáztermelési görbéi.....	69
29. ábra: A vizsgált fermentorok összesített gáztermelési görbéi az intenzifikálás mértékével	70
30. ábra: <i>Enterobacter cloacae</i> genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban a fermentáció előrehaladtával.....	71

31. ábra: A silókukoricával etetett fermentor leoltás előtti hasítási csúcissorozata az eubakteriális 16S <i>rRNS</i> gént vizsgálva.....	72
32. ábra: A silókukoricával etetett fermentor hasítási csúcissorozata leoltás után hat héttel az eubakteriális 16S <i>rRNS</i> gént vizsgálva.....	72

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: Metanogén archaeabaktériumok osztályozása	17
2. táblázat: A polimeráz láncreakció során használt oldatok mennyisége	37
3. táblázat: A polimeráz láncreakció során használt primerek felsorolása.....	37
4. táblázat: A Real-Time PCR során felhasznált primerek.....	44

1 Bevezetés

Az energia az egyik legfontosabb tartópillére világunknak, melyben mindennapi életünket éljük. A hétköznapok minden aspektusát átszövi, fontosságára sokszor csak akkor döbbenünk rá, amikor hiányában szenvedünk. A modern társadalom elképzelhetetlen lenne például a villamos áram, vagy a földgáz nyújtotta előnyök nélkül. Mindazonáltal ahogyan az emberi társadalom fejlődik, az emberek átlagéletkora megnő és a technológiai vívmányok mindenki számára elérhetővé válnak, óhatatlanul is megnő az egy emberre eső átlag energiafogyasztás. Emellett a tradicionálisan használt, úgynevezett fosszilis energiahordozók ára is folyamatosan emelkedik a kereslet növekedésével, valamint a készletek fogyásával együtt. Ezekből a készletekből meghatározott mennyiséggel rendelkezünk, újabb lelőhelyeket már csak egyre nehezebben tudunk felkutatni, ami szintén árnövelő tényező. Talán ennél is nagyobb probléma a fosszilis energiahordozók fokozott használatával járó környezeti ártalom, ami szerepet játszik a globális klímaváltozás kialakulásában. Mindezek a leírt folyamatok együttes erővel hívják fel a figyelmünket arra, hogy drámai változás szükséges az energiapolitikában világszerte. Ez nevezetesen a sokak által hangoztatott megújuló energiahordozókat jelenti, hiszen ezeket a megfelelő módon kiaknázva majdnem korlátlan mértékben tudunk energiát előállítani, ami ráadásul olcsóbb is lehet a jelenleg használt energiahordozóknál. Véleményem szerint szükséges megemlíteni a sokak által veszélyesnek tartott nukleáris energiát, ami szintén a nem megújuló energiahordozók közé sorolható. Habár bizonyítottan hatásos illetve biztonságos nukleáris üzemeket lehet építeni manapság, a radioaktív hulladék elhelyezésének kérdése, és az esetleges üzemzavarok hatásaitól való félelem nagyon sok emberben ellenszenvet vált ki a fejlődés ezen iránya ellen.

Az emberiség számos módot fedezett fel, miként juthat környezetbarát megújuló energiához. Elég csak a víz, vagy szélmalomokra gondolni, amelyek évszázadokkal ezelőtt is szolgálták az akkori embereket. A technológiai fejlődés e területeket sem hagyta érintetlenül, hiszen egyre újabb és hatékonyabb módokat találtak fel akár a nap, a szél, a víz, vagy a geotermikus energia kiaknázására. Ennek köszönhetően manapság már sokkal nagyobb mennyiségű energiára tehetünk szert egységnyi idő alatt.

A megújuló energiahordozók számos válfaja közül kiemelném a biogázt, mint az egyik legígéretesebb zöld energiahordozót. Előállítására a biomassza anaerob erjesztésével érhető el. Jelentősége leginkább abban rejlik, hogy a mezőgazdaságban, vagy az egyéb iparban keletkezett szerves anyagokat, amelyek hulladéknak minősülnek, felhasználhatjuk ilyen módon energiatermelésre. Így nem csak a hulladék elhelyezés problémáját oldjuk meg, hiszen számos esetben biológiailag veszélyes anyagokról beszélünk, hanem egyúttal értékes energiát, illetve termőföld javító trágyát is nyerünk a fermentációs maradékból. A keletkezett biogáz felhasználására is több lehetőségünk van. Elégethetjük közvetlenül hőenergiát nyerve, vagy gázmotorokban, mellyel villamos energiát és hőenergiát is nyerünk egyúttal. Egyre elterjedtebb biogáz-hasznosítás az értékes metán tartalom tisztítása, amelyet megfelelő törvényi szabályozás és technikai feltételek biztosítása mellett a jelenleg is használt földgázhálózatba tudunk betáplálni, vagy üzemanyagként felhasználhatjuk. Érdekes megjegyezni, hogy a tisztítás során különválasztott szén-dioxid is felhasználható a későbbiekben például üvegházakban a növények vagy algák táplálására. A sokféle felhasználható alapanyag és a termék változatos hasznosítási lehetőségei teszik a biogázt az egyik legfontosabb zöld energiahordozóvá, amely a jelenleg használt fosszilis tüzelőanyagokat jelentős mértékben képes kiváltani.

A biogáz szerves anyagok anaerob lebomlása során keletkező gázkeverék. Komponensei a metán (50-70%), szén-dioxid (29-49%) illetve egyéb gázok (1%), mint például a kénhidrogén. A biogáz hasznosítás története nagyon messzire nyúlik vissza, egyesek szerint egészen az i.e. 10. századi Asszíriáig, illetve a 16. századi Perzsiáig. Írásos bizonyítékok szerint Van Helmont a 17. században fedezte fel, hogy éghető gáz keletkezik szerves anyagok bomlása során, Shirley fedezte fel 1677-ben a mocsárgázt, valamint Volta volt az, aki bebizonyította erről, hogy éghető anyag. Dalton 1804-ben mutatta ki belőle a metánt, de az igazán fontos előrelépést az jelentette, amikor Pasteur felfedezte, hogy azt mikrobák sokasága állítja elő. Mesterséges előállítására a 19. századi Indiára vezethető vissza. Az első biogáz üzem 1856-ban építették Mantungában, amelyet még egy követett nem sokkal később Bombayben. 1896-ban az angliai Exeterben már közvilágításra használták a biogázt, míg 1920 és 1930 között a szennyvíztelepek működése során keletkezett szennyvíziszapot kezdték el rothasztási céllal felhasználni. 1937-ben már 7 német nagyvárosban használtak biogáz üzemű szemétszállító autókat. Az ország a mai napig vezető szereppel bír a biogáz előállításának és

felhasználásának területén. Az Egyesült Államokban az első ipari biogáz-előállító üzem 1959-ben építették. Németországban és Dániában a II. világháborút követően kezdődtek a biogáz előállításával foglalkozó laboratóriumi kísérletek. Magyarországon az 1950-es évekig kellett várni a biogáztermelés iránti kísérletek beindítására, amikor is a Fővárosi Csatornázási Művek egyik szennyvíztisztító telepén kialakítottak egy biogáz fermentort. Mezőgazdasági eredetű biomassza és szerves trágya keverékét először a Pécsi Állami Gazdaság területén kezdtek el használni biogáz előállítására. Jelenleg több tízezer biogáz üzem működik szerte a világban. Európában torony magasan kiemelkedik Németország, a maga 60% feletti biogáz piaci részesedésével. Számos ország már most is jelentős mennyiségben használ zöld energiát egyrészt, hogy bizonyos normatíváknak feleljen meg, másrészt pedig, hogy csökkentse energiafüggőségüket más országoktól. Az Európai Unió elfogadott egy energiastratégiát, melynek értelmében a tagországoknak szigorú energiapolitikát kell követniük a fenntartható fejlődés elérése érdekében. Ennek értelmében Magyarország vállalta, hogy 2020-ig számos fejlesztést hajt végre a hazai energiaszektorban, melynek egyik kulcsfontosságú eleme a megújuló energiák felhasználásának 14,65%-ra történő emelése. Emellett növelnünk kell az energiahatékonyságot is, mintegy 20%-al, ami együtt jár az energia ésszerű, nem pazarló felhasználásával. Ezek mind fontos törekvések nem csak azon cél érdekében, hogy függetlenítsük az Európai Unió energiaszükségletét a drága keleti piactól, hanem hogy az emberek növekvő energiaszükségletét a környezet további károsítása nélkül elégítsük ki.

A biogáztermelés mikrobiológiája nagyon komplex rendszer, számos résztvevővel. Az alkotó mikrobák egy többlépcsős tápláléklánc-rendszeren keresztül valósítják meg a különféle szerves alapanyagok lebontását, és végső soron azok metánná illetve szén-dioxiddá alakítását. Alapvetően elmondhatjuk, hogy a közösség a túlélésre rendezkedik be, a biogáz csupán az anyagcsere-folyamataik mellékterméke, azonban ha helyesen választjuk meg a fermentáció körülményeit ezek a mikrobák igencsak hasznosak lehetnek számunkra. Számos kutatócsoport foglalkozik már évtizedek óta azzal, hogy feltérképezzék, milyen konkrét mikrobacsoportok vesznek részt a szerves anyagok lebontásában, a savképző illetve a metánképző szakaszban. Pontos ismeretek birtokában, a folyamatot jobban kiismerve nagy valószínűséggel hatékonyabbá tudjuk tenni a biogáz termelését, ami megnöveli annak gazdasági potenciálját.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A biogáztermelés mikrobiológiai háttere

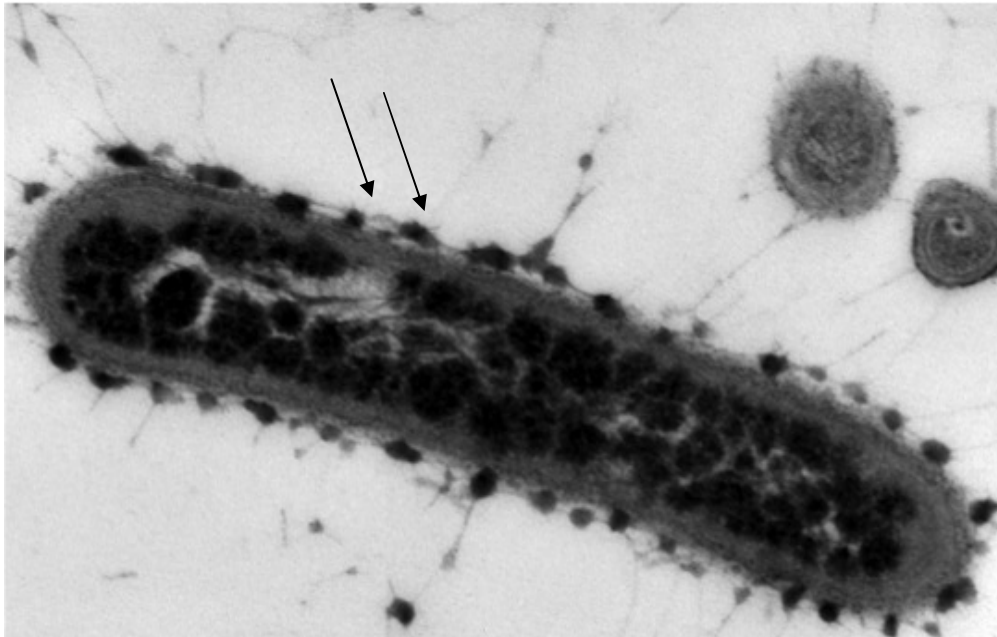
A biogáz fermentációban számos mikrobacsoport vesz részt, amelyeket több szempont szerint csoportosíthatunk. Mivel a rothasztási lépés mindig oxigéntől elzárt térben zajlik, célszerű a törzseket az oxigénnel szemben tanúsított toleranciájuk szerint felosztani. Ezek szerint megkülönböztetünk fakultatív és obligát anaerob törzseket. A közeg anaerobicitását a legjobban a redox potenciál értékkel jellemezhetjük. Ennek megfelelően egy rendszer akkor tekinthető anaerobnak, ha a benne mérhető redox potenciál -200mV alatti értéket mutat.

Emellett csoportosíthatjuk még a lebontásban résztvevő mikrobákat az általuk katalizált folyamatok szerint. Ennek megfelelően három lépcsőre oszthatjuk a biogáz termelésének fázisait. Az első képzeletbeli lépcsőfokon állnak az úgynevezett hidrolizáló baktériumok, amelyek a hosszú szénláncú polimerek bontását végzik. A második lépcsőben az acetogén baktériumok - felhasználva az előzőek által termelt oligo- és monomereket - illékony szerves savakat és hidrogént gyártanak. A harmadik lépcsőfokon a metanogén archaeabaktériumok helyezkednek el, amelyek ezeket az anyagokat felhasználva állítják elő a biogáz két fő alkotóelemét a metánt és a szén-dioxidot [1].

2.1.1 Hidrolizáló mikroorganizmusok

A hidrolizáló mikroorganizmusok közé tartoznak azon baktériumok, amelyek a fermentorban levő biomasszát felépítő polimereket (poliszacharidok, fehérjék, lipidek) különféle exoenzimekkel megtámadják, és apróbb darabokra hasítják őket. Az exoenzimek a hasító fehérjék azon fajtái, amelyek a sejten kívülre transzportálódnak, így az extracelluláris térben fejtik ki enzimatis aktivitásukat. Ennek köszönhetően olyan kisebb molekulák

fognak keletkezni, amelyeket a többi sejt fel tud venni, és tovább alakítani az endoenzimekkel, amelyek csak a sejt belsejében fejtik ki hatásukat. A metabolitokat akár közvetlen is felhasználhatják más törzsek. Számos mikrotörzs köztudottan jó exoenzimtermelő, ezek közül sok a *Bacillus*, illetve a *Clostridium* nemzetségbe tartozik [2], mint például az 1. ábrán látható faj.



1. ábra: Egy biogáz reaktorban található *Clostridium* faj elektronmikroszkópos képe a felszínén celluloszómákkal.

(forrás: <http://genmibio.de/mikrohh/pages/en/ag-streit.php?lang=EN>)

2.1.2 Acetogén baktériumok

Ebbe a csoportba tartozó mikrobák az előző törzsek által megtermelt mono és oligomereket használják fel saját anyagcsere-folyamataikban, melynek végterméke a különféle, rövid szénláncú szerves savak valamint hidrogén gáz. Utóbbi gátolja az acetogének növekedését, ezért ennek alacsony szinten tartása fontos azok túléléséhez. Kutatócsoportunkban elvégzett újabb kísérletek azt támasztják alá, hogy a hidrogén a fermentorban fontosabb szerepet játszik, mint azt korábban gondolták [3]. A hidrogénre limitáló faktorként tekintünk, ugyanis számos kísérlet bizonyította, hogy a többlet hidrogén a fermentorban többlet biogázhoz vezet. Az egyensúly és az alacsony hidrogén koncentráció

fenntartásában fontos szereplők a később bemutatásra kerülő hidrogenotróf metanogén törzsek. A savképző mikrobák szintrópikus kapcsolatban működnek együtt a metanogén mikrobákkal, hiszen bármelyik csoport optimális működéstől való eltérése a másik csoportra is negatív hatással lenne [1].

2.1.3 Metanogén archaeabaktériumok

A metanogének az élővilág harmadik, legősibb országába tartoznak, az archaeabaktériumok közé sorolja őket a rendszertan. Néhány tulajdonságban hasonlítanak a prokarióta törzsekre, például, hogy rendelkeznek sejtfallal, azonban azt nem a baktériumoknál megszokott murein, hanem egy hasonló molekula, a pseudomurein alkotja. Szintén hasonlóság, hogy rendelkeznek glicerín alapú foszfolipidekkel, amelyek azonban három fő tulajdonságban eltérnek a bakteriális foszfolipidektől. Az archaeális foszfolipid a bakteriális társához viszonyítva sztereokémiai izomer. Fontos különbség, hogy éterkötésekkel kapcsolják a glicerínhez a hidrofób lipid komponenseket, végül pedig abban is különböznek, hogy lipidjeik izoprénláncokból épülnek fel.

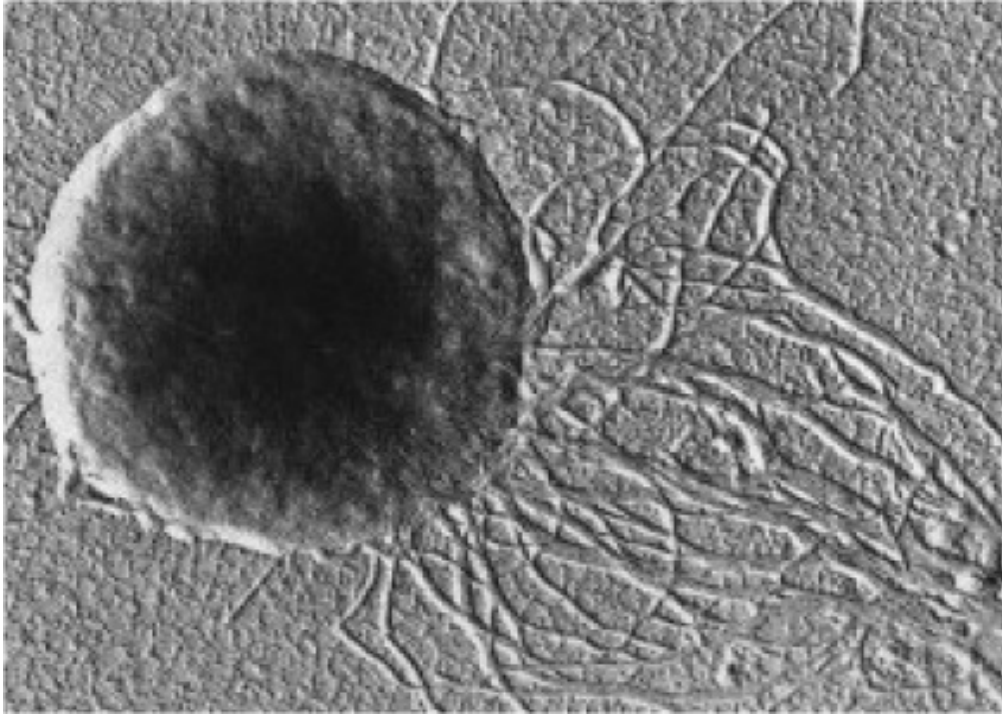
Előfordulásukat tekintve számos helyen megtalálhatóak az élővilágban. Sokszor olyan helyeken találkozhatunk ilyen mikrobákkal, ahol nagyon extrém körülmények alakulnak ki (mélytengeri hőforrások, gejzírek, nagyon sós, lúgos vagy savas vizekben). Ezeket a törzseket emiatt extremofil archaeáknak is nevezzük. Vannak közöttük mezofilok is, melyeknek működési optimuma a közepes hőmérsékleti tartományban található. Ilyen a legtöbb talajlakó, mocsár vagy vízben élő archaea, de ezek közé soroljuk a kérődzőek, illetve az egyéb élőlények (termesz, vagy akár az ember) emésztőtraktusát kolonizáló metanogéneket is.

Osztályozásuk a 16S *rRNS* gén szekvenciája alapján történik, amely felhasználásával jelenleg hat csoportot különböztethetünk meg, ezek a *Korarchaeota*, a *Thaumarchaeota*, az *Aigarchaeota*, a *Nanoarchaeota*, az *Euryarchaeota* és a *Crenarchaeota*. A metanogének az *Euryarchaeota* csoportba tartoznak, itt megkülönböztetünk 6 osztályt, illetve 12 családot (1. táblázat) [4].

Osztály	Család
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanothermaceae</i> , <i>Methanobacteriaceae</i>
<i>Methanocellales</i>	<i>Methanocellaceae</i>
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i> , <i>Methanospirillaceae</i> , <i>Methanocorpusculaceae</i>
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i> , <i>Methanosaetaceae</i> , <i>Methermicoccaceae</i>
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i> , <i>Methanocaldococcaceae</i>
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>

1. táblázat: Metanogén archaeabaktériumok osztályozása

Ezek a törzsek egytől egyig obligát anaerobok, jellemzően már nagyon csekély oxigén is letális lehet számukra a környezetben. Reprodukciós idejük a hőmérséklettől függ, de általánosságban elmondható, hogy szignifikánsan lassabb, mint a prokariótáké. Ezen tulajdonságoknak köszönhetően labor körülmények között tiszta metanogén kultúrát előállítani és fenntartani igencsak nehézkes [5]. A 2. ábrán egy, termofil biogáz reaktorokban tipikusan előforduló metanogén faj látható.

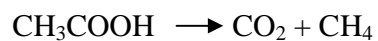


2. ábra: *Methanococcus jannaschii* elektronmikroszkópos képe
(forrás: <http://plantphys.info/organismal/lehtml/archaea.shtml>)

Anyagcsere folyamataik szempontjából három különféle metanogén csoportot különböztethetünk meg a felhasznált szubsztrátoknak megfelelően. Ezek a következők:

2.1.3.1 Acetotróf metanogének

Ezen törzsek az acetogének által megtermelt szerves savakat bontják metánná illetve szén-dioxiddá az alábbi általános képlet szerint:



Az így keletkezett szén-dioxid egy részét a hidrogenotróf metanogének használják fel metán előállítására. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy az előbb említett metanogén csoport gyorsabban szaporodik az acetotróf metanogénekénél, amelyek viszont bizonyítottan

érzékenyek a hidrogén koncentrációjára, ami szintén a hidrogén fontosságára hívja fel a figyelmünket.

2.1.3.2 Hidrogenotróf metanogének

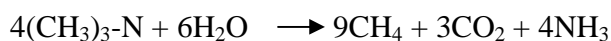
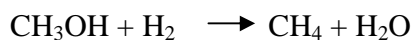
A metanogének ezen csoportja az előző csoport által termelt felesleg szén-dioxid egy részét használja fel az acetogének által termelt hidrogénnel és szén-dioxiddal energianyerésre, ezáltal megnövelve a biogázban a metán tartalmát. Ezt a következő reakcióegyenletnek megfelelően hajtják végre:



Működésüknek pozitív hatása nem csak a keletkező metán többletben rejlik, hanem ahogy korábban is szóba került, a hidrogén mennyiségét is alacsony szinten tartják a rendszerben.

2.1.3.3 Metilotróf metanogének

Az ebbe a csoportba tartozó törzsek jellemzően metil csoportot tartalmazó szubsztrátokat használnak fel (például metanol vagy metilamin). Közvetlenül a metil csoportból állítják elő a metánt, nem a szén-dioxidból. A folyamatra a következő reakcióegyenlet jellemző:



2.2 A biogáz felhasználása

A keletkezett biogáz felhasználására több lehetőség is adódik. A legtöbb esetben gázmotorokban (más néven CHP egységekben, 3. ábra) történő elégetés a legkézenfekvőbb az egyszerűsége miatt. Így elektromos áramot és hőt generálhatunk, az áramot a villamos energia hálózatba táplálhatjuk. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy ebben az esetben az energiahasznosítás lehetősége csökken a jelentős mennyiségben (50-60%) keletkező „hulladék hő” miatt. Ahhoz, hogy gazdaságossá tegyük az energia kinyerését, hasznosítanunk kell ezt a hőmennyiséget. Módunkban áll a hőenergiát víz segítségével felvenni, majd azt továbbítani a felhasználás helyére. Fűthetjük ezzel az energiával magát a fermentort, a telepen levő egyéb létesítményeket, vagy akár megfelelő elosztó hálózat segítségével épületeket is. Ha ezt a módot választjuk a biogáz kéntelenítése mindenképpen szükséges, mivel a kénlerakódás károsítja a gázmotor belső szerkezetét, így nagymértékben csökkenti annak élettartamát [6].



3. ábra: Egy biogáz üzemben működő gázmotor
(CHP: combined heat and power,
forrás: <http://www.bts-biogas.com/en/company/what-is-biogas.html#p.components.components-of-biogas>)

Egy másik megközelítés, ha a keletkezett biogázt tisztítjuk nemcsak a kénhidrogéntől, hanem a maradék szén-dioxidtól is. Az ily módon előállított, koncentrált (95-99%), tiszta biometán a mindennapokban használt földgázéval azonos tulajdonságokkal bír. Előnyként elmondható, hogy ily módon kevesebb az energia veszteség, illetve a földgázhálózat jó kiépítettségének köszönhetően nem ütközünk logisztikai akadályokba sem. Az elválasztott szén-dioxidot is felhasználhatjuk a továbbiakban, jó példa erre, ha üvegházak „táplálását” segítjük szén-dioxid bejuttatásával [7].

Bármelyik eljárást is választjuk a biogáz felhasználására, fermentációs maradék is fog keletkezni a rothasztás melléktermékeként. Azonban ennek a felhasználása is megoldott, jó hatásokkal használják szerves trágyaként, mezőgazdasági termelés alá vont területeken [8].

2.3 A mikrobák azonosítására szolgáló módszerek

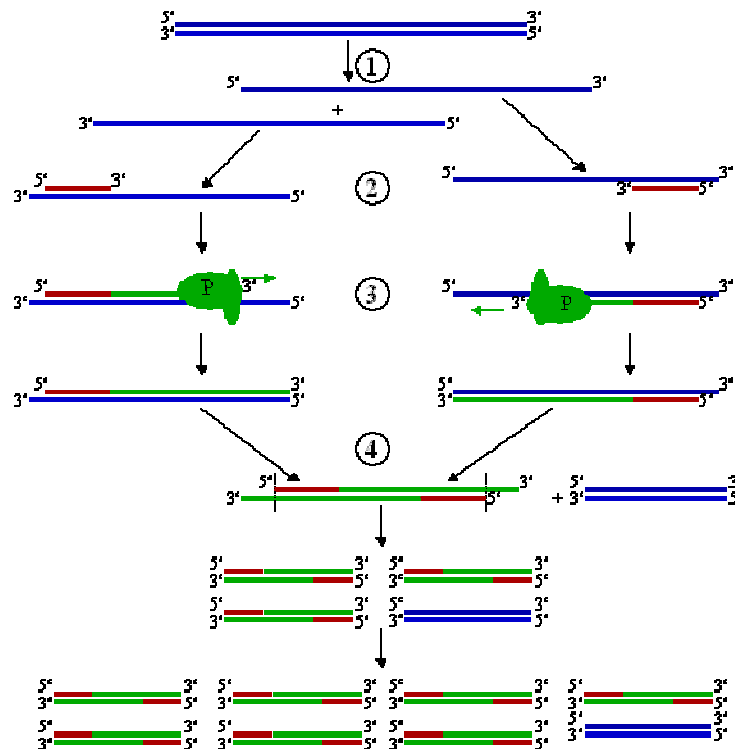
A mikrobák azonosítására szolgáló módszerek nagy múltra tekintenek vissza. A mára már hagyományosnak tekinthető technikák az úgynevezett tenyésztésen alapuló vizsgálati módszereket foglalják magukban. Ez legtöbbször a mikrobák agar lemez felszínén vagy folyadékkultúrában történő felszaporítását jelenti (4. ábra), amelyet sorozatos tisztítási lépések elvégzése után nevezhetünk tiszta kultúráknak. Ezeket aztán vizsgálhatjuk mikroszkópos technikákkal, telep morfológia alapján, festési eljárással vagy biokémiai módszerekkel is (Gram festés, kataláz próba, stb.). Hamar kiderült azonban, hogy ilyen eszközökkel a komplex mintákban megtalálható közösségnek sokszor csak nagyon kis százalékát (<1%) lehet vizsgálni. Ezt a jelenséget később „Great plate anomaly”-nak nevezték el, érzékeltetve, hogy habár mikroszkóp alatt nagyon sok különböző mikrobát lehet megfigyelni, tenyésztani, és fenntartani lényegesen kevesebbet sikerül [9].



4. ábra: Különféle baktériumok LB lemezen felnevesztve
(forrás:

<http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/12lophelia/logs/july16/media/marbactagar.html>)

Az igazi áttörést a molekuláris biológia jelentette, amely magával hozta a DNS alapon történő vizsgálati módszerek robbanásszerű fejlődését, ezáltal lehetővé téve a sokkal mélyebb betekintést a különféle mikrobiológiai rendszerekbe is. A DNS alapú technikákat két részre oszthatjuk, az egyik, amikor a közösségi DNS sokaságból kiemelünk egy szakaszt, például egy fajspecifikus markergént és azt vizsgáljuk tovább. A másik lehetőség, ha az egész közösségi DNS-t egy időben elemezzük. A dolgozat keretében az első típusú módszerekről lesz szó. Az ilyen technikákat szokás ujjlenyomat módszereknek is nevezni, hiszen a közösségben található mikrobákat egyedi szekvenciájuk, vagy „ujjlenyomatuk” alapján próbáljuk azonosítani. Általánosságban elmondható ezekről az eljárásokról, hogy polimeráz láncreakció (PCR) technikát használnak (5. ábra). A PCR elméleti és gyakorlati kivitelezése Karry Mullis nevéhez fűződik, aki Nobel díjat is kapott munkájáért [10]. Maga a módszer mára beleszótta magát a mindennapi molekuláris biológiai technikák közé, gyakorlatilag elképzelhetetlen lenne már egy molekuláris biológiai laboratórium PCR nélkül.



5. ábra: A polimeráz láncreakció elméleti működése
(1: denaturáció, 2: hibridizáció, 3: extenzió, 4: új DNS termék képződése az előbbi három lépés ciklikus ismétlésével)

Amennyiben a PCR-nél kevert genomi DNS-t használunk templatként, akkor multitemplát PCR-ről beszélünk. A termék is kevert DNS szakaszokat fog tartalmazni, amelyek méretben hasonlóak, vagy megegyezőek lehetnek, viszont bázissorrendben nem. A következőkben felvázolt módszerek arra hivatottak, hogy ezeket a termékeket hatékonyan elválasszák egymástól.

A célgén, amelyet ezek a technikák a legtöbb esetben vizsgálnak az az *rRNS* kis alegységének génje, más néven a 16S *rRNS* gén. Idővel ez a target nukleinsav szekvencia egy úgynevezett „arany standard”-á vált a molekuláris azonosítás területén, köszönhetően annak, hogy ez a gén univerzálisan megtalálható az élővilágban, a mérete (kb. 1500 bázispár) ideális az alkalmazott kimutatási módszerek számára, emellett rendelkezik konzervált illetve hipervariábilis régiókkal egyaránt (6. ábra). A kezdeti kutatások kizárólag e gént célozták meg legyen szó egyedi élőlények azonosításáról illetve rendszertani besorolásáról, vagy közösségek vizsgálatáról. Ennek köszönhetően egy más génekhez nem hasonlítható óriási

szekvencia-adatbázist sikerült létrehozni, ami megnehezíti egyéb célgének bevonását a hasonló taxonómiai kutatásokba, hiszen referenciák hiányában csak kevés számú homológ szekvenciát tudunk találni az adatbázisban történő keresés során [11, 12].



6. ábra: A 16S *rRNS* génjének sematikus felépítése
A zöld részek jelölik a konzervált régiókat, míg a V1-től V9-ig terjedő klaszterek a hipervariabilis szakaszokat mutatják.

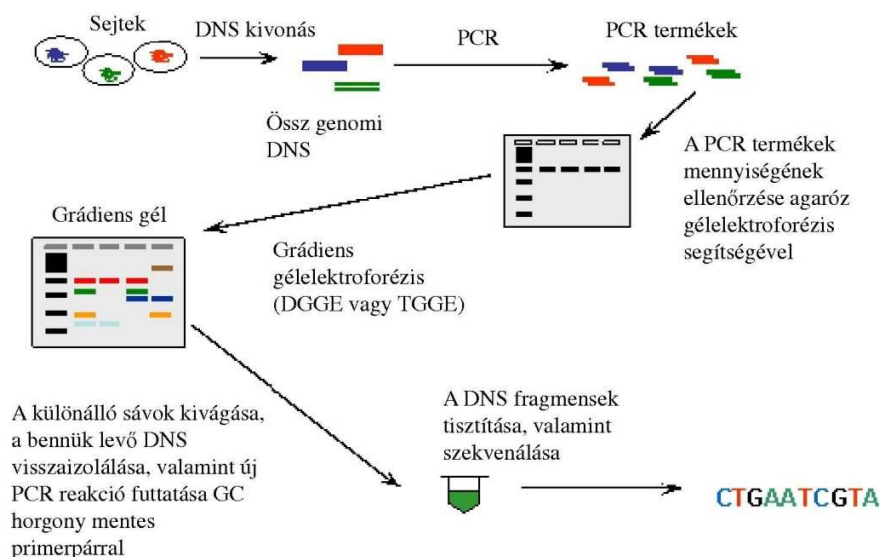
Ennek ellenére más célgének is teret nyerhetnek a molekuláris azonosításban főleg speciális alkalmazások területén. Egyik ilyen célgén, amely kimondottan fontos a biogáz fermentációkkal kapcsolatos kutatások szempontjából, a metil koenzim-M redukáz enzim nagy alegységének génje (*mcrA*), amely csak a metanogén törzsekben fordul elő. Kísérletek bizonyították, hogy a génszakasz alkalmas molekuláris azonosításra akár fajszinten is ezért kísérleteim során én is alkalmaztam a fajmeghatározás ez irányból történő megközelítését [13].

Számos ujjenyomat módszert dolgoztak ki az évek során, amelyeknek elsősorban speciális felhasználási területek igényeit szolgálták ki. Ilyen például az ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), a RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) vagy az LH-PCR (Length Heterogeneity PCR). Kettőt emelnék ki, mivel ezek a módszerek azok, amelyeket a legtöbben használnak molekuláris azonosításra.

2.3.1 A DGGE módszer

Az első ilyen módszer a DGGE, vagy denaturáló gradiens gélelektroforézis. Elmélete azon a megfigyelésen alapszik, hogy az eltérő bázissorrendű PCR termékeket denaturáló ágens (formamid, esetleg urea), vagy akár hőmérséklet gradiensben (ez esetben TGGE-ről beszélhetünk) futtatva, eltérő módon fognak egyes szálú formává alakulni. A gyakorlati kivitelezés általában poliakrilamid gélen történő elválasztást jelent, a gélt oly módon öntik

meg, hogy az a futással párhuzamos irányban lineárisan növekvő mennyiségben tartalmazza az alkalmazott denaturáló szert. Fontos megemlíteni még, hogy ez a technika speciális forward primereket tartalmaz, amelyek végén egy úgynevezett GC horgony található. Ennek az a szerepe, hogy megakadályozza a DNS szálak teljes szétválását a gélben. Az elektromos térben történő elválasztást követően a különféle bázissorrendű fragmensek a gélben eltérő helyen fognak megállni, ez korrelál a GC tartalmukkal. A futás végén a gélben levő DNS-t láthatóvá kell tenni, amely például interkalálódó festékekkel (etídium-bromid) történhet. A sávok vizualizálása után maga a mintázat is informatív lehet, azonban ha a konkrét fajazonosítás a célunk, akkor a sávokból visszaizolált DNS megszekvenálása által juthatunk további információhoz (7. ábra). A DGGE módszert előszeretettel használják számos környezeti minta esetében, hiszen relatíve könnyű kivitelezni, amennyiben megvan hozzá a megfelelő berendezés. Hátrányai közé sorolnám, hogy kevés számú sávot lehet nagy biztonsággal elkülöníteni egymástól, valamint hogy a megfelelő minőséget biztosító felszerelés költséges lehet [14, 15].

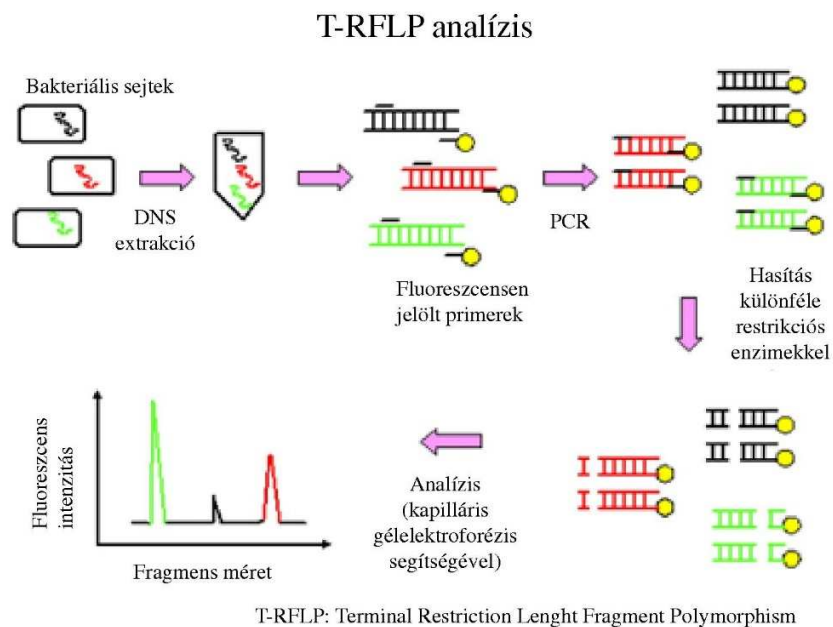


7. ábra: A DGGE analízis sematikus folyamatábrája

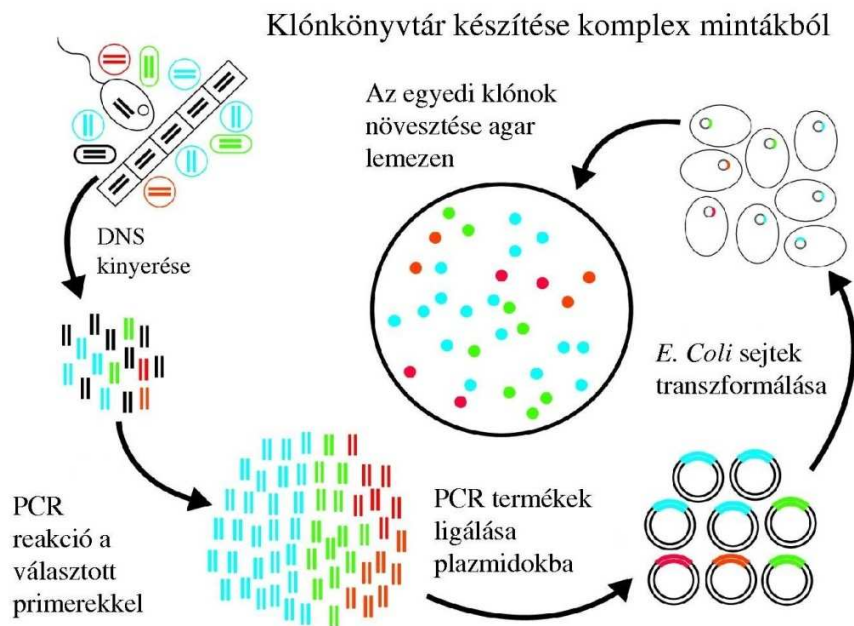
2.3.2 A T-RFLP módszer

A másik módszer, amellyel bővebben szeretnék foglalkozni, az általam is alkalmazott T-RFLP (Terminális fragment hossz polimorfizmus) eljárás. A technikai kifejlesztése Liu-hoz köthető, aki 1992-ben közölte munkáját [16]. Elképzelése azon alapult, hogy a különböző bázis sorrendű fragmenseket, amelyek a multitemplát PCR után keletkeznek, elválaszthatjuk a rajtuk különböző helyeken található restrikciós hasítási helyek alapján. Ehhez olyan hasító enzimekre van szükségünk, amelyek négy bázispáros felismerő hellyel rendelkeznek. Az RFLP módszer abban különbözik az itt tárgyalttól, hogy az esetben minden keletkező fragmentet vizsgálat alá vonunk. Ez azonban módfelett megbonyolítja az eredmények kiértékelését. Szükség volt a módszer finomítására, így született meg a T-RFLP. Ennél a technikánál csak a forward primerhez legközelebb eső DNS darabot vizsgáljuk annak köszönhetően, hogy arra a primerre egy fluoreszcens molekulát kapcsolunk. Így a hasított mintánkat kapilláris gélelektroforézissel megfuttatva, fluoreszcens detektor alkalmazása mellett a többi fragmens láthatatlanná válik, ezzel egyszerűsödik a restrikciós mintázat. Minden csúcs a kromatogramon elméletben egyféle DNS fragmensnek feleltethető meg. A módszer emellett szemi-kvantitatív jelleggel is bír, hiszen a keletkezett csúcs alatti terület nagyságából következtethetünk a mintában levő DNS fragment mennyiségére (8. ábra). Nagy áteresztőképesség jellemzi, mivel kis idő alatt számos mintát vizsgálhatunk vele. Amennyiben nem csupán a minta diverzitására, hanem a fajösszetételre is kíváncsiak vagyunk, arra is nyílik lehetőség. Ehhez szükséges egy klónkönyvtárat készítenünk párhuzamosan a hasítási mintázat mellé, ahonnan aztán véletlenszerűen kiválasztott pozitív klónokat vizsgálhatunk ugyanolyan módon, ahogyan a csúcssorozatot készítettük el (9. ábra). A klónkönyvár készítése jó módszer arra, hogy a kevert DNS darabokat különválogassuk, hiszen minden klónozó vektorba csupán egy DNS fragmens kerülhet, amelyet aztán tovább vizsgálhatunk. Az így kapott egyedi csúcsokat ráilleszthetjük a hasítási csúcssorozatra, amelyből aztán következtethetünk arra, hogy melyik TR-F (terminális fragmens) feleltethető meg neki. Ha kellő számú klónt vizsgálunk meg, akkor azonosíthatjuk a domináns csúcsokhoz tartozó fajokat is oly módon, hogy a vektorba beépített DNS fragmentet szekvenálásnak vetjük alá. A kapott szekvencia adatokat felhasználhatjuk különféle internetes adatbázisban történő homológia keresésre, amelyből fény derülhet a keresett törzs kilétére. Természetesen ennek a módszernek is vannak

hátrányai, például hibát eredményezhet, hogy PCR alapú detektálásról van szó, melynek köztudottan van egy bizonyos hibagyakorisága. Emellett a kivitelezéséhez szükséges egy viszonylag drága kapilláris gélelektroforézis berendezés. Technikai hátrálynak nevezhető még, hogy különböző családba tartozó törzsek is adhatnak azonos mérettel rendelkező TR-F-eket, azonban ez részben kiküszöbölhető több restrikciós enzim alkalmazásával. Összességében azonban elmondható a T-RFLP technikáról, hogy megfelelő paramétereket alkalmazva jól reprodukálható, pontos eredményekkel szolgál, segítségével fontos információhoz juthatunk a mikrobaközösség felépítését illetően [17-20].



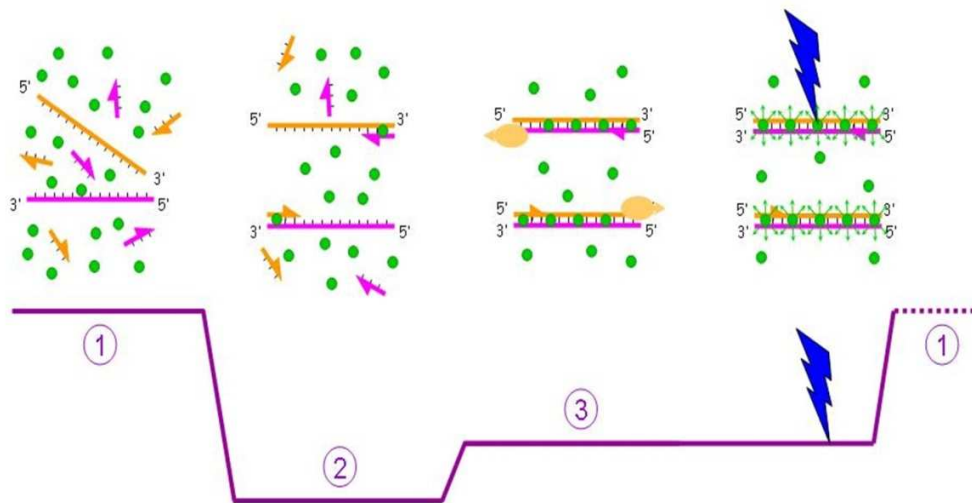
8. ábra: A T-RFLP analízis sematikus folyamatábrája



9. ábra: A klónkönyvtár készítés sematikus folyamatábrája

2.3.3 Real-Time PCR

Gyakran szükség van arra is, hogy ne az egész összetett közösséget vizsgáljuk, hanem egy, vagy néhány mikrobának a mennyiségi változását kövessük nyomon. Ennek vizsgálatára ma az egyik a legjobban használható módszer a Real-Time PCR, amely sokban hasonlít a hagyományos PCR eljáráshoz. Működése közben folyamatosan detektálja a keletkezett DNS terméket, köszönhetően a SYBR[®] Green nevet viselő interkalálódó DNS festéknek (10. ábra). A keletkezés üteméből a megfelelő szoftver kiszámítja, hogy a kiindulási mintában mennyi volt a keresett DNS szakasz. A módszer specifikus arra a mikrobára, amelynek jól kiválasztott egyedi génjére terveztük a primereket [21].



10. ábra: A Real-Time PCR sematikus működése

(1: denaturáció, 2: annealing, 3: extenzió. A fluoreszcens interkalálódó festéket a zöld körök jelentik, amelynek beépülésével megnő a 3. szakaszban detektált jelintenzitás)

3 CÉLKITŰZÉS

Manapság már köztudott tény, hogy társadalmunk jövője szorosan összefügg a megújuló energiahordozók fokozott alkalmazásával. Munkám során ezért célul tűztem ki, hogy minél behatóbb módon megismerjem számos biogáztermelő rendszer mikrobiológiai összetételét, illetve annak fluktuációját különféle paraméterek változása mellett. Ezen információk alaposabb tanulmányozása segítségünkre lehet abban, hogy hatékonyabbá tegyük a biomassza könnyen hasznosítható energiahordozóvá történő átalakítását és végső soron egy olcsóbb, stabilabb biogáz-termelési technológiát fejlesszünk ki. Ezeknek az új ismereteknek nagyon fontos szerepe van a fosszilis energiahordozók teljes vagy részleges kiváltására irányuló törekvésekben.

Munkám kivitelezéséhez a Real-Time PCR, valamint a T-RFLP módszereket választottam, amelyekről korábban számos esetben bebizonyult, hogy megbízható, reprodukálható technikák, messzemenőig alkalmasak az általam kiválasztott biogáztermelő rendszerek monitorozására.

Feladatul tűztem ki, hogy megvizsgáljam több mikroba integrálódását, illetve túlélését a biogáz reaktorok komplex mikrobiális rendszerébe. Emellett elhatároztam, hogy meghatározom számos, a szakirodalomban eddig nem vizsgált biogáz reaktor eubakteria, valamint archaea közösségét, különös tekintettel a domináns fajokra, valamint azok időbeli változására a fermentációs körülmények függvényében jobban megértve ezáltal ezen komplex rendszerek működését. Ez a tudás végső soron elősegítheti a biogáz jobb ipari alkalmazhatóságát, illetve a versenyképességét az energiapiacra.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Tápoldatok, táptalajok illetve a felhasznált mikroorganizmusok

4.1.1 Luria-Bertani táptalaj

Luria-Bertani, vagy LB táptalaj 1 literre vonatkoztatva:

- 10 g pepton
- 5 g élesztő kivonat
- 10 g NaCl

A tápoldat összeállítását követően a pH-t beállítottam 7,5-es értékre 1 M-os NaOH segítségével. Amennyiben agarlemezre volt szükségem, a fent felsoroltakon kívül 15g/l agar port is hozzámértem az oldathoz.

4.1.2 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* tápoldata

DSMZ Medium M640 1 literre vonatkoztatva:

- 0,9 g NH_4Cl
- 0,9 g NaCl
- 0,4 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,75 g KH_2PO_4
- 1,5 g K_2HPO_4
- 1 g élesztő kivonat
- 1 ml SL-10 nyomelem oldat

- 1 g cellobióz
- 0,75 g cisztein-HCl
- 0,5 mg rezazurin

A tápoldat összeállítását követően a pH-t 7,2-es értékre állítottam be 1 M-os NaOH segítségével.

4.1.3 *Enterobacter cloacae* tápoldata (DSM1)

1 literre vonatkoztatva:

- 3 g NaH₂PO₄
- 5,3 g K₂HPO₄
- 1 g NH₄Cl
- 1 g élesztő kivonat
- 5 g tripton
- 8 g NaCl
- 1 g glükóz
- bidesztillált víz

A tápoldat összeállítását követően a pH-t beállítottam 7,5-es értékre 1M-os NaOH segítségével.

4.1.4 A transzformálás során alkalmazott baktériumtörzs

Az *Escherichia coli* NovaBlue (K-12) törzset a kísérletsorozat transzformálási lépésénél használtam, amely egy ideális klónozó törzs, számos jó tulajdonsága miatt előszeretettel alkalmazzák a molekuláris biológiában. Magas transzformálási rátával rendelkezik, kék/fehér színszelekcióval tudtam elválasztani a pozitív klónokat a negatívoktól, emellett nagy mennyiségben termel plazmidokat köszönhetően a *recA* és *endA* génekben található mutációknak. Pontos fenotípusa: *endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'*{proA⁺B⁺ lacI^aZΔM15::Tn10}* (Tet^R).*

4.1.5 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (DSM 8903)

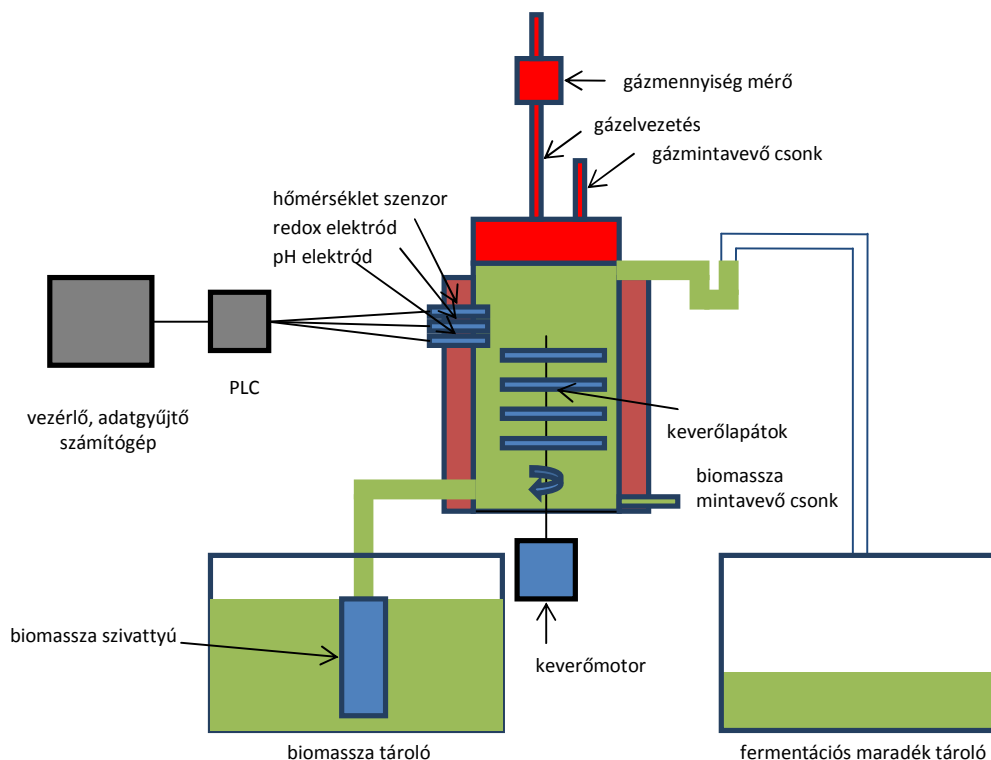
Termofil, Gram(+), obligát anaerob, pálcika alakú mikroorganizmus [22]. Növekedési hőmérsékletének optimuma 65-75°C. Jellegzetessége, hogy extracelluláris celluláz enzimekkel rendelkezik, valamint, hogy képes hidrogént termelni akár különleges szubsztrátokból is (agaróz, alginát) [23, 24]. Elsőként egy új-zélandi hőforrásból izolálták [22]. Növesztése rutinszerűen folyadék kultúrában történt anaerob körülmények között (DSM640 tápoldat), növekedésének ütemét spektrofotométer segítségével követtem nyomon (OD₆₀₀).

4.1.6 *Enterobacter cloacae* (DSM 16657)

Pálcika alakú, flagellummal rendelkező Gram(-), mezofil, fakultatív anaerob mikroba [25]. Elsősorban szennyvizekben, emlősök bélrendszerében, valamint az emberi bőrön, sőt egyes növényeken is megtalálható. Növekedésének hőmérsékleti optimuma 30°C. Növesztése folyadék kultúrában történt (DSM1 tápoldat), növekedésének ütemét spektrofotométer segítségével követtem nyomon (OD₆₀₀).

4.2 Folyamatos üzemű fermentáció

A folyamatos üzemű fermentációkat 5 literes térfogatú, speciálisan erre a célra egyedileg gyártott fermentorokban végeztem el (11. ábra) [26].



11. ábra: 5 literes folyamatos üzemű fermentorok sematikus felépítése

A reaktor hasznos térfogata 5l, felette egy liter gáztér található. A fermentort irányító program szabályozni képes a hőmérsékletet, míg a redox potenciált, pH-t, elmenő gázmennyiséget rögzíti minden 4. órában (naponta 6 mintavételi pont). A szubsztrát biomassza egy tároló tartályban kerül elhelyezésre, majd a kívánt tartózkodási idő függvényében a számítógép a megfelelő mennyiséget, meghatározott időközönként a rendszerbe adagolja. A keverés spirális keverőlapát segítségével történik. A fermentorokon kialakításra került egy gáz-, valamint egy folyadék mintavételi csonk. A fermentáció teljes időtartama alatt a pH-t, a hőmérsékletet, a tartózkodási időt (a naponta beadagolt friss biomassza mennyiségét) meghatározott értéken tartottam, a redox potenciált mértem.

A biogáz fermentációban szerepet játszó mikroba törzsek számára -300mV alatti redox potenciál érték az optimális. Amennyiben ezen paraméter értéke -300mV fölé emelkedett inert nitrogén gázzal mostam át a fermentorokat a megfelelő anaerobicitás kialakításának érdekében. A hőmérsékletet elektromos fűtőköpeny segítségével az automatika a kívánt hőmérsékleten,

+/- 0,2 °C-on tartotta. A pH-t 6,5-7,5 közötti tartományra állítottam be, amennyiben szükséges volt NaOH-t, illetve HCl-t adagoltam a reaktorokba.

4.3 DNS izolálás

A közösségi DNS kivonását a fermentorok folyadék fázisának különböző időközönként vett mintájából egy módosított protokoll [27] szerint valósítottam meg, amely egyaránt tartalmazott fizikai illetve kémiai sejteltáró módszereket. Erre azért volt szükség, hogy a közösségi mintázatot a lehető legjobban reprezentálja az izolált genomi DNS mennyiségében és összetételében egyaránt. Az izolálás első lépéseként a mintát centrifugáltam 13.000 rpm-en 5 percre, a szuszpenzióban levő sejtek összegyűjtésének céljából. Második lépésként 1 ml SET (20% szukróz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCL pH 8,0) oldatba szuszpendáltam az így kapott pelletet, amely tartalmazott 15 mg/ml lizozim enzimet, a sejtek jobb feltárhatósága érdekében. Az elegyet az enzim hőmérsékleti optimumának megfelelően 37 °C-on, 2 órán át inkubáltam. Ezt követően 20 percre centrifugáltam 13000 rpm-en, szobahőmérsékleten, melynek végén a felülúszót leöntöttem. Ezután a mintákhoz hozzáadtam 400 µl SET puffert és 200 µl 10 %-os SDS-t. Az SDS erős, negatív töltésű detergens, ami a sejthártya lebontásában játszik szerepet. 2 x 10 perc 75 °C-os vízfürdő következett, amelyek között folyékony nitrogénben fagyasztottam a mintákat a feltárás hatékonyságának növelésére. A 4 perc centrifugálást követően a felülúszót és a pelletet szétválasztottam, majd a DNS-t is tartalmazó felülúszóba 100 µl CTAB oldatot és 150 µl 5 M-os NaCl-ot pipettáztam. A CTAB egy pozitív fejcsoporttal rendelkező detergens, amely mátrixot képez, így további oldott, de nem kívánatos sejtalkotókat elválaszthattam a DNS-től, a NaCl pedig a folyamatot segíti elő. Az elkészült oldatot szintén 2 x 10 percre inkubáltam 75 °C-os vízfürdőben. Ezután a felülúszót 600 µl kloroform-izoamil alkohollal történő extrakcióval tisztítottam meg a

fehérjéktől. Az elegyet 15 percig centrifugáltam 13000 rpm-en, szobahőmérsékleten, majd a vizes fázist lepipettáztam. A következő lépés a DNS kicsapása volt, amit 600 µl izopropanol hozzáadásával valósítottam meg. A 13.000 rpm-en 30 percig tartó 4 °C-on való centrifugálás után a vizes fázist leöntöttem majd 70 %-os etanollal mostam a kicsapódott DNS-t, amit ugyanazon körülmények között 10 percig centrifugáltam. Végző lépésként a felülúszót eltávolítottam, a tisztított DNS-t levegőn szárítottam, majd steril bidesztillált vízben visszaoldottam. A kapott tiszta genomi DNS mennyiségét nanodrop ND-1000 fotométer (Thermo Scientific) segítségével vizsgáltam [28], valamint ellenőriztem annak integritását agaróz gélelektroforézissel [29]. A sikeresen izolált DNS mintákat további felhasználásig -20 °C-on tároltam.

4.4 T-RFLP

4.4.1 PCR reakció

A multitemplát PCR reakció céljánje egyrészt a 16S *rRNS* egy megközelítőleg 500 bázispár (bp) méretű szakasza volt mind a baktériumok, mind az archaeák esetében [30]. Másrészt pedig a korábban említett *mcrA* egy génszakaszára esett a választás, amit kimondottan metanogén törzsek detektálására használtam. Ehhez az alábbi táblázat szerint mértem össze a reakcióelegyet. Kísérleteim során a DreamTaq (Fermentas) enzimet használtam, amely a hagyományosan használt Taq polimeráz egy továbbfejlesztett változata. A Taq polimeráz enzimek hajlamosak 1-1 adenin nukleotiddal megtoldani a PCR terméket. A jelenséget egy speciális klónozó kitet alkalmazva használtam ki [31].

PCR reakcióelegy összetételét 30 µl végtérfogatban a 2. táblázat mutatja be:

Reverz primer (10µM):	0,8µl
Forward primer (10µM):	0,8µl
dNTP mix (10µM):	0,6µl
Puffer (10X – Dream Taq Buffer):	3µl
MgCl ₂ (25mM):	2µl
Enzim (Dream Taq):	0,3µl
dH ₂ O (steril):	22,5µl

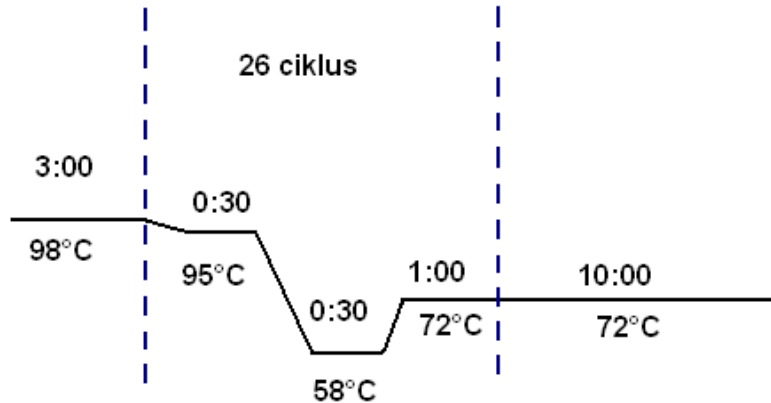
2. táblázat: A polimeráz lánreakció során használt oldatok mennyisége

A felhasznált primereket a 3. táblázat foglalja össze:

Primer	szekvencia (5' → 3')	megjegyzés
F-27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(TET) fluoreszcens festékkel jelölt
R-519	GTATTACCGCGGCTGCTG	
F-344	TETACGGGGCGCAGCAGGCGCGA	(TET) fluoreszcens festékkel jelölt
R-934	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	
mcrA-F	GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYG CWACAGC	(TET) fluoreszcens festékkel jelölt
mcrA-R	TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	

3. táblázat: A polimeráz lánreakció során használt primerek felsorolása

A PCR reakció hőprofilját az alábbiak szerint találtam optimálisnak.



12. ábra: A polimeráz láncreakció során használt hőprofil

A PCR reakció után (12. ábra) kapott DNS fragmentumokat agaróz gélen történő futtatással ellenőriztem. Azokkal a mintákkal dolgoztam tovább, amelyek a várt mérettartományban adtak megfelelő mennyiségű jelet.

4.4.2 Restriktions emésztés és kapilláris gélelektroforézis

A vizsgált mintákat számos restriktions endonukleázzal emésztettem az optimális enzim kiválasztása céljából. A restriktions mintázat alapján döntöttem el, hogy melyiket használjam a továbbiakban. Minden esetben olyan enzimet választottam, amely 4 felismerő hellyel rendelkezett. Erre azért volt szükség, mert a felsokszorozott DNS darabokat minél jobban el kell választani egymástól a hasítás által, így a cél az volt, hogy minél több egyedi csúcsot lássak a csúcssorozaton. A reakciót a gyártó utasításainak megfelelően végeztem el, amely a következő komponenseket tartalmazta:

0,3 µl restriktions enzim (Fermentas)

2 µl Tango puffer (Fermentas)

4 µl PCR termék

Kiegészítve bidesztillált vízzel (20 µl végtérfogatra)

Az így kapott elegyet kémcsőkeverő segítségével alaposan fel kell keverni. Ezt követően 3 órás inkubáció következik 37 °C-on. A következő lépésben etanolos kicsapást végeztem, amely során a DNS alkoholos közegben kationokkal reagálva kicsapódik, így az megtisztítható az elektroforézist zavaró anyagoktól.

Reakcióban használt összetevők, mennyiségek, és módszerek:

3 µl Na-acetát (3M)

14,5 µl dH₂O (steril)

62,5 µl 96 % EtOH (az alkoholt vízelvonóként használjuk)

20 µl hasított PCR termék

Az elkészített keveréket, 20 percen át inkubáltam szobahőmérsékleten, majd centrifugáltam 13000 rpm-en, 4 °C-on szintén 20 percig. A Na-acetát a nukleinsavak kicsapódását segíti elő. Ezután a felülúszót óvatosan leöntöttem. A mintákhoz egyenként 250 µl jéghideg 70 %-os etanolt mértem, és kémcsőkeverő segítségével elkevertem. A 70 %-os jéghideg etanolban már csak a DNS csapódott ki, így megszabadulhattam a többi nem kívánatos komponensről, ami az oldatban maradt. Ezután újabb centrifugálási lépés következett 13000 rpm-en, 4 °C-on, 10 percig. A centrifugálást követően a felülúszót leöntöttem, majd szárítással az etanolt a mintákat tartalmazó csövekből teljesen eltávolítottam. A visszamaradt etanol ugyanis gátolja a további kísérleti lépéseket. Végül a tisztított DNS-t felvettem 20 µl bidesztillált vízben. További felhasználásig -20 °C-on tároltam. A kapilláris elektroforézis során egyszálú DNS molekulákra van szükség, ezt denaturálószer hozzáadásával (formamid) és magas hőmérséklet (98 °C, 5 perc) biztosításával értem el. Az alkalmazott reakcióelegy összetétele a következő volt: 15 µl HI-DI formamid (Life Technologies), 0,7 µl GeneScan LIZ-500 méretmarker (Life Technologies) és 2-6 µl hasított, tisztított DNS minta. Az elektroforézist ABI PrismTM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) berendezéssel végeztem POP-4[®] polimert alkalmazva, 60 °C-os hőmérsékleten, 10 mp injekciós és 28 perces futási idővel, 15 kV-on.

4.4.3 T-RFLP adatfeldolgozás

A restrikciós kromatogramok feldolgozását a GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems) program Microsatellite módszerével végeztem. Csak olyan futást fogadtam el, ahol a program a méretmarker minden csúcsát azonosította. A zajszűrést, illetve a legközelebbi egész számra való kerekítést a T-REX on-line elérhető T-RFLP kromatogram analizáló programmal végeztem el [32]. Emellett alkalmaztam még egy „*in silico*” hasítási mintázat elnevezésű meghatározást is, amelyre akkor volt szükség, amikor a kiértékelt kromatogramon túl közel voltak egymáshoz a restrikciós csúcsok. Ez esetben a szekvenálási eredményeket vettem alapul, melyeket megszabadítottam a megmaradt vektor szekvenciáktól, illetve az oda nem illő kiméráktól. Ezután a CloneManager 9.0 nevű programot használtam arra, hogy meghatározzam, milyen fragmenst kellett volna kapnom az adott enzimmel történő hasítás után. Mindezek elvégzésével megkaptam a vizsgált klónhoz tartozó *in silico* TR-F méretét.

4.5 Klónkönyvtárak készítése, elemzése valamint a T-RFLP mintázatokkal való összevetése

A klónkönyvtárak felállításához ugyanazt a PCR protokollt alkalmaztam, mint a hasítási csúcscsoport elkészítésénél, annyi különbséggel, hogy a fluoreszcensen jelölt primereket lecseréltem jelöletlen változatukra, valamint a végső extenziót megnöveltem 30 percre, hogy a lehető legtöbb termék esetében megkaphassam a szükséges túlnyúló adenin végeket. Ez az alkalmazott klónozó vektor miatt különösen fontos, ugyanis a gyárilag hasított cirkuláris DNS molekula mindkét végén timin túlnyúló nukleotidot tartalmaz, amely így megkönnyíti a klónozni kívánt inszert beépülését. A PCR terméket tisztítási lépésnek vettem alá, mivel a reakcióhoz szükséges puffer-komponensek zavarhatják a ligálást. Ezt a VioGen cég által forgalmazott DNA *Advanced*TM PCR termék tisztító kit segítségével oldottam meg, a gyártó leírásának megfelelően [33]. Az így kapott DNS szakaszokat beépítettem a Promega

cég által forgalmazott pGEM-T klónozó vektorba egy ligálási reakcióval, amelynek a komponenseit a következőkben foglalom össze:

1. 5 µl ligáz puffer
2. 3,5 µl tisztított DNS termék
3. 0,5 µl vektor (pGEM-T vektor)
4. 1 µl T4 DNS ligáz enzim

Ezeket az összetevőket óvatosan összekeverve, az elegyet 12 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. Az így kapott ligátumot kémiaiailag kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltam a következők szerint. Első lépésként a kompetens sejteket jégen kiolvasztottam. A ligáló reakció csöveit lecentrifugáltam, majd 5-5 µl-t mértem ki belőlük steril 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe, és jégen tartottam. A csövekhez 50 µl kémiai kompetens *E. coli* NovaBlue sejtet adtam, majd ezt követően jégen inkubáltam 20 percig. Az inkubáció lejárta után 55 másodpercig 42 °C-ra helyeztem, majd azonnal visszatettem jégre 2-3 percre. Ezzel a hősokkal a membránlipidek fluidabbá tehetők, emiatt átengedő képességük megnő. Az újbóli jeges kezeléssel a sejtek transzformációját segítettém elő. Az egyes csövekhez ezután 950 µl SOC médiumot adtam (összetétel: 2% tripton, 0.5% élesztő kivonat, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, valamint 20 mM glükóz), ennek az volt a célja, hogy a sejtek növekedését és regenerálódását elősegítsem. Ezt követően 1,5 órán át 37 °C-on rázatva tenyésztetem a transzformáns sejteket. Amikor az inkubáció lejárt, a szuszpenzióból 200-200 µl-t szélesztettem LB táptalajra, ami IPTG-t, X-galt, és ampicillint tartalmaz [34]. A szélesztést követően a lemezeket 37 °C-on 24 órán át inkubáltam. Azt tekintetem sikeres transzformálásnak, amelynél a fehér és kék telepek aránya szabad szemmel vizsgálva legalább 90-10% körül mozgott. Ezek után következhetett a pozitív transzformánsok csoportosítása, valamint tesztelése. A csoportba rendezést egy másik, ugyanolyan összetételű LB lemezre való átoltással értem el, ahol sorszámoztam a klónokat. Ezt követte a kolónia PCR, amely azt volt hivatott eldönteni, hogy a megfelelő méretű inszert található-e a vektorban. Ehhez a korábban részletezett PCR protokollt használtam azzal a különbséggel, hogy a primerpárt lecseréltem a vektoron tapadó M13-as elnevezésűre. A PCR termékeket itt is agaróz gélen

való futtatással ellenőriztem le, és csak azokkal a klónokkal dolgoztam tovább, amelyek megfelelő méretű jelet adtak. Az egyedi hasítási csúcsok kialakításához az előzőekben elkészített PCR terméket százszorosan kihígított változatát használtam templátként. Erre azért volt szükség, hogy ne a gazdasejt 16S rDNS szekvenciája sokszorozódjon fel a reakció során. Ezek után megkapjuk csak az inszertet felsokszorozott, tiszta formában, aminek a segítségével kinyerhetjük a klónok egyedi terminális fragmensét. Ezt a korábban már leírt hasítási protokoll segítségével végeztem el, amit ez esetben is alkoholos kicsapás követett, valamint a kapilláris futtatási paramétereket is a korábban leírtaknak megfelelően állítottam be. A vizsgálat végeztével megkaptam minden kiválasztott pozitív klón egyedi terminális restrikciós fragmentjét, amelyeket hozzárendeltem a klón számához, valamint azonosítottam a hasítási csúcissorozaton. Így módom nyílt a domináns csúcsokhoz tartozó klónok szelektálására, amelyek közül aztán azonosítás céljából kiválasztottam néhányat. Az azonosítás az inszert szekvenciájának meghatározásával kezdődött, amely Sanger szekvenálás útján valósítottam meg. Ehhez szükség volt a plazmid izolálására, amelyet a Sigma cég által forgalmazott plasmid miniprep kit segítségével oldottam meg a gyártó utasításainak megfelelően. A szekvenáló reakció a következőket tartalmazta:

1. 5 µl szekvenáló puffer
2. 5 µl tisztított plazmid DNS
3. 4 µl BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing reagens
4. 1 µl M13 forward primer (10 µM)
5. 5 µl dH₂O

A sikeres szekvenálást követően on-line felületen (Ribosomal Database Project, NCBI BLAST) kerestem azonosságokat az inszert DNS sorrendjével, ami alapján következtettem az ahhoz tartozó fajra.

4.6 Real-Time PCR

A Real-Time, vagy más néven q(uantitative)PCR technológiát az esetben alkalmaztam, amikor csak egy specifikus törzs nyomon követésére volt szükség. Specifikus primereket terveztem mind a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, mind pedig az *Enterobacter cloacae* baktériumtörzsek azonosítása céljából. Minden primerpárt a Life Technologies által forgalmazott Primer Express[®] for Real-Time PCR 3.0 program segítségével terveztem meg, a gyártó által meghatározott optimális beállításokat megtartva. A gének kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy máshol ritkán előforduló, ne háztartási gének legyenek, hanem az adott fajra jellemző specifikus fehérjetermékük legyen. Az első esetben két génre esett a választás (*echA*, vagyis extrém konzervált hidrogenáz nagy alegységének; illetve a *celA*, vagyis a celluláz enzim nagy alegységének a génjeire) [35], míg a második törzs esetében egy primerpár készült, amely a *hycE* gén egy szakaszát célozza meg, amely szintén egy hidrogenáz alegység [36]. Az alkalmazott primerpárok (4. táblázat) szelektivitását minden esetben ellenőriztem oly módon, hogy a PCR reakcióhoz olyan fermentorból izolált genomi DNS keveréket adtam, amelyben nem volt jelen a vizsgált törzs. Ezen kísérletek alapján kijelenthetem, hogy a használt primerek minden esetben megfelelően szelektívek voltak az adott törzsrre.

primer	szekvencia (5' → 3')
CelA-Fw	GGGTCCTGCTGAGGTTATGC
CelA-Rw	GCTAAGGAAGCTGCCGTCTCT
Ech-Fw	TCAGCACAGTTTCCGTTCCA
Ech-Rw	TCCTGCTTTTACCATTGTTACTTGAA
HycE-Fw	TGTTGCCGCGCAGCATGTAG
HycE-Rw	TGACCGGCGACAACCAGAAG

4. táblázat: A Real-Time PCR során felhasznált primerek

Kísérleteim során az Applied Biosystems által gyártott 7500 Real-Time PCR System berendezést használtam, az eredményeket pedig a hozzá tartozó SDS 1.4.1 szoftverrel értékeltem ki [37]. A reakcióelegy minden esetben a következőket tartalmazta:

1. 12,5 µl SYBR[®] Green master mix (Life Technologies)
2. 3-3 µl forward illetve reverz primer (1 µM)
3. 1 µl templát DNS (~10 ng)
4. 5,5 µl dH₂O

Az ismeretlen minták mellett futtattam templátmentes kontrollokat, valamint standardokat is, amelyek ismert koncentrációjú, az adott törzsből izolált tiszta genomi DNS-t tartalmaztak. Ezek segítségével a gép kalibrációs egyenest készítettem, amelyhez viszonyítva kiszámoltam a kiindulási mintákban levő törzsre specifikus DNS mennyiségét.

5 Eredmények

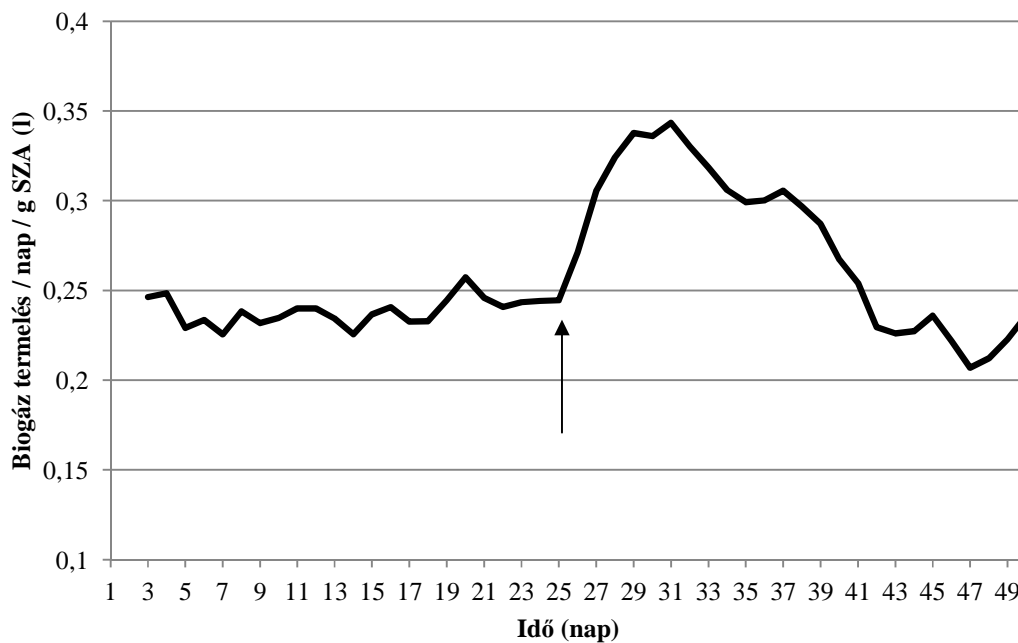
A biogáz igen ígéretes energiahordozó. Versenyképességét azonban rontja, hogy jelen pillanatban még a zöld energia ára nem veszi fel a versenyt a nem megújuló társaival szemben. Minél jobban sikerül megismernünk ezt a bonyolult biológiai közösséget, annál több lehetőségünk nyílik arra, hogy beavatkozzunk azokon a kritikus helyeken, ahol a reakció sebesség meghatározó pontjai vannak, így végső soron serkenthetjük a biogáz képződését. A közösség feltérképezését, illetve időbeni nyomon követését T-RFLP eljárással végeztem el, amely korábban is robusztus, és jól bevált módszernek bizonyult. Kísérleteim egy részét olyan szándékkal indítottam, hogy fényt derítsek egy kihígulási jelenségre, amelyet folyamatos fermentáció esetében tapasztaltunk. Ezt Real-Time PCR technika segítségével valósítottam meg, amely specifikus primerek segítségével kimutatja a törzsrre jellemző genomi DNS mennyiségét a kiindulási mintában. A terminális fragment hossz polimorfizmus módszert akkor alkalmaztam, amikor az egész közösséget vizsgáltam. Így lehetőségem nyílt a közösség domináns tagjainak azonosítására, valamint az időbeni változásokat is nyomon tudtam követni.

5.1 Specifikus baktériumtörzsek monitorozása Real-Time PCR segítségével

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy hidrogéntermelő törzs hozzáadásával megnövelhetjük a termelt biogáz mennyiségét [3]. Ez alátámasztotta azt a feltételezést, mely szerint a hidrogén az egyik fontos limitáló faktor a szerves anyagok anaerob lebontási folyamatban. A különféle mennyiségben leoltott szakaszos (batch) üzemű fermentorok esetén szignifikáns gáznövekedést tapasztaltunk többféle szubsztrátot alkalmazva. Folyamatos üzemű fermentációnál azonban a leoltást követő két hét után arra lettünk figyelmesek, hogy az intenzifikálási ráta lecsökkent, majd végül elérte a beoltás előtti szintet. Ez a jelenség mind termofil, mind pedig mezofil hőmérsékleti tartományban egyaránt fellépett. Célul tűztem ki ezért ennek a jelenségnek az alaposabb vizsgálatát, illetve a probléma megoldását.

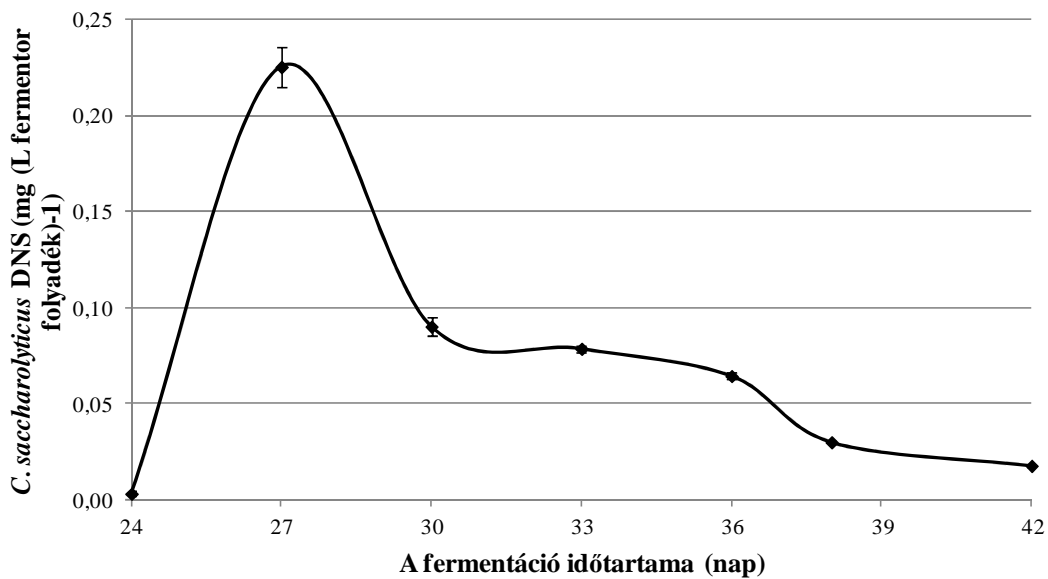
5.1.1 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* nyomon követése

Ez a termofil baktériumtörzs számos esetben hasznosnak bizonyult számunkra a biogáz-termelési céllal elvégzett kísérletek során, jó hidrogéntermelő és be tudott illeszkedni a biogáztermelő közösségbe.



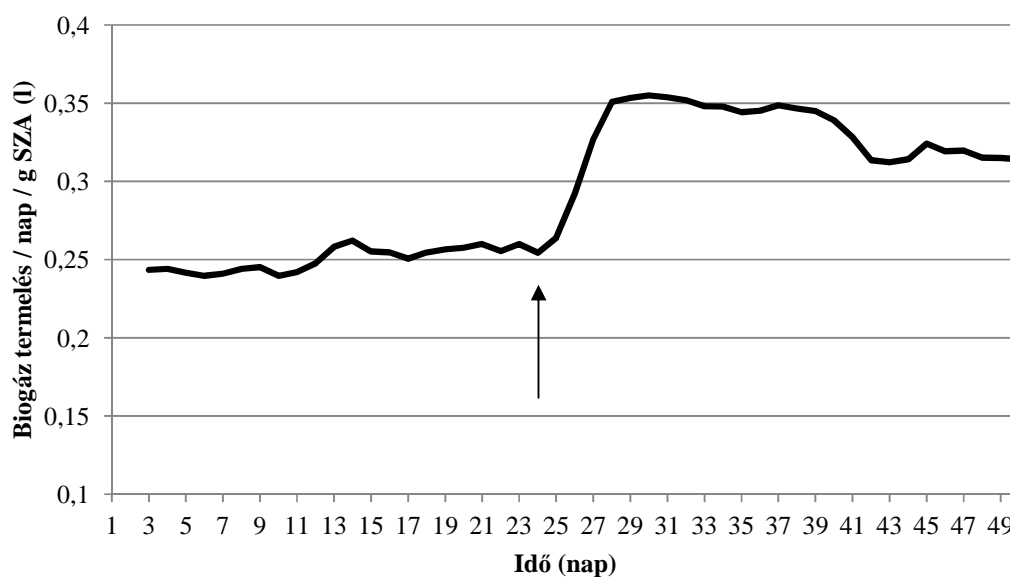
13. ábra: A termofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 4g oTS/l térterhelés mellett (a nyíl a leoltást jelöli)

A 13. ábrán tisztán kivehető, hogy a leoltást kisvártatva követte a biogáztermelésének növekedése, azonban ez a többlet gáz csak két hétig volt megfigyelhető, azután a napi gázhozam termelés visszaállt a leoltás előtti rátára. Kérdés volt, hogy ezzel párhuzamosan hogyan változik a fermentorban a leoltott törzsre jellemző DNS mennyisége. A qPCR reakció eredményeit mutatja a 14. ábra.



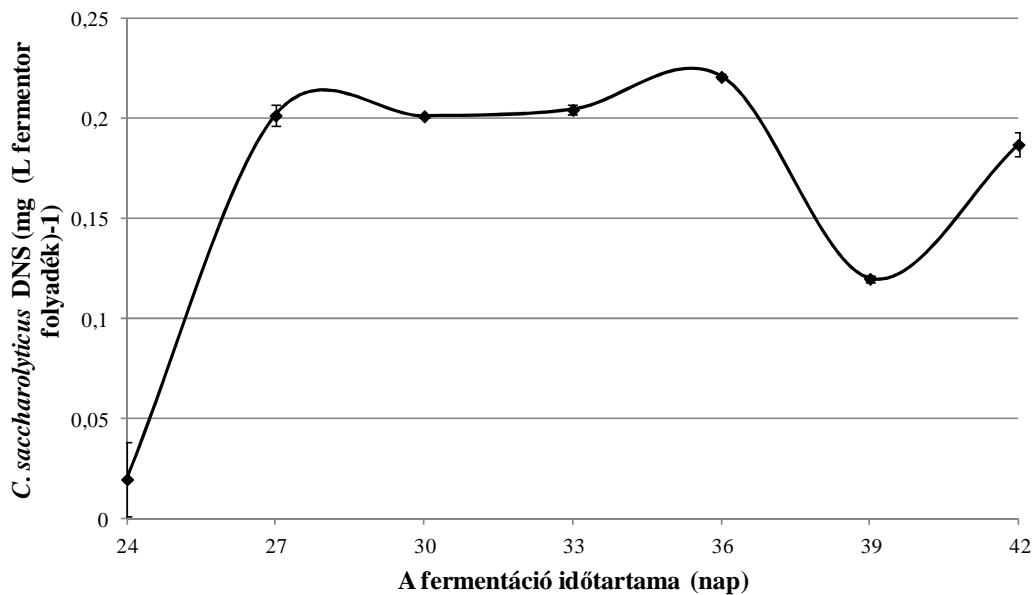
14. ábra: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 4g oTS/l térterhelés mellett.

Az eredményekből azt az egyértelmű következtetést vontam le, hogy a leoltott baktérium az idő előrehaladtával kihígul a rendszerből. Nagyon valószínű, hogy az intenzifikálás eltűnése ennek köszönhető. Szerettem volna megoldást találni a problémára, hogy a megnövekedett gázhozam tartósan fennmaradjon. Kézenfekvő volt a fermentálási paramétereket változtatni, hiszen a leoltott törzs számára valószínűleg nem voltak megfelelőek a körülmények a szaporodáshoz. A számos lehetőség közül, amelyet kipróbáltam egy tűnt célravezetőnek, a biomassza betáplálás növelése. A fermentációkat hagyományosan 4g oTS/l (szerves szárazanyag – organic total solid) értéken végeztem el, ami általánosan használt érték a biogáztermelésben. A következő fermentációt kétszeresre megnövelt biomassza adagolással folytattam le, amelynek a gázhozam görbáját a 15. ábra mutatja be.



15. ábra: A termofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 8g oTS/l terhelés mellett (a nyíl a leoltást jelöli).

Rögtön szembetűnik, hogy a beoltás után szinte azonnal megnövekedik a napi gázhozam értéke, amely valamennyit csökken a fermentáció előrehaladtával, de így is jóval meghaladja a korábban mért adatokat. A kísérletet technikai nehézségek miatt nem tudtuk tovább folytatni, az időközben vett mintákból izolált genomi DNS-t ez esetben is Real-Time PCR-rel vizsgáltam. A kapott eredményeket a 16. ábra foglalja össze. Itt is jól látható, hogy a beoltás után megjelenő jelintenzitás az idő előrehaladtával nem csökken szignifikánsan, hanem javarészt azonos mennyiségen áll. Ez alátámasztja a tényt, hogy a többlet gáztermelésért a leoltott törzs volt felelős, a megemelt biomassza betáplálás pedig jótékony hatással volt a baktériumra, fenn tudott maradni ebben a komplex rendszerben, és pozitívan tudott hozzájárulni a szerves anyagok anaerob lebontásához és a biogáztermeléshez.



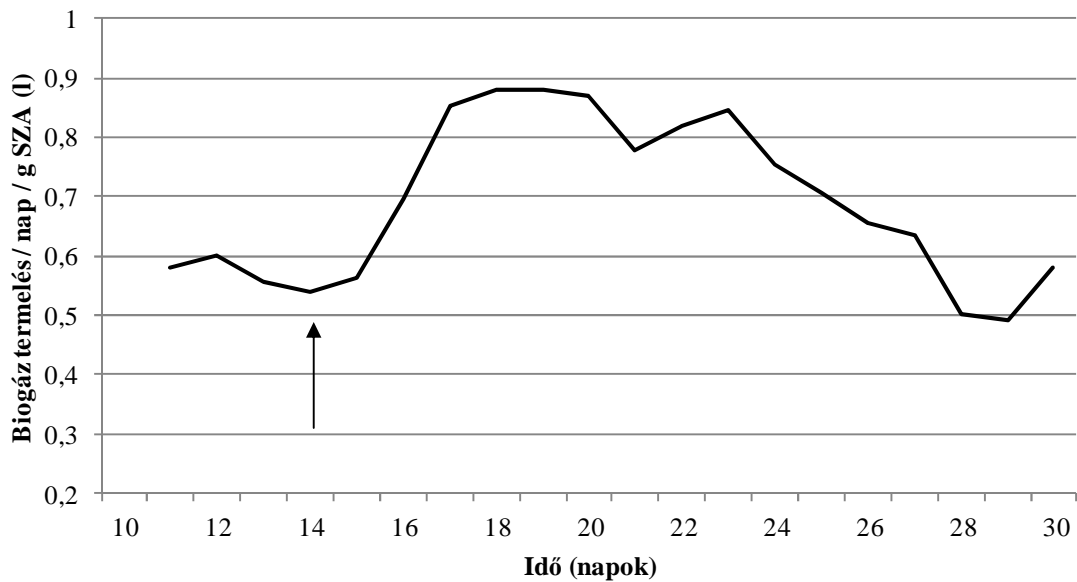
16. ábra: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 8g oTS/l térterhelés mellett.

Következésképpen sikeresen kimutattam egy leoltott hidrogéntermelő törzset a komplex, biogáztermelő rendszerből, valamint nyomon követtem annak mennyiségi változását az idő függvényében. Megállapítottam, hogy az intenzifikálás eltűnése minden valószínűség szerint a baktérium kihígulásának következtében történt alacsonyabb szervesanyag-terhelés esetén. A megfelelő paraméter (biomassza adagolás) megváltoztatása következtében sikerült a termofil törzset hosszú távon integrálni a biogáztermelő mikrobaközösségbe, ezt a detektált DNS mennyisége is alátámasztotta.

5.1.2 *Enterobacter cloacae* nyomon követése

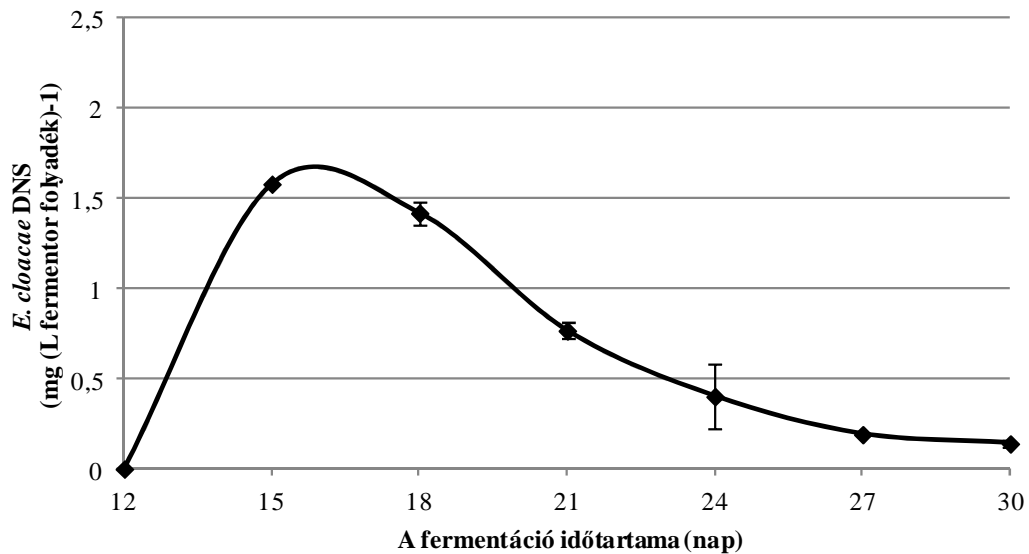
Ezt a mikroba törzset szintén azzal a céllal oltottam be a fermentorba, hogy ellenőrizzük a megtermelt többlet hidrogén pozitív hatását a gázkihozatalra alacsonyabb, mezofil hőmérsékleten (35-37°C) is. Az eredmény hasonló volt mint a termofil törzs esetében. Batch fermentálás esetén nyilvánvaló volt az intenzifikálás, azonban ekkor nem beszélhetünk kihígulásról, hiszen nincsen folyadék elvétel a rendszerből. Folyamatos fermentálás esetében

nagyjából a termofil rendszerhez hasonlóan, a beoltás után 2-3 héttel a napi gázhozam értékek visszatértek a beoltás előtti szintre (17. ábra).



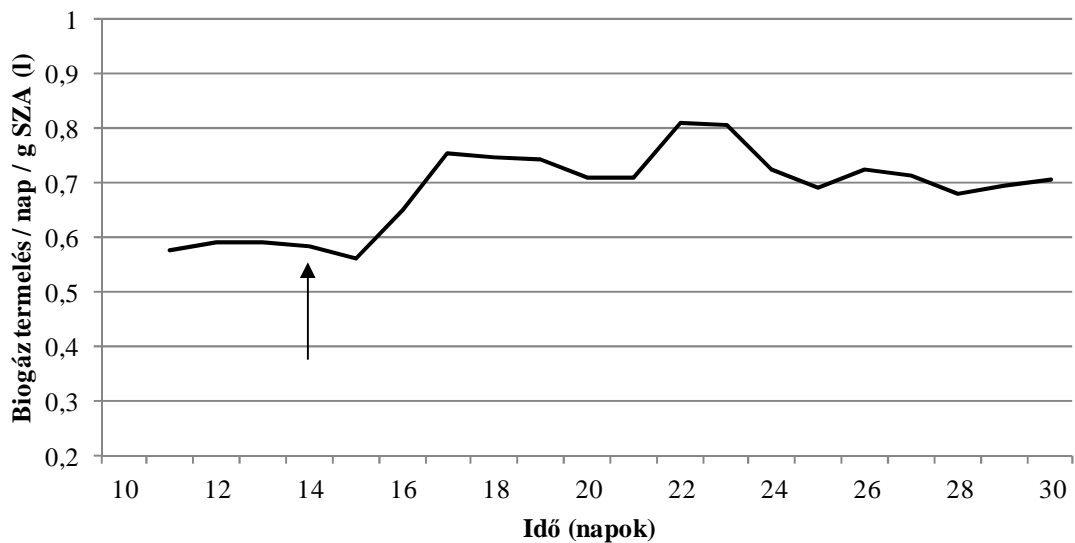
17. ábra: A mezofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 4g oTS/l térterhelés mellett (a nyíl a leoltást jelöli).

Ez esetben is megvizsgáltam a baktériumtörzs fermentorban levő mennyiségének változását az idő függvényében. A Real-Time PCR technika, és a mikroba *hycE* génre tervezett primerpár segítségével sikeresen azonosítottam az izolált közösségi DNS mintából a keresett specifikus szekvenciákat, valamint sikerült időben nyomon követnem a baktérium mennyiségének változását a közösségben.

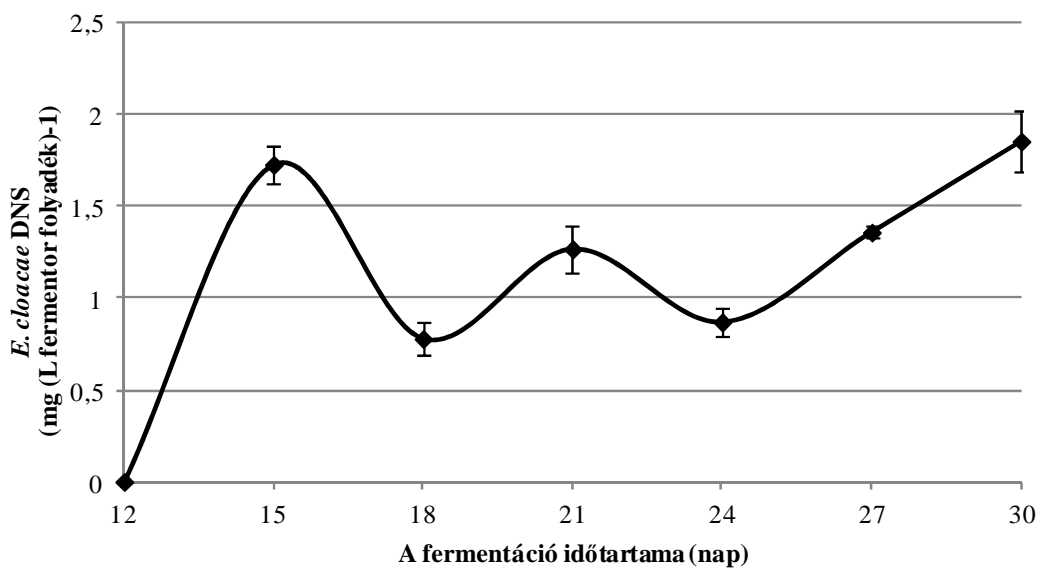


18. ábra: *Enterobacter cloacae* genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 4g oTS/l térterhelés mellett.

Az eredmények azt mutatták, hogy az intenzifikálás csökkenéséért ebben az esetben is a leoltott törzs fokozatos eltűnése, kihígulása volt a felelős folyamatos fermentáció esetén (18. ábra). A korábbi kísérlet tapasztalatait alapul véve, itt is megpróbáltam a térterhelést megnövelni, hogy teszteljem a mikroba fennmaradását megemelt tápanyagbevitel esetén. Ez esetben is a korábban alkalmazott 4 g oTS/l-es térterhelést a duplájára, 8 g oTS/l-re emeltem meg. A változás itt is szembetűnő volt, a gáztermelés görbét követve normált értékek összevetésével itt is az derült ki, hogy a megemelt biomassza adagolási ráta pozitív hatással volt a fermentáció intenzifikálására. A Real-Time PCR vizsgálatok a fermentáció különböző időközönként vett mintáin itt is alátámasztották a korábban igazolt feltevésemet, amely szerint a leoltott, hidrogéntermelő baktériumtörzs sikeresen túlélte, és ez okozhatta a gázhozamra gyakorolt pozitív hatás fennmaradását (19. és 20. ábra).



19. ábra: A mezofil leoltott fermentor napi gáztermelési görbéje 8g oTS/l térterhelés mellett (a nyíl a leoltást jelöli).



20. ábra: *Enterobacter cloacae* genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban az idő függvényében 8g oTS/l térterhelés mellett.

Következtetésként itt is elmondható, hogy sikeresen kimutattam a leoltott mezofil hidrogéntermelő törzset egy biogázt termelő mikrobiológiai rendszerből, és ez esetben is nyomon követtem annak mennyiségi változását az idő függvényében. Megállapítottam, hogy

az intenzifikálás eltűnése szintén a leoltott baktérium kihígulásának következménye volt. A megkétszerezett térterhelés a mezofil hőmérsékleti tartományú fermentációnál is megoldotta a kialakult problémát, az intenzifikálás ezen a betáplálási rátán stabilnak bizonyult.

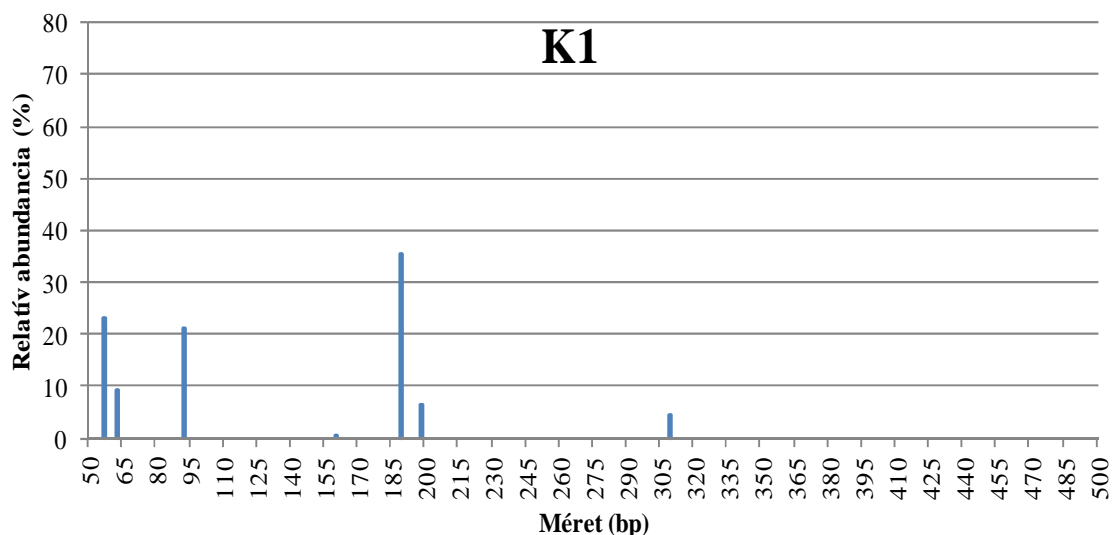
5.2 A mikrobaközösségek monitorozása T-RFLP segítségével (*mcrA* gén)

5.2.1 A mikrobaközösség összetétele hagyományos fermentáció esetén

A mikrobaközösség működését csak akkor érthetjük meg alaposabban, ha nem csupán egy kiragadott fajt követünk nyomon, hanem lehetőleg az összes kulcsfontosságú törzset egyszerre. Ez különféle ujjenyomat módszerekkel valósítható meg. Kísérleteim másik sorozatában a T-RFLP módszert választottam ezen azonosítások kivitelezésére a módszer számos előnyös tulajdonsága miatt. Kutatócsoportunk egyik fő profilja olyan biomasszák anaerob fermentálása, amelyek a hagyományostól eltérőnek minősülnek a biogáz szakirodalom szerint. Stratégiánk szerint a komplex anaerob lebontást végző mikrobapopuláció bizonyos idő elteltével adaptálódhat arra, hogy olyan szubsztrátokat is eredményesen lebontson és biogázzá alakítson, amelyeket ezek általában nem könnyen hasznosíthatnak. Ez úgy érhető el, hogy az egyedi mikrobák adaptálódnak, közösség így megváltoztatja összetételét. Olyan törzsek szaporodhatnak fel, amelyek korábban csak nyomokban voltak jelen a reaktorban, más törzsek száma lecsökkenhet, vagy akár el is tűnnek a számukra hasznosíthatatlan táplálékforrás, vagy a lebontás során termelődő toxikus anyagok miatt. A kísérletekben olyan anaerob fermentációkat folytattunk, amelyekben kizárólag fehérjében gazdag szerves anyag volt a mikrobák tápanyag és energiaforrása. Fehérjében gazdag hulladékok és melléktermékek nagy mennyiségben keletkeznek az élelmiszeriparban, ezeknek az anyagoknak az ártalmatlanítása és energetikai hasznosítása komoly gyakorlati jelentőséggel is jár. Kísérleteinkben alkalmazott szubsztrátok a tejfeldolgozás melléktermékeként képződő kazein, illetve vágóhidakon igen nagy mennyiségben felhalmozódó és más eljárásokkal körülményesen és költségesen ártalmatlanítható sertésvér voltak. A kazeinnel, mint egy kontrollált anyag-összetételű fehérjével modellezni kívántuk a fehérje alapanyaggal történő biogáz fermentálást, míg a sertésvérrel a kidolgozott

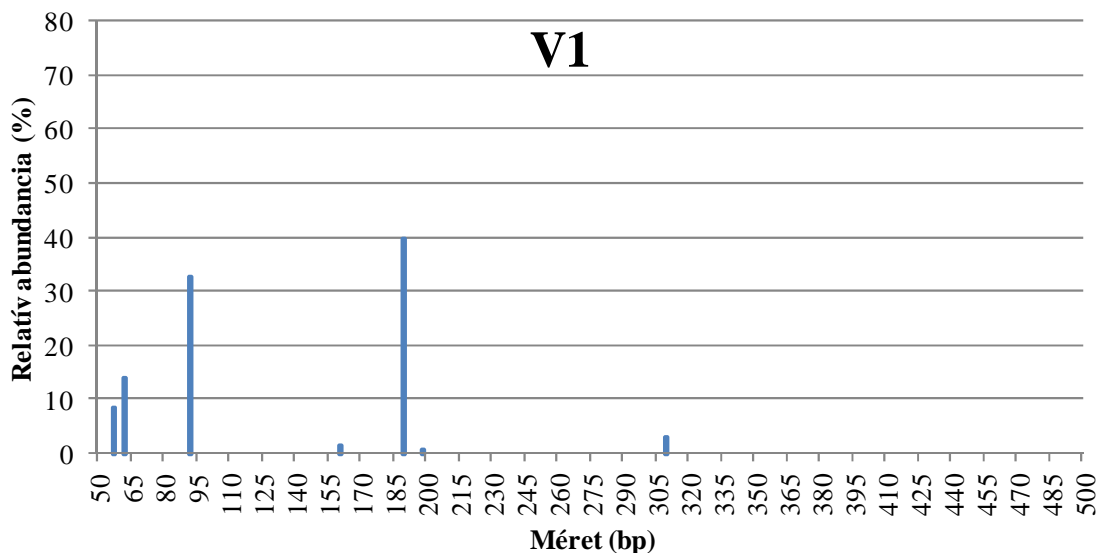
biotechnológiai eljárás közvetlen ipari alkalmazhatóságát demonstráltuk [38, 39]. A fehérjében gazdag melléktermék ártalmatlanítása, ami jelenleg elsősorban aerob komposztálással történik, külön költséget jelent a vágóhidaknak, tehát kettős haszonra tehetnek szert, ha értékes energiahordozót állítanak elő ezekből az alapanyagokból.

A mikrobiológiai folyamatok megértése és az ismeretek gyakorlati alkalmazása szempontjából egyaránt fontos a mikrobaközösség változásának nyomon követése miközben a megváltozott és szokatlan tápanyaghoz kell alkalmazkodniuk. A metanogének közvetlenül nem vesznek részt az alapanyagok lebontásában, a lebontási termékek biogázzá alakításának utolsó lépéseként a metán és szén-dioxid képződését végzik el illékony szerves savakból és/vagy hidrogénből és szén-dioxidból. Éppen ezért volt érdekes, hogy ennek a mikroba csoportnak az összetételét is megváltoztatja-e a mikrobaközösség számára biztosított táplálék összetételének megváltozása. Először az oltóiszapban levő metanogén közösséget kívántam meghatározni, ezért azzal a genomi DNS-sel dolgoztam, amelyet a fermentáció indítása utáni első héten izoláltam a felülúszóból. A PCR reakciókat a korábban részletezett *mcrA* gént tervezett primerpárral végeztem el. Az RsaI restriktációs enzimmel elvégzett hasítási lépés után a következő csúcissorozatot kaptam a kazeinnel táplált fermentor esetében (21. ábra).



21. ábra: Az 1 hete kazeinnel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az *mcrA* gént vizsgálva

Hasonló csúcissorozatot kaptam a másik fermentáció esetében is (22. ábra), ami nem meglepő, hiszen mind a két mezofil fermentációt ugyanazzal az oltóiszappal indítottam el, csak az adaptációs folyamat során betáplált fehérje minőségében volt eltérés.



22. ábra: Az 1 hete vérrel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az *mcrA* gént vizsgálva

Mindkét esetben egy on-line T-RFLP kromatogram kiértékelő szoftver segítségével [32] kiszűrtem a zajnak minősülő jeleket, valamint az egyedi csúcsokat egész értékre kerekítettem. Ezután figyelembe vettem az összes fluoresszencia értéket, amit 100 %-nak vettem, ebből kalkuláltam ki a kapott csúcsok nagyságát, ami a törzsek relatív abundanciájáról szolgáltat információt. Figyelembe véve a primer dimerek kialakulásának lehetőségét, csak az 50 bp feletti fragmenseket vettem figyelembe. A hasítási csúcissorozat elkészítése után hozzáálltam a klónkönyvtár felállításához. A sikeres ligálási, és transzformálási lépés után minden mintából 150 klónt választottam ki további vizsgálatra. A klónok egyedi TR-F méreteit összegeztem, azokat rávetítettem a csúcissorozatra, valamint kiválasztottam minden domináns csúcsához tartozó klón közül néhány darabot szekvenálás céljából. A sikeres plazmid izolálás, és a megfelelő minőségű szekvenáló PCR lezajlása után a kapott szekvenciákat tovább elemeztem. Először *in silico* elemző szoftver (Clone manager ver. 9.0) segítségével megszabadultam a felesleges plazmid szekvenciáktól, valamint az esetleges bizonytalan leolvasásokat manuálisan korrigáltam. Ezután a szekvenciákat BLAST analízisnek vettem alá az NCBI

oldalán található algoritmus segítségével [40]. A könnyebb átláthatóság kedvéért az azonosított terminális fragmensek mérete szerint tárgyalom az eredményeket, az azonos méretet adó klónokat pedig operációs taxonómiai egységekbe (OTU) rendeztem.

5.2.1.1 OTU-1 (57 bp)

Az első csoportot az 57 bp méretű fragmenst adó klónok alkotják. Ez a csoport 8% abundanciával rendelkezett a V1-es minta esetében (V1=sertésvér minta 1 hetes fermentáció után), míg a K1 mintát (K1=kazein minta 1 hetes fermentáció után) vizsgálva ez az érték 23% volt. A klónkönyvtárakat alaposan átvizsgálva több klónt is kiválasztottam annak érdekében, hogy ezt a csoportot alkotó fajt azonosíthassam. Az eredmények egy II-es típusú metanogén jelenlétére utaltak, amelyet *Methanoculleus marisnigri*-ként azonosítottam [41]. Ez a törzs anyagcsere-folyamatait tekintve közelebb áll az I-es típusú metanogénekhez, hiszen a hidrogenotróf útvonalon keresztül állítja elő a metánt. Egyike, azon kevés metanogén fajoknak, amelyek komplett genom szekvenciája ismert. Ezt a törzset mások mellett, a mi kutatócsoportunk is kimutatta biogáz fermentorból új generációs szekvenálási technológiát alkalmazva [42-44]. A kísérletek azt mutatták, hogy mindkét fermentor metanogén közösségét dominálta ez a törzs.

5.2.1.2 OTU-2 (62 bp)

Ez a csúcs 14%, illetve 10% abundanciát mutatott V1 és K1 minták esetében. Ez esetben is átfogó vizsgálat után több klónt választottam ki szekvenálásra azonosítási céllal. Az adatok itt azonban nem adtak egyértelmű eredményt. A klónok többségénél azonosítani tudtam, egy, a növényi biomasszával táplált fermentorokban igen gyakran előforduló fajt [45], a *Methanosarcina mazei*-t [46]. A klónok kisebbik hányada egy eddig beazonosítatlan metanogén törzssel mutatott nagyfokú hasonlóságot, amelyből azt a következtetést szűrtem le, hogy ezt a csoportot több faj is alkotja, amelyek nagyon hasonló méretű terminális hasítási

fragmenttel rendelkeznek. Ezt a jelenséget megfigyelték mások is [47], akik szintén egy hasító enzimet használtak a kísérleteik során.

5.2.1.3 OTU-3 (92 bp)

Ezen egység tagjai 33, valamint 21% abundanciát mutattak a V1, illetve a K1 minták estében. Ezek az értékek markánsaknak nevezhetőek, ami azt sugallja, hogy a csoportot alkotó mikrobák fontos szerepet játszhatnak a biogáztermelésben az adott időpillanatban. 12 klón elemzését hajtottam végre, amelyek közül 6-6 tartozott a különböző fermentorokhoz. A szekvencia homológia keresés utáni eredmények három különféle törzs jelenlétére utaltak. Ezek közül a legtöbbször a *Methanocorpusculum parvum* [48] tűnt fel, mint lehetséges találat. Erről a fajról érdemes tudni, hogy hidrogénből, hangyasavból, izopropanolból és izobutanolból is képes metánt előállítani. Ebben a metabolikus kontextusban szintén a hidrogenotróf metanogén anyagcsere útvonal dominanciája tűnik ki. A másik két mikroba a *Methanomassiliicoccus luminyensis* [49, 50], valamint a *Methanoculleus bourgensis* [51] voltak. Az elsőként említett fajt nemrégiben írták le, mint a humán emésztőtraktus mikroflórájának része, míg a második a korábban már részletezett *Methanoculleus* család egy másik tagja, amely metabolizmusát tekintve nagy hasonlóságot mutat a már azonosított *Methanoculleus marisnigri* [41] törzssel.

5.2.1.4 OTU-4 (160 bp)

Habár az első héten vett mintákban elhanyagolható az ezen csoporthoz tartozó fajok száma, sikerült a klónkönyvtárban a várt méretet adó egyedi klónokat találnom, amelyek szekvencia analízis után a *Methanobacterium formicicum* fajjal [52] adták a legnagyobb hasonlóságot. Erről a Metanobaktériumok családjába tartozó törzsről érdemes megjegyezni, hogy a biogáz fermentorok molekuláris taxonómiaiáját vizsgáló szakirodalom szerint [53], gyakran előforduló fajról van szó. Szintén fontos aspektus a fermentáció szempontjából, hogy

ez a törzs is képes metán előállítására hidrogénből, illetve szén-dioxidból. Emellett nitrogén jelenlétében képes hangyasavat felhasználni.

5.2.1.5 OTU-5 (189 bp)

A csoport vizsgálata közben meglepő módon nem találtam egyetlenegy találatot sem a referencia adatbázisban, amely konkrét törzsre utalt volna. Mindazonáltal a fragment abundanciája magas mindkét minta esetében (K1: 35%, V1: 40%), ami azt jelentheti, hogy egy olyan mikroorganizmus keverékről van szó, amely fontos szerepet játszik a biogáz keletkezésében hagyományos anaerob fermentációs rendszerekben. Minden bizonnyal a szekvencia adatok gyarapodásával megnő a beazonosítható fajok száma, ehhez azonban az is szükséges, hogy tiszta izolátumokat is elő lehessen állítani, ami ezeknél a mikrobáknál meglehetősen nehézkes [5].

5.2.1.6 OTU-6 (198 bp)

Ennél a taxonómiai egységnél relatíve alacsony abundanciát tapasztaltam mindkét minta esetében. A K1 elnevezésű mintánál 6,5% volt ez az érték, míg V1 mintánál 0,5%, ennek megfelelően csak az első vizsgált klónkönyvtárban találtam erre a csoportra utaló klónokat. A BLAST keresés eredményeként nem találtam konkrét fajjegyzést de az eredmények itt is egy *Methanoculleus* családba tartozó metanogén jelenlétére utalnak, amely talán közeli rokona lehet az eddig kevesek által vizsgált *Methanoculleus chikugoensis*-nek [54].

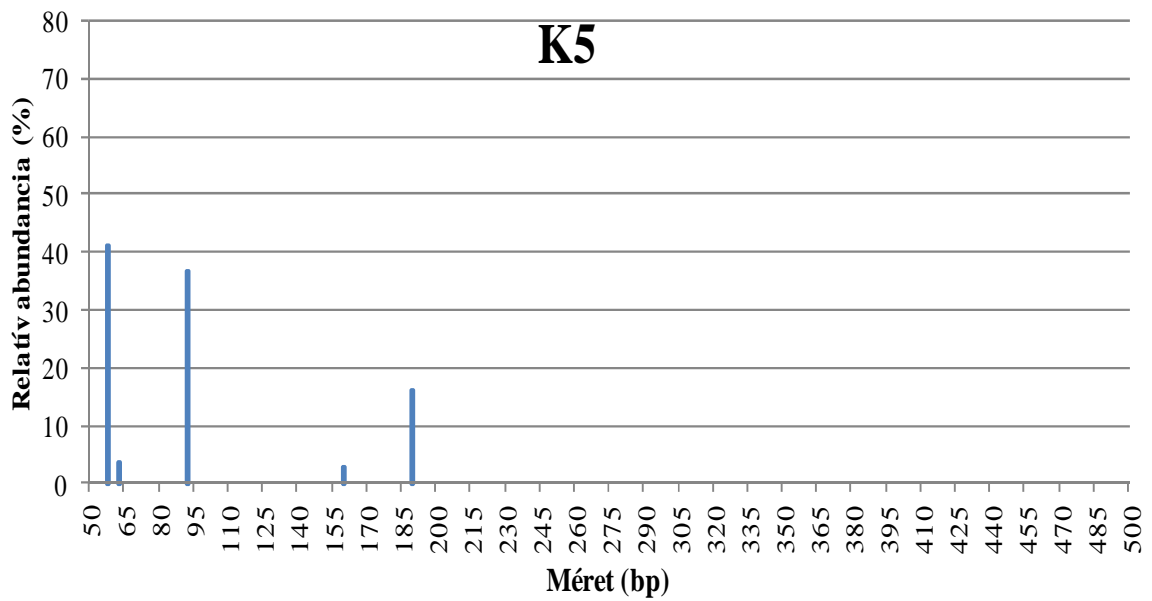
5.2.1.7 OTU-7 (309 bp)

Az utolsónak tárgyalt csoport adta a leghosszabb TR-F-et a kapilláris gélelektroforézis elválasztás után. Ennél az egységnél is alacsony reprezentáltságot találtam mindkét fermentor esetében (K1: 3%, V1: 4%), mindazonáltal a releváns klónok mind egybevágó eredménnyel

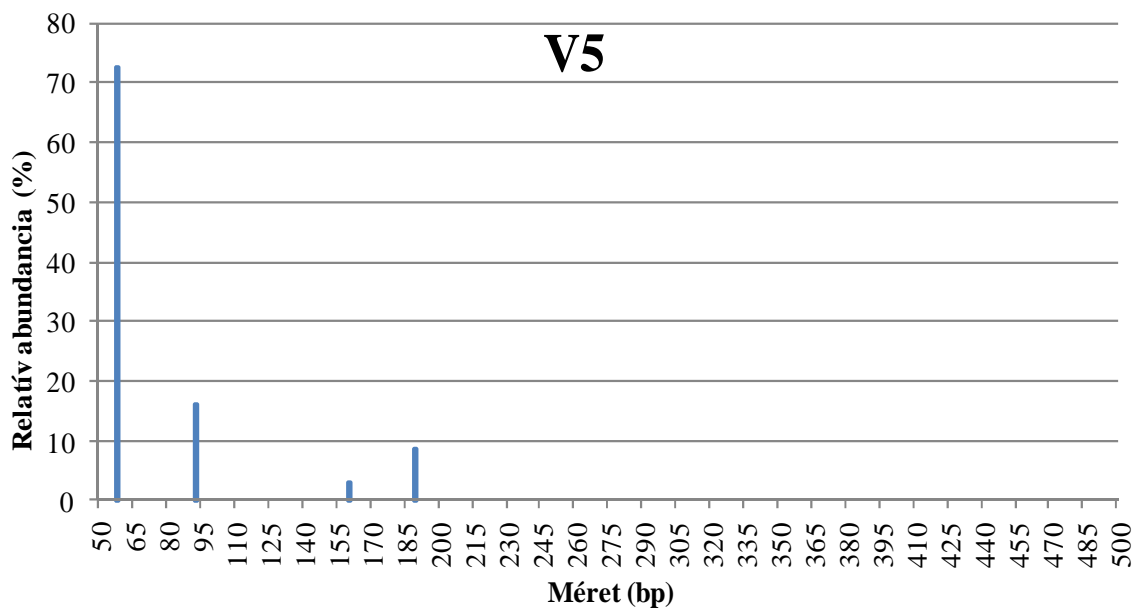
egy bendőből izolált metanogén jelenlétét bizonyították, amely a *Methanobrevibacter ruminantium* [55] nevet viseli. Ez a pálcika formájú metanogén képes mind hidrogenotróf, mind pedig acetotróf módon metánt generálni. Ez a törzs a *Methanobrevibacter* család típusa. Előfordulása ebben a milióban teljesen megszokottnak mondható.

5.2.2 Fehérjében gazdag alapanyagon bekövetkező változások a mikrobaközösségben

Meglepő módon, a fermentor metanogén populációja nagymértékben átalakult a proteinben gazdag tápanyag hatására. Ez abból a szempontból érdekes, hogy a biomassa természete elméletben nem befolyásolja a köztitermékek minőségét, legfeljebb azok mennyiségi eloszlása változik. Az eltérések arra utalnak, hogy a mikrobaközösség összetétele sokkal érzékenyebben és nagyobb mértékben változik a szerves anyag lebontása közben, mint ahogyan azt korábban feltételezték. A következőkben mutatom be a kísérleti fermentorok metanogén közösségének „csoport képét”, amely öt héttel a fehérjében gazdag alapanyag anaerob fermentációjának elindítása után alakult ki (23. és 24. ábra). Az összes korábban részletezett taxonómiai egységben változás következett be, számos törzs eltűnt a fermentor uraló mikrobaközösségből, míg mások dominánssá váltak a közösségben. Összességében elmondható, hogy a fajok számát tekintve egy egyszerűsödési folyamat zajlott le, a mikrobiológiai sokféleség csökkent a fermentorban az ötödik héten az egyoldalú, fehérjében gazdag táplálás következményeként. A kapott eredményeket a következő ábrákon mutatom be.



23. ábra: Az 5 hétig kezeimmel táplált fermentor hasítási csúcssorozata az *mcrA* gént vizsgálva.



24. ábra: Az 5 hétig vérrel táplált fermentor hasítási csúcssorozata az *mcrA* gént vizsgálva.

5.2.2.1 OTU-1 (57 bp)

Az első OTU, amely 57 bp méretű a legmarkánsabb növekedést mutatta mind a két alapanyag esetében. Ez számszerűsítve a K5 mintát vizsgálva 41%, míg a V5 mintánál 73% abundancia hányadot jelent. A korábbi 23, illetve 8%-hoz hasonlítva kiemelkedő növekedésnek nevezhetjük ezeket az adatokat. Ez egyben azt is jelenti, hogy ezen OTU-t felépítő *Methanoculleus* faj jelentős fontossággal bír a metán termelés megváltozott folyamatában és a mikrobaközösségnek a szubsztrát váltás hatására bekövetkezett átalakulásában. Figyelemre méltó, hogy azok a metanogének váltak dominánssá a közösségben, amelyek a hidrogenotróf metabolizmus utat használják. Utalva ezáltal a hidrogén fontosságára a reaktortérben.

5.2.2.2 OTU-2 (62 bp)

A második tárgyalt egység 62 bp-nál található csúcsot adott az első heti mintában, azonban ezek a fajok a V5 minta esetén teljesen eltűntek az ötödik hétre, míg a K5 mintát vizsgálva azt tapasztaltam, hogy az abundanciájuk lecsökkent 3,5%-ra. Ez a változás azonban egyáltalán nem meglepő, figyelembe véve, hogy ezt az OTU-t olyan faj dominálta, amely silókukorica fermentálása során fordul elő a leginkább.

5.2.2.3 OTU-3 (92 bp)

A következő csoport, a 92 bp méretet adóaké, amely szintén drámai változáson ment keresztül a négy hét alatt. A változás függött a betáplált fehérje minőségétől, hiszen míg kazein esetében 21%-ról 37%-ra emelkedett az abundancia, a vérrel táplált reaktor esetében 33%-ról 16%-ra csökkent ez a hányad. Érdekes megfigyelés, hogy nem csak a biomassza minősége befolyásolja a metanogén populációt, de azonos tulajdonságú tápanyagforrást alkalmazva is lehet eltérés attól függően, hogy milyen fehérjében gazdag tápanyagról van szó.

Természetesen azt is figyelembe kell vennünk, hogy ez a csoport egy heterogén közösség volt, amelyet az alkalmazott módszerekkel nem tudtam jobban szétválasztani.

5.2.2.4 OTU-4 (160 bp)

A 160 bp-nál levő OTU már az első heti mintában is alacsony reprezentáltsággal rendelkezett, ami négy hét elteltével kissé változott ugyan, de a három százalék körüli érték azt jelenti, hogy valószínűleg csak másodlagos funkcióval bírnak e fajok a fermentáció egészére, meghatározóvá nem váltak. Mindamellet az azonosított *Methanobacterium formicicum* törzs stabil tudott maradni a rendszerben a körülmények megváltozásától függetlenül is.

5.2.2.5 OTU-5 (189 bp)

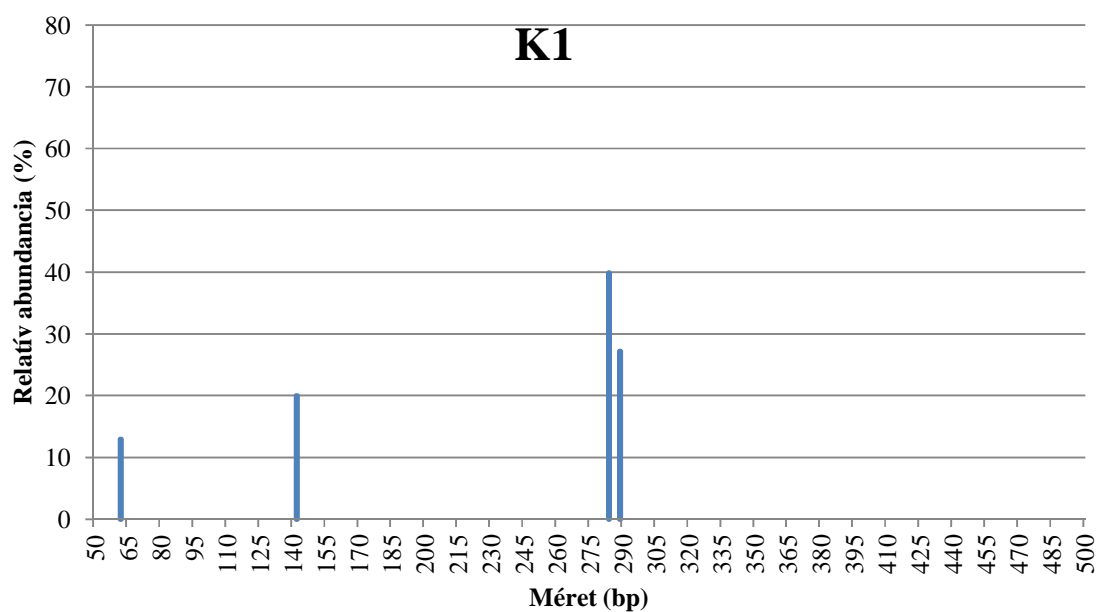
A következő csoport is markáns változáson ment keresztül a négy hét adaptáció alatt. A korábbi 35% illetve 40%-ról 16% illetve 8,5%-ra csökkent az itt tárgyalt OTU abundanciája. A szekvenciaadatok ennél a csoportnál egy *Methanoculleus* faj jelenlétére utalnak, az abundancia csökkenése arra utalhat, hogy ez a törzs vagy csak kevésbé tudott alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez.

5.2.2.6 OTU-6 (198 bp) és OTU-7 (309 bp)

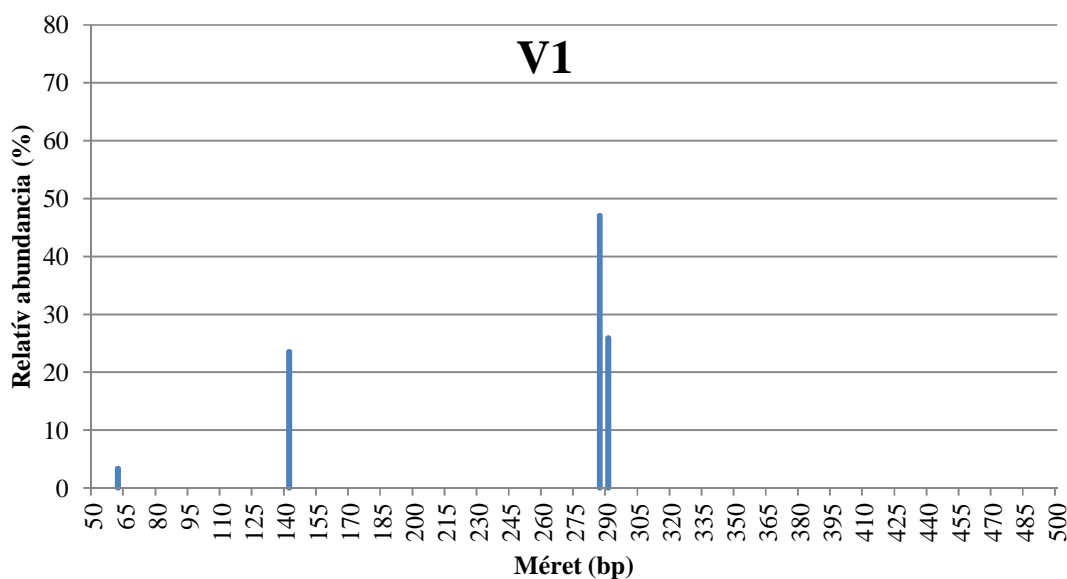
A 198 bp-nál, valamint a 309 bp-nál található csoportok teljesen eltűntek a rendszerből. Ezek az eredmények is azzal magyarázhatóak, hogy a *Methanoculleus* törzsek sokkal jobban tudtak alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez, míg más törzsek csak kevésbé tudtak adaptálódni, vagy a gyorsabb növekedésre képes fajok kiszorították őket azelőtt, hogy alkalmazkodni tudtak volna.

5.3 Mikrobiális mikrobaközösségek monitorozása T-RFLP segítségével (16S *rRNS* gén)

Fontos volt az első héten vett minták behatóbb vizsgálata egy másik primerpárral is, amely a 16S *rRNS* gént célozza meg. Választásom egy olyan primerpárra esett, amely a gén szempontjából univerzálisan megőrzött szekvencia részlethez tartozott, ugyanakkor archaea specifikus is egyben (F344-R934) [56]. Az így kiválasztott primerek segítségével ugyanazt a csoportot céloztam meg, amelyet a korábban bemutatott *mcrA* génre tervezettekkel, így mód nyílt a két megközelítés összehasonlítására. A kísérleti összeállítás a korábban alkalmazott módszerhez hasonlóan történt, egyedül a primerpárt cseréltem le. A kapott hasítási csúcissorozatokat a következőekben mutatom be (25. és 26. ábra).



25. ábra: Az 1 hete kazeinnel táplált fermentor hasítási csúcissorozata a 16S *rRNS* gént vizsgálva



26. ábra: Az 1 hete vérrel táplált fermentor hasítási csúcissorozata az 16S *rRNA* gént vizsgálva

Ahogy az ábrákon is jól látszik, a két fermentáció hasítási csúcissorozata nagymértékben hasonlít egymásra, ez itt is az azonos oltóiszapnak tudható be, amelyet a fermentáció elindításához használtam. Emellett az is szembevetendő, hogy kevesebb domináns csúcsot tartalmaz a T-RFLP kromatogram, mint az *mcrA* gén esetében. A klónkönyvtárak elkészítése és szelektálás után elvégzett szekvenálások eredményeit hasonlítottam össze a korábbi adatokkal. A szekvencia adatokat az eddigi BLAST keresés mellett RDP (Ribosomal Database Project) keresésnek is alávettem a pontosabb beazonosítás céljából. Ezen a felületen mód nyílik a családba való besorolásra, akkor is, ha nincsen konkrét egyező faj a találati listán.

5.3.1 OTU-1 (62 bp és 142 bp)

Elégé korlátozott az információ erről a csoportról, mivel a készített klónkönyvtárakban egy kivétellel csupán a 62 bp-hoz tartozó klónokat lehetett fellelni. Mindegyik itt tárgyalt klón a *Methanobacterium formicicum* [52] törzssel mutatott nagy hasonlóságot, amelyet megtaláltam az *mcrA* specifikus primer párral vizsgált klónkönyvtárakban is. Egy behatóbb, *in silico* vizsgálat azon az egy klónon, amely 142 bp-nál adott TR-F-et bebizonyította, hogy

annak is 62 bp-nál kellett volna jelet adni, amelyből arra következtettem, hogy a 142 bp-nál levő csúcs egy pseudo TR-F, amely nagy valószínűséggel egy sikertelen hasítási reakció eredménye, ezért ezt a két csoportot egyként tárgyalom.

5.3.2 OTU-2 (284 bp)

Ez a csoport kiemelkedően nagy gyakorisággal szerepelt a hasítási csúcssorozatban, ennek megfelelően alakultak azok abundancia értékei, 40% K1 minta esetében, valamint 47% V1 minta esetében. Ezen klónok vizsgálatánál is alkalmaztam *in silico* hasítást, a pontosabb TR-F meghatározás érdekében. Az elméleti enzimikus hasítások azt mutatták, hogy a várt TR-F érték 287bp-nál lenne, ami kis eltérésnek mondható a tapasztalathoz képest. Tizenkettő klónt szekvenáltam meg a kísérletsorozat során, amely egy kivétellel mind a *Methanoculleus bourgensis* [51] fajjal mutattak közeli rokonságot. Egy faj feltűnik még az azonosítások során, név szerint a *Methanogenum marinum*, ami egy kissé meglepő, hiszen ezt a pszichrofil törzset hideg alaszakai tengeri iszapból izolálták [57] és nem is mutatták még ki a jelenlétét biogáz fermentorokból. Mindenesetre a *M. marinum* is képes acetotróf, valamint hidrogenotróf metántermelésre.

5.3.3 OTU-3 (289-291 bp)

A második legnagyobb gyakorisággal azonosított hasítási mintázat képviselői közül is számos (34db) klónt vizsgáltam meg az egyedi TR-F-ek, illetve a szekvencia azonosságok után kutatva. K1 minta esetében 27%, míg V1 minta esetében 26% volt a reprezentáltság az összes DNS populációt figyelembe véve. Mivel a restriktációs eredmények elég kevert képet adtak, ez esetben is figyelembe vettem az *in silico* vizsgálatok eredményét, amely fényt derített a csoport komplex jellegére. Az eredmények alapján ezt a csoportot három további részre lehet elkülöníteni. Az első alcsoportot (OTU-3.1) azok a fajok alkotják, amelyek elméleti TR-F mérete 289 bp. Tizenkét klónt vizsgáltam meg ebből a halmazból, amelyek közül négy hasonlított nagymértékben (97%-ban) az *mcrA* klónkönyvtárban is megtalált

Methanomassiliicoccus luminyensis-re [49, 50], míg a többit csak család szinten tudtam meghatározni. A további klónok a *Thermogymnomonas* genusba [58] tartoznak, amelyek a következő két alcsoportot is dominálják. A következő ilyen alegységet a 290 bp *in silico* restrikciós fragmenst adó klónok alkotják (OTU-3.2). A vizsgált tizenegy klón mindegyike a *Thermogymnomonas* családba tartozik. A következő elméleti egység a 291 bp méretű *in silico* TR-F-et adóak csoportja. Ezen a halmazon belül is megtalálhatjuk a korábbiakban domináns *Thermogymnomonas* fajokat, mellettük azonban felbukkan a *Methanobrevibacter* genus [55] egy tagja is az öt vizsgált klón közül két esetben. Fontos megjegyezni, hogy ez a törzs szintén megjelent a korábbi klónkönyvtárak esetében is, amikor is az *mcrA* gént vizsgáltam. Sajnos nem lehet sokat tudni erről a mikroba családról. Mindössze annyi ismert róluk, hogy metántermelésüket megfigyelték számos természetes környezetben, ahol többek között közeli kapcsolatot mutattak az általam is azonosított *Methanomassiliicoccus luminyensis*-el [59-62].

Ezeket az alcsoportokat a hagyományos T-RFLP technikával lehetetlen lett volna elkülöníteni, hiszen egy bázispáros különbséget mutató DNS fragmenteket a gyakorlatban nem lehet elválasztani a jelenlegi technikákkal. A kiegészítő *in silico* TR-F vizsgálatok tették lehetővé a törzsek elkülönítését.

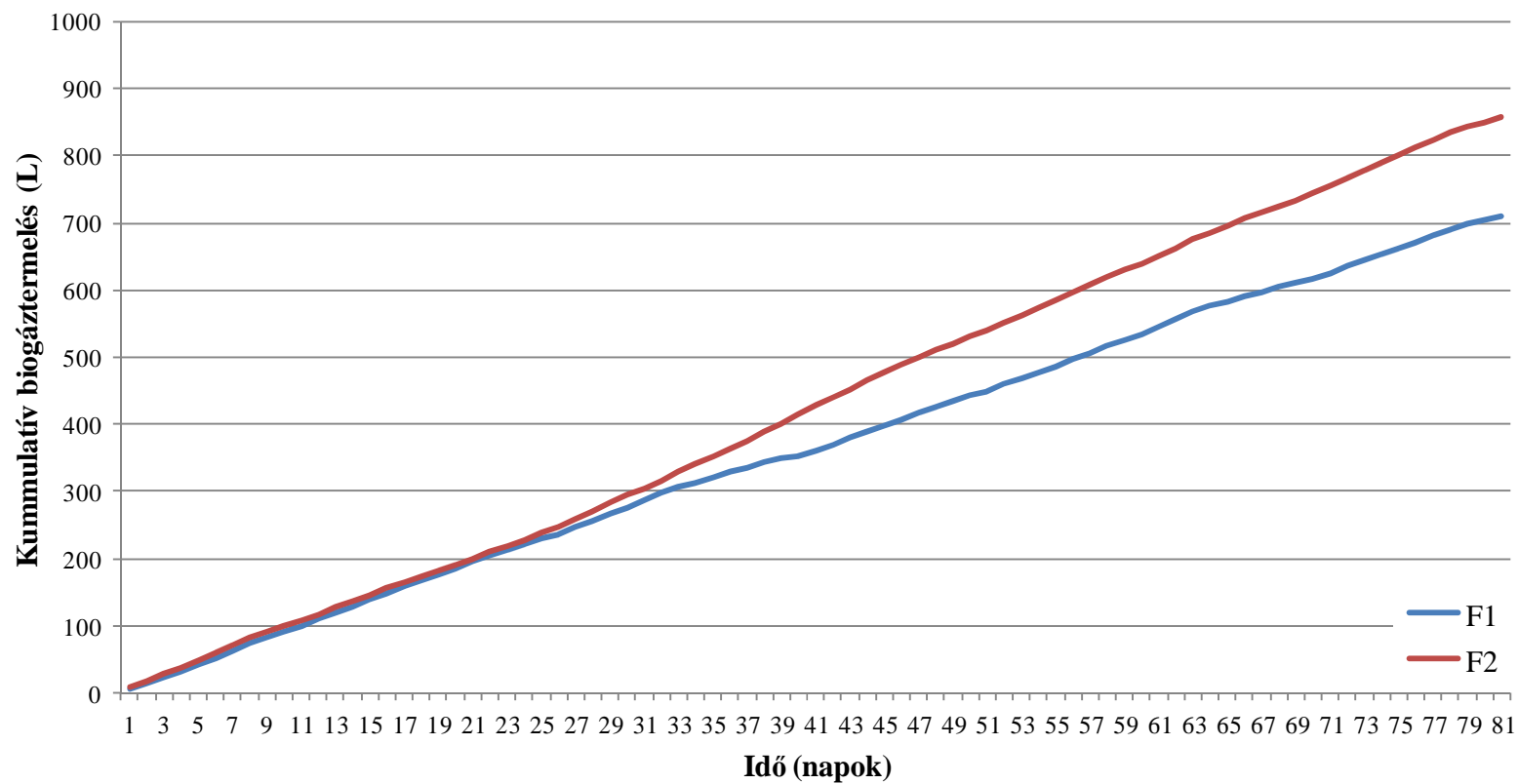
5.4 Eubakteriális mikrobaközösségek monitorozása T-RFLP segítségével (16S *rRNS* gén)

Annak érdekében, hogy átfogó képet kapjak mind a módszer sajátosságairól, mind pedig a különféle biogáz reaktorok mikrobiológiai közösségeinek összetételéről, szükséges volt egy olyan kísérletsorozat véghezvitele is, amelynek keretein belül az eubakteriális konzorciumot jelölöm meg vizsgálatom tárgyául. Ennek megfelelően egy olyan fermentációt indítottam el, amely alkalmas ilyen irányú kérdések megválaszolására. Mindemellett kettős célt is szolgált a kísérletsorozat, ugyanis nem csupán egy biogáz képző rendszer eubakteriális összetételét szerettem volna megvizsgálni, hanem annak reakcióját egy külső mikroba hozzáadására. Korábbi kísérleteimben már kifejtettem, hogy kutatócsoportunk sokat foglalkozott hidrogéntermelő baktériumok biogáztermelést serkentő hatásával. Így célul tűztem ki, hogy ezen fermentáció keretein belül megvizsgálom egy mezofil baktérium, az *Enterobacter*

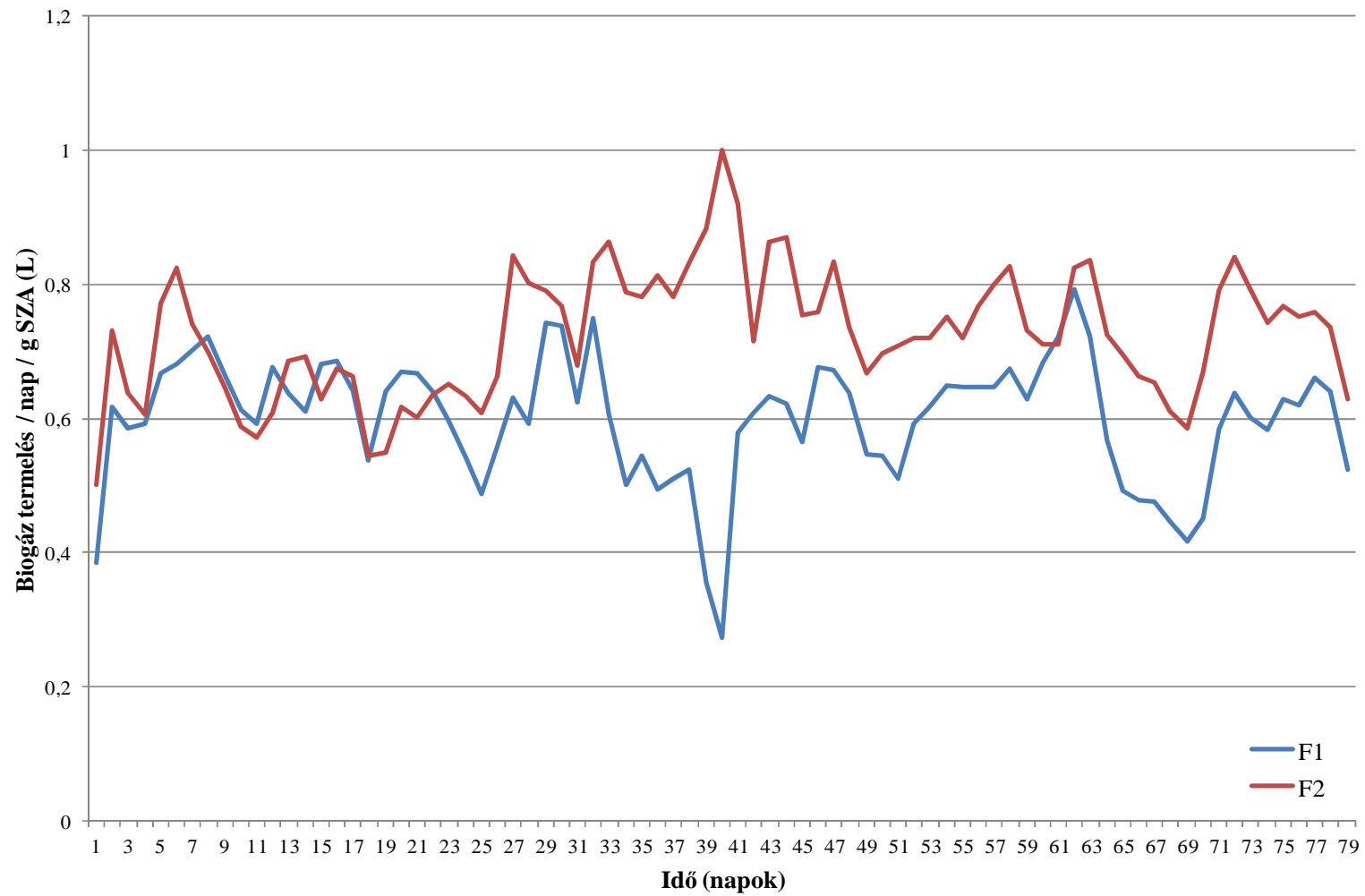
cloacae leoltásának a fermentor bakteriális közösségére gyakorolt hatását. A törzs tiszta tenyészetben előállított baktérium tömegének a kevert mikrobaközösségbe való adása korábban számos alkalommal bizonyította pozitív hatását a kumulatív gázkihozatalra mind szakaszos, mind folyamatos fermentáció esetében [3, 26].

5.4.1 Fermentációs paraméterek és az azonosításhoz használt molekuláris biológiai módszerek

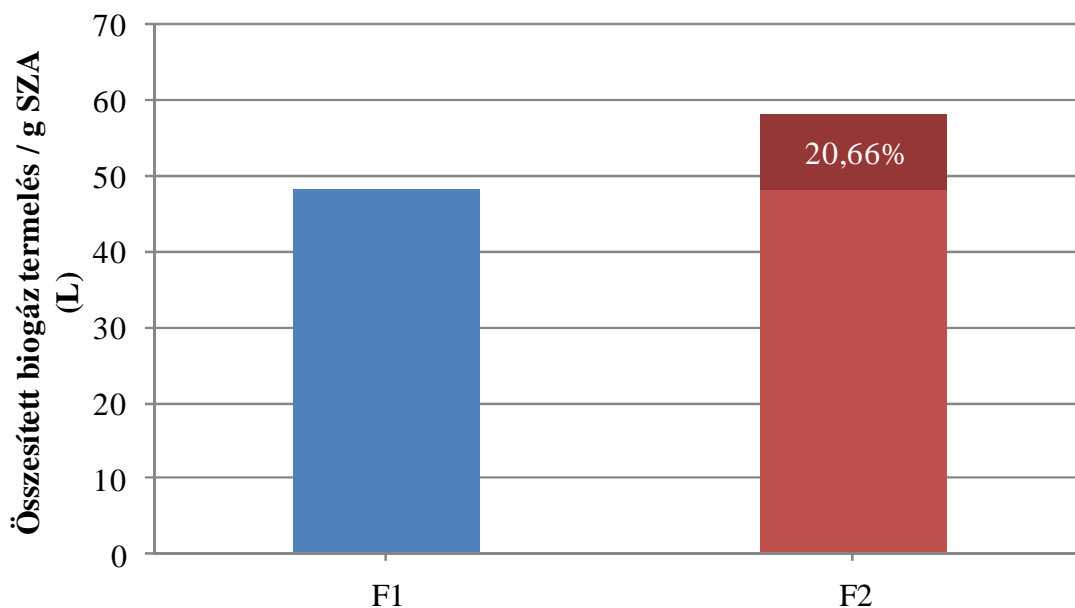
A kísérletsorozatot két párhuzamos alkalmazás mellett, az Anyagok és Módszerek fejezetben bemutatott folyamatos üzemű fermentorokkal folytattam le. Oltóiszapként egy mezofil hőmérsékleten üzemelő biogáz üzemből származó fermentoriszapot használtam, tápanyagként silókukorica szolgált. Mivel a biogáz üzem is ugyanezt az alapanyagot használta, nem kellett a konzorciumot külön adaptálni az új tápanyagforráshoz. Korábban bemutattam, hogy az *Enterobacter cloacae* túléléséhez a fermentorban a megszokottnál magasabb térterhelés szükséges. Ennek megfelelően a fermentációt 6g oTS/l napi adagolási értéken tartottam. A fermentáció szempontjából fontos fizikai és kémiai paramétereket folyamatosan vizsgáltam, azok a teljes kísérleti idő alatt határértékeken belül mozogtak. Az elindítás utáni szakaszban szükséges volt megvárni, hogy a napi gáztermelés állandó értékeket vegyen fel, illetve megfeleltethető legyen a silókukoricából nyerhető gázkihozatal irodalmi adatainak. Ezután (24. nap) az egyik fermentort leoltottam a mezofil hidrogéntermelő törzssel, míg a másik reaktor kontrollként szolgált. A kísérlet e szakaszát nyolc héten keresztül folytattam, emellett folyamatosan nyomon követtem a baktérium mennyiségi változását qPCR segítségével a korábban részletezett módszer alapján. A gázkihozatali görbéket a 27. illetve a 28. ábrákon mutatom be.



27. ábra: A vizsgált fermentorok összesített gáztermelési görbéi
(F1: kontrol fermentor, F2: 24. napon leoltott fermentor)

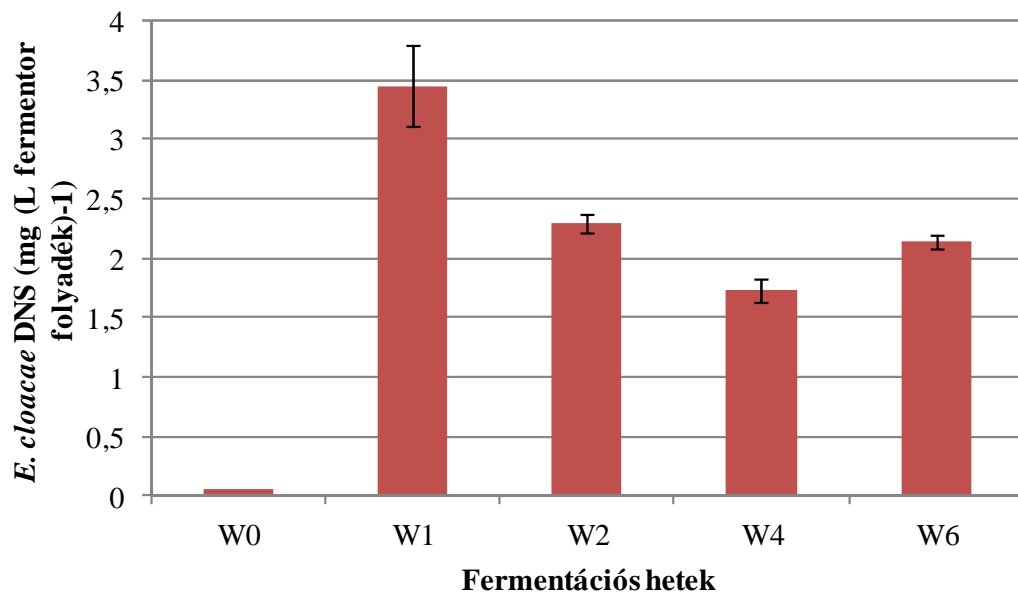


28. ábra: A vizsgált fermentorok napi gáztermelési görbéi
(F1: kontrol fermentor, F2: 24. napon leoltott fermentor)



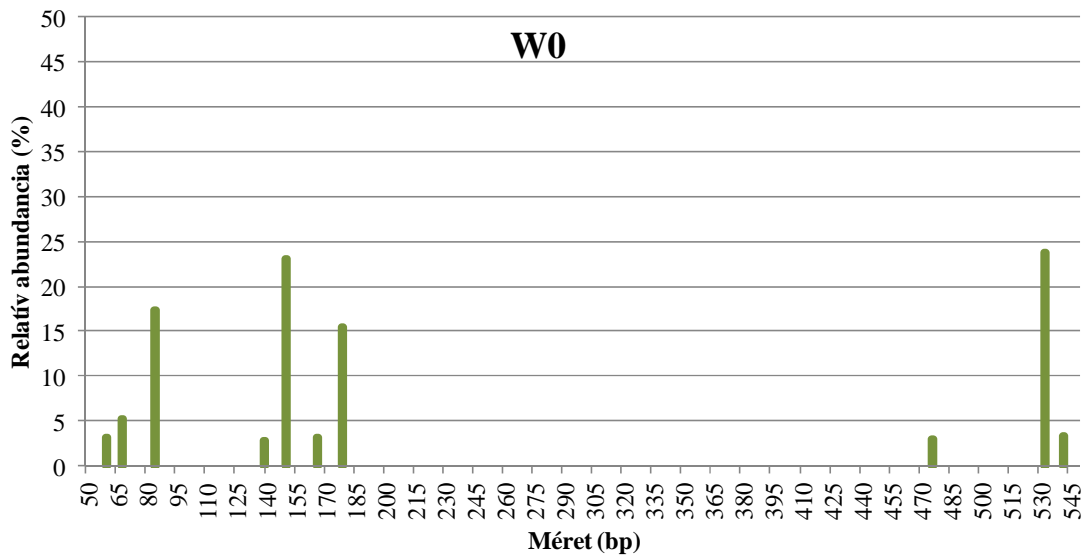
29. ábra: A vizsgált fermentorok összesített gáztermelési görbéi az intenzifikálás mértékével (F1: kontrol fermentor, F2: leoltott fermentor).

A 29. ábrán is jól látható a különbség a leoltott, és a kontroll fermentorok között. Ez esetben is tisztán látható volt a többlet gázhozam, amely a hidrogéntermelő törzsnek volt köszönhető. Az összesített gázhozam alapján az intenzifikáció mértéke 20% feletti volt, ami kimondottan jónak mondható az eddigi tapasztalataink alapján. Azonban szükségesnek láttam meggyőződni arról is, hogy a leoltott baktérium ez esetben is képes volt-e túlélni a rendszerben a fermentáció időkeretén belül. Ezt a korábban részletezett Real-Time PCR, valamint specifikus primerpár segítségével értem el a periodikusan vett folyadékmintákból izolált genomi DNS-t templátként használva. Ezen eredmények a 30. ábrán foglaltam össze.



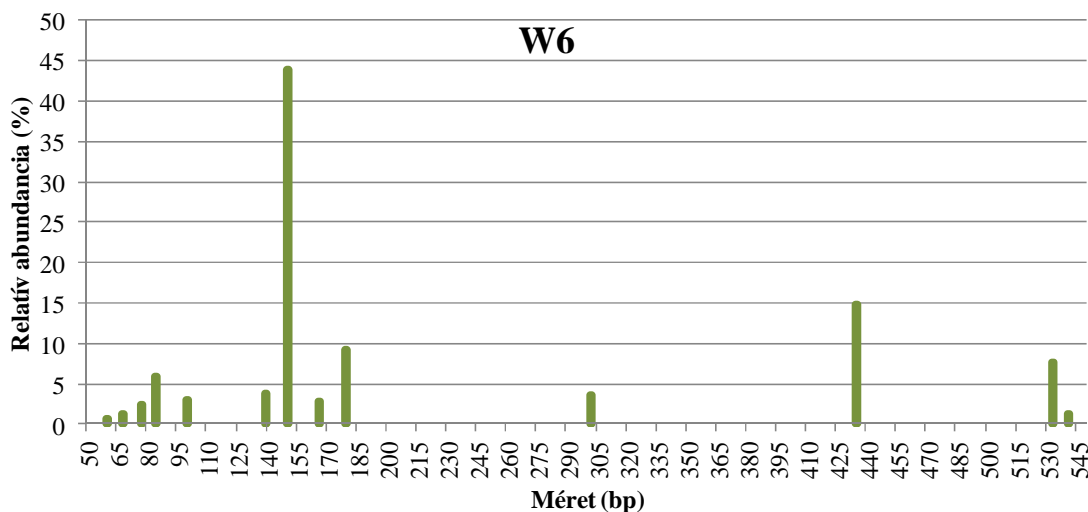
30. ábra: *Enterobacter cloacae* genomi DNS mennyiségének változása a fermentorban a fermentáció előrehaladtával.

Az eredmények egybehangzóak a gázkihozatali értékekkel, azaz, hogy a reaktorban képes volt túlélni a leoltott törzs, emellett jelentősen megemelte a termelt biogáz mennyiségét. A fermentáció végeztével, miután meggyőződtem arról, hogy a leoltott törzs túlélte a rendszerben, és megfelelő intenzifikálás volt tapasztalható elkezdtem vizsgálni a fermentor eubakteriális közösségét a korábban részletezett T-RFLP módszerrel. Ez esetben a hasításnál két restriktív endonukleázt (RsaI, MspI) használtam, hogy a korábban tapasztalt jelenséget, mely szerint egy TR-F-hez több különféle faj is tartozott kiküszöbölhessem. A hasítási paraméterek optimalizálása után a következő hasítási csúcssorozatot kaptam a leoltás előtt vett mintát vizsgálva.



31. ábra: A silókukoricával etetett fermentor leoltás előtti hasítási csúcissorozata az eubakteriális 16S *rRNS* gént vizsgálva.

A 31. ábrán jól látszik, hogy a fermentor eubakteriális közösségében számos domináns faj is megtalálható. A következőkben a fermentáció végén, azaz a hatodik héten vett mintát ábrázolom ugyanilyen módon.



32. ábra: A silókukoricával etetett fermentor hasítási csúcissorozata leoltás után hat héttel az eubakteriális 16S *rRNS* gént vizsgálva

A 31. és a 32. ábrát összehasonlítva, ránézve is könnyen megállapítható, hogy komoly átrendeződés zajlott le a fermentáció időintervalluma alatt, amely a leoltott törzsnek volt köszönhető. A fajok tekintetében csak némely esetben beszélhetünk eltűnésről, vagy felerősödéssel, inkább a meglévő fajok mennyiségi átrendeződése volt tapasztalható az eredmények kiértékelésénél. A leoltott törzset sikerült ugyan kimutatni a hasítási csúcssorozaton, viszont csak nagyon csekély abundanciával, melynek következtében a zajsűrítés után, már nem volt látható a detektált jel. Nem meglepő módon a klónkönyvtárból sem sikerült a leoltott törzsre utaló klónt izolálnom, tekintettel a reprezentáltság alacsony mivoltára. Mindazonáltal a qPCR eredményeiből tisztán levonható a következtetés, hogy a faj túlélte a rendszerben, ott serkentette a biogáztermelést, tehát a mikrobaközösségben bekövetkezett változás az integráció következménye, hiszen a kontrol fermentor esetében ugyanabban az időpillanatban vet mintát analizálva azt az eredményt kaptam, hogy a mikrobaközösség változatlan volt a fermentáció egészét nézve.

A klónkönyvtárból vizsgált egyedi klónok számát úgy igyekeztem megválasztani, hogy a lehető legtöbb fajt tudjam azonosítani a rendszerből. Tekintettel arra, hogy a primerek potenciális célcsoportjába nagyszámú különféle bakteriális faj tartozhat, mindkét időpillanattól vett minta esetében a klónkönyvtárakból 215-215 egyedi inszertet vizsgáltam meg. A továbbiakban az azonosított fajokat kívánom részletesen bemutatni, különös tekintettel a domináns csoportokra.

5.4.2 OTU -1 (84 bp)

Az első domináns csúcs 84 bázispárnál volt látható. Érdekes megfigyelni, hogy a csoport kezdeti abundanciája több mint 17%-ról lecsökken egészen 6%-ig. Minden bizonnyal ez a törzs nem tudott jól alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez.

Négy darab klónt vizsgáltam meg alaposan, kettőt-kettőt mindkét klónkönyvtárból. Az eredmények egybehangzóak voltak, mindegyik klón szekvenciája nagymértékben hasonló volt, így a szekvenciakeresési eredmények is ugyanazt a találatot adták. Az RDP

keresőfelületén magas konfidenciával sikerült igazolnom, hogy egy *Porphyromonadaceae* családba tartozó fajról van szó, amely az NCBI adatbázisa szerint a legközelebbi rokonságban a *Proteiniphilum acetatigenes* fajjal áll. Ezt a törzset kimutatták már más hasonló rendszerben is, szintén egy ujjlennyomat módszert (DGGE) alkalmazva [63].

5.4.3 OTU-2 (150 bp)

Ezen OTU mutatta a legnagyobb abundanciát mindkét vizsgált minta esetében. A leoltás előtt 23% körüli értéket mérhettem, míg a leoltást követő hatodik héten ez az érték 44%-ig emelkedett. Mindez azt mutatja, hogy ez a törzs kiemelt fontossággal bír a fermentáció szempontjából mind a leoltás előtt, különösképp pedig a leoltás után.

Ez esetben is összesen négy klónt vizsgáltam, egyenlő arányban kiválasztva mindkét klónkönyvtárból. Az RDP keresési és az NCBI adatbázisból történő keresések itt is egybehangzó eredményeket adtak. Habár konkrét fajjegyzést ez esetben nem találtam, mindegyik klón egy még korábban nem azonosított *Clostridiales* törzshöz mutat nagyfokú rokonságot. Ez az eredmény még nagyobb hangsúlyt fektet a típus törzsek konkrét szekvencia adatainak hiányára, amelyek elengedhetetlenül szükségesek a pontos azonosításhoz. Szerencsére azonban sok kutatócsoport foglalkozik ilyen, korábban le nem írt fajok részletes jellemzésével, aminek köszönhetően ez irányú tudásunk egyre nagyobb lesz.

5.4.4 OTU-3 (179 bp)

Ezen OTU szintén a domináns fajok közé tartozik az általam összeállított biogáztermelő rendszerben, hiszen a kezdeti abundanciája több mint 15%, ami hat hét elteltével kismértékű csökkenés után 9%-ot mutat, azonban ez nem olyan drámai változás, így azt a konklúziót vontam le, hogy ezt a törzset nem érintette különösképp a fermentor miliójában bekövetkezett változás.

A vizsgált négy klón közül, amelyek ezt a TR-F-et adták, minden esetben ugyanazt az eredményt kaptam a szekvenciaazonosítást követően. Az RDP segítségével sikerült kimutatnom, hogy itt is egy *Clostridiales* rendbe tartozó fajról van szó. Az NCBI keresés alapján a *Desulfotomaculum salinum* faj mutatta a legközelebbi rokonságot, ami meglepő tekintve a biokémiai preferenciáit [64]. Mindazonáltal mások is azonosítottak hasonló szekvenciákat biogáz rendszereket vizsgálva [65], ami azt mutatja, hogy az előfordulása nem lehet véletlen. Mivel a konfidencia érték relatíve alacsony volt (85% körüli), ezért könnyen meglehet, hogy egy rokon fajról van szó, amelynek a biokémiai tulajdonságai is eltérőek lehetnek.

5.4.5 OTU-4 (533 bp)

Ebbe a TR-F-be tartozó faj szintén drámai változáson ment keresztül a két vizsgált időpont között. A kezdeti reprezentáltsága a fermentorban majdnem eléri a 24%-ot, ami hat hét elteltével lecsökken egészen 7,5%-ra. Köszönhető volt mindez a leoltás következtében kialakult körülményeknek, amelyek vagy károsak voltak erre a csoportra, vagy egyszerűen a második OTU-ként tárgyalt mikrobafaj könnyebben tudott alkalmazkodni, ezért nagyobb teret hódított a reaktorban.

A szekvenálás után kapott eredmények itt is szép, egybehangzó eredményeket mutattak, validálva a T-RFLP módszer jó alkalmazhatóságát. Az RDP adatbázisa kétséget kizáróan megerősítette, hogy egy *Lactobacillales* rendbe tartozó *Streptococcus* fajt találtam meg, amely nagyon közel áll mind a *Streptococcus bovis*, mind pedig a *Streptococcus equinus* fajokhoz. Ezen törzsek közeli homológiáját, így azok elválasztásának nehéz mivoltát már mások is bemutatták [66, 67]. Megítélésem szerint, az oltóiszap karakterisztikáját figyelembe véve (a silókukorica mellett sertéshígtrágyával táplálják a fermentorokat), az első találatot tartom életszerűnek. Emellett mások is kimutatták már ezt a fajt kísérleti biogáz fermentorból [68].

5.4.6 Kevésbé domináns csoportok

Ezen fejezet keretén belül szeretném röviden tárgyalni az egyéb azonosított mikrobacsoportokat, amelyek abundanciája csak csekély mértékű volt. A klónkönyvtárból sikeresen azonosítottam ezek közül is számosat, így ezeket a következőkben mutatom be.

OTU-5 (60 bp) és OTU-6 (67 bp)

Ez a két csoport csak a leoltás előtti mintában volt megfigyelhető, ott is csak alacsony megoszlást mutattak a többi fajhoz képest (3% ill. 5%). Konkrét fajjegyzést csak az első csoport esetén találtam, homológia keresés után egy *Synergistaceae* családba tartozó fajra bukkantam, amely az *Anaeromaculum mobile* nevet viseli [69]. A másik csoporthoz nem sikerült konkrét fajjegyzést találni, mindössze annyit tudunk róluk, hogy a *Bacteroidetes* törzsbe tartoznak.

OTU-7 (77 bp)

Ez a törzs mindkét klónkönyvtárban reprezentálta magát, azonban W0 minta esetében a zajsűrés után nem volt látható, tehát nem érte el a 2%-ot, míg W6 esetében is alig volt több mint 2%. Konkrét fajjegyzést esetben sem sikerült találni, azonban nem meglepő módon ez a csoport is a *Clostridiales* rendbe tartozik.

OTU-8 (100 bp)

Ez a csoport csak a W6 mintában volt megfigyelhető, abundanciája majdnem 3% volt. A klónból kinyert szekvencia szintén egy *Clostridia* faj jelenlétére utalt, amely 89% hasonlóságot mutat a *Halocella cellulosilytica* fajjal.

OTU-9 (140 bp)

Az ide tartozó klónok mindkét mintában reprezentálták magukat 2,7% illetve 3,7%-os megoszlással, így jelenlétük állandónak mondható. A négy vizsgált klón mindegyike egy újabb *Clostridium* fajra mutatott, amely a *Clostridium caenicola* nevet viseli. A fajt nemrég izolálták csak biogáztermelő mikrobaközösségből, mely szerint moderáltan termofil cellulózbontó törzs [70].

OTU-10 (166 bp)

Ez esetben szintén találtam mindkét klónkönyvtárban erre a csoportra utaló klónokat. A TR-F-ek abundanciája 3% körül mozgott mindkét mintánál, azonban a szekvenálás azt mutatta, hogy minden igyekezetem ellenére nem sikerült szétválasztanom minden OTU-t teljesen, a csoport többféle mikrobából áll (*Clostridiales* és *Bacteroidales*).

OTU-11 (302 bp) és OTU-12 (435 bp)

Az itt tárgyaltak csoportok csak a W6 mintában voltak fellelhetők. Abundanciájuk 3,5%, valamint 15% voltak. Különösképp kiemelném ezen oknál fogva a 12-es taxonómiai egységet, hiszen reprezentáltsága a fermentorban a kimutatási határ alól ment fel egészen eddig. Ezért, habár ezt a csoportot a kevésbé fontosak között tárgyalom, jelentősége minden kétséget kizáró.

A szekvenálási eredmények az első csoportnál újból egy *Clostridia* faj jelenlétére utalnak, ami ismételten csak azt tükrözi, hogy habár sok fajt azonosítottunk, még rengeteg olyan mikroba van a jól jellemzett osztályokban is, ami későbbi azonosításra vár. A második csoportnál is egy *Clostridium* tűnt ki az azonosítás során, azonban itt már találtam konkrét egyezést, a *Clostridium pasteurianum* faj mindkét vizsgált klón esetében. Ezt a fajt leginkább oldószergyártáshoz, valamint hidrogéntermelő fermentációknál alkalmazzák előszeretettel [71, 72], ezért is érdekes a jelenléte ebben a környezetben, főként a megemelkedett hidrogén koncentrációt figyelembe véve.

OTU-13 (475 bp)

Erre a 3% abundanciát mutató TR-F-re utaló klónokat csak a leoltás előtti mintából tudtam szelektálni. A szekvenálás ez esetben is egy *Clostridia* fajra mutatott, ami a *Thermoanaerobacter tengcongensis* nevet viseli. A fajt kimutatták más kutatók is hasonló biogáztermelő rendszerből új generációs szekvenálást alkalmazva [42].

OTU-14 (542 bp)

Az utolsó azonosított valós TR-F 542 bázispárnál adott jelet mindkét minta esetében, azonban csak nagyon alacsony 2% körüli abundancia hányaddal. Három mintát választottam ki szekvenálásra, mindhárom egybehangzó eredménnyel egy újabb *Lactobacillus* jelenlétét igazolta, egészen pontosan az *Enterococcus cecorum*-ét. Előfordulása biogáztermelő rendszerekben nem meglepő, habár eddig csak állati (baromfi) eredetű ürülékből mutatták ki frekvencián [73].

6 Összefoglalás

A dolgozatban bemutatott munka során számos mikrobaközösség összetételének vizsgálatát végeztem el az ún. „molekuláris ujjlenyomat” modern módszereinek alkalmazásával. Ez lényegében néhány kiválasztott gén és termékeinek azonosítását jelenti, amiből fontos információk nyerhetők a bonyolult összetételű közösség felépítéséről és működéséről anélkül, hogy a közösség tagjait a mikrobiológia klasszikus eszközeivel kellene izolálnunk és azonosítanunk.

A természetben található számos, fontos folyamatban részt vevő mikrobaközösség közül kutatásaim tárgyaként a biogáztermelő anaerob populációkat választottam.

A szükséges technikák elsajátítása és a laboratóriumunkban való meghonosítása után az első kísérletsorozat keretén belül tanulmányoztam annak lehetőségét, hogy egy ilyen – akár több ezer különféle fajból álló – mikrobaközösségben hogyan lehet Real-Time PCR (qPCR) segítségével nyomon követni olyan törzseket, amelyeket a biogáztermelő folyamat serkentése céljából célzottan adtunk a természetes körülmények között a szerves anyagok anaerob lebontását végző közösséghez. Ezeket a korábbi eredményeket elsősorban „batch”, (a magyarra nehezen fordítható „szakaszos”) fermentációs rendszerekben figyeltük meg. A kiválasztott hidrogéntermelő fajokkal a laboratóriumunkban végzett korábbi kísérletek adatai szerint többlet gáztermelést lehet elérni mezofil (35-37 °C) és termofil (55-58 °C) hőmérsékleten végzett fermentációk során. A jelenség felderítése érdekében elvégzett kísérletek és molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeként megállapítottam, hogy folyamatos fermentálási körülmények között az intenzifikálás viszonylag rövid időn belül eltűnik az általunk használt 5 literes folyamatos üzemű laboratóriumi biogáz reaktorokban. Számos paramétert megváltoztatva arra a következtetésre jutottam, hogy a bevitt hidrogéntermelő baktérium törzs kihígulásáért a fermentorokban stabilan fenntartható biogáztermelés érdekében gyakran alkalmazott alacsony tápanyag bevitel volt felelős. Duplájára emelt biomassza adagolás esetén a megemelt gázhozam és a mikrobaközösségbe bevitt törzsre jellemző DNS mennyisége is állandónak bizonyult időben a fermentáció egész időtartama alatt mindkét alkalmazott hőmérsékleten. Mivel a mezofil és termofil biogáztermelés során eltérő összetételű mikrobaközösség végzi az anaerob lebontási

feladatokat, ezért más-más hidrogéntermelő törzset kellett választanunk a két hőmérsékleti tartományban végzett biogáztermelés számára.

A laboratóriumunkban végzett célzott kutatások eredményeként felismertük, hogy biogázt nem csak a széles körben alkalmazott mezőgazdasági hulladékokból lehet hatékonyan előállítani, hanem olyan élelmiszeripari melléktermékekből is, mint például a vágóhidakon keletkező és veszélyes hulladéknak számító vérfehérje vagy a tejiparban nagy mennyiségben képződő kazein. Ehhez a munkához kapcsolódva azt vizsgáltam meg, hogy a különleges és szokatlan tápanyaghoz adaptálódó mikrobaközösség legérzékenyebb és a biogáztermelés szempontjából kulcsfontosságú tagjai, a metanogén archaeák hogyan reagálnak a rendszerben bekövetkezett változásokra. Az adaptált mikrobaközösség jellemzését az *mcrA* génre, valamint az univerzális 16S *rRNS* génekre tervezett primer párok és a T-RFLP technika alkalmazásával végeztem el. Sikeresen alkalmaztam a mikrobaközösségek tanulmányozására kidolgozott T-RFLP eljárást, amely jelenleg az egyik leghatékonyabb módszer a hasonló, összetett mikrobaközösségek kutatásában. Eredményeim azt mutatták, hogy a megváltozott tápanyag ellátás meghatározó hatással van a biogáz képződés legutolsó lépcsőfokán álló metanogén archaeabaktériumok közösségére is. Ez azért figyelemre méltó, mert ezek a mikrobák nem kerülnek közvetlen kapcsolatba a rendszerbe adagolt tápanyagfélésekkel, csak a lebontási lánc egységes termékeit, az illékony szerves savakat és hidrogént tudják hasznosítani. Azonosítottam számos, a mikrobaközösség metántermelő csoportjában meghatározó metanogén törzset. Eredményeim jó egyezést mutattak az ugyanezek a rendszereken függetlenül elvégzett metagenom DNS szekvenálások alapján levont következtetésekkel. Ezzel a kétféle módszertani megközelítés egymást kölcsönösen validálni tudta.

A dolgozatban bemutatott harmadik nagy kísérlet sorozatban a „molekuláris ujjlenyomat” megközelítést annak a kérdésnek a megválaszolására alkalmaztam, hogy miként alakul át vagy módosul a biogáztermelő természetes mikrobaközösség az intenzifikálás érdekében hozzáadott, mikrobiológiailag tiszta hidrogéntermelő törzs hatására. A kísérletektől azt vártuk, hogy a vizsgálatok rámutatnak azokra a fontosabb változásokra, amelyek az általunk bevitt törzs jelenlétét és működését kíséri az eubakteriális közösségben. Bizonyítékot nyertünk arra, hogy a mikrobaközösség határozottan reagál a beavatkozásra, több domináns rendszertani

csoport drámai változásokon ment keresztül a megváltozott közösségi összetétel eredményeként. A kívülről bevitt baktériumok sorsát is folyamatosan nyomon követtem a rendszerben. A közösség korábban ismeretlen tagjait megnyugtató bizonyossággal azonosítottam és a róluk, valamint a közösség többi tagjairól rendelkezésre álló információ alapján igyekeztem értelmezni a mikrobáknak a közösségben betöltött szerepét és a biogáztermeléshez való hozzájárulásuk módját.

Vizsgálataim eredményei elsősorban az alapkutatást, a mikrobaközösségek felépítését és működését befolyásoló folyamatok megértését segítik elő, de megfigyeléseink egy része közvetlenül a gyakorlatban is hasznosítható a biogáz, mint az egyik legígéretesebb energiahordozó minél gazdaságosabb előállítására területén. Természetesen e rendkívül bonyolult mikrobiológiai közösségek működését irányító folyamatok és szabályok pontos feltárása sok további kutatást követel laboratóriumi és ipari szinten egyaránt.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Kovács L. Kornélnak és Dr. Bagi Zoltánnak, a témavezetőimnek a szakmai irányításért, valamint hogy biztosították számomra a lehetőséget ezen dolgozat elkészüléséhez. Köszönöm továbbá az SZTE Biotechnológiai Tanszék vezetőjének, Dr. Rákhely Gábornak, hogy munkámat a tanszéken végezhettem el. Kovács Etelka doktorjelöltnek köszönöm a munkámhoz nyújtott szakmai segítséget, valamint az SZTE Biotechnológiai Tanszéken, illetve az MTA SZBK Biofizika Intézetében dolgozó valamennyi kollegának, akik nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

7 Irodalomjegyzék

1. Bai, A., *A biogáz 2007*, Budapest: Száz magyar falu könyvesháza Kht.
2. Hanreicha, A., Schimpf, u., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Benndorf, D., and R. Heyer, Rapp, E., Pühler, A., Reichl, U., Klocke, M., *Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation*. Systematic and Applied Microbiology, 2013. **36**: p. 330-338.
3. Bagi, Z., Acs, N., Balint, B., Horvath, L., Dobo, K., Perei, K.R., Rakhely, G., Kovacs, K.L., *Biotechnological intensification of biogas production*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **76**(2): p. 473-482.
4. Liu, Y., *Taxonomy of Methanogens*, in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, T. McGenity, Editor 2010, Springer. p. 547-558.
5. Deppenmeier, U., *The Unique Biochemistry of Methanogenesis*2002.
6. Lantz, M., *The economic performance of combined heat and power from biogas produced from manure in Sweden – A comparison of different CHP technologies*. Applied Energy, 2012. **98**: p. 502-511.
7. Ryckebosch, E., Drouillon, M., Vervaeren, H., *Techniques for transformation of biogas to biomethane*. Biomass and Bioenergy, 2011. **35**: p. 1633-1645.
8. Owamaha, H.I., Dahunsi, S.O., Oranusi, U.S., Alfa, M.I. , *Fertilizer and sanitary quality of digestate biofertilizer from the co-digestion of food waste and human excreta*. Waste Management, 2014. **In Press**.
9. Pepper, I.L., Gerba, C. P., *Cultural Methods*, in *Environmental Microbiology (Second Edition)*2009.
10. Mullis, K.B., Fed, F., Gibbs, R.A., *PCR - The Polymerase Chain Reaction*1994.
11. Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., *Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**: p. 4576-4579.

12. Zoetendal, E.G., Akkermans, A. DL., de Vos, W. M., *Molecular Characterisation of Microbial Communities Based on 16S rRNA Sequence Diversity*, in *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data* 2001. p. 267–298.
13. Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W., *The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill*. *Microbiology*, 2002. **148**(11): p. 3521-3530.
14. Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., and Top, E.M., *Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants*. *FEMS Microbiology Ecology* 2002. **39**(2): p. 101-112.
15. de Araújo, J.C., Schneider, R.P., *DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms*. *Water Research*, 2008. **42**(20): p. 5002-5010.
16. Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA*. *Applied Environmental Microbiology*, 1997. **63**(11): p. 4516-4522.
17. Schütte, U.M., Abdo, Z., Bent, S.J., Shyu, C., Williams, C.J., Pierson, J.D. , Forney, L.J., *Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008. **80**(3): p. 365-380.
18. Osborn, A., Moore, E. , Timmis, K. , *An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics*. *Environmental Microbiology* 2000. **2**(1): p. 39-50.
19. Horz, H.-P., Rotthauwe, J.-H., Lukow, T., Liesack, W., *Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products*. *Journal of Microbiological Methods*, 2000. **39**(3): p. 197-204.
20. Lueders, T., Friedrich, M. W., *Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA*

- genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts.* Applied Environmental Microbiology, 2003. **69**(1): p. 320-326.
21. Micley, P.W., Ayly L. T., *Real-time quantitative PCR: Uses in discovery research*, in *PCR Applications Protocols for Functional Genomics*1999, Academic Press. p. 365–375.
 22. Rainey, F.A., Donnison, A.M., Janssen, P.H., Saul, D., Rodrigo, A., Bergquist, P.L., Daniel, R.M., Stackebrandt, E., Morgan, H.W., *Description of Caldicellulosiruptor saccharolyticus gen. nov., sp. nov: An obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium.* FEMS Microbiology Letters, 1994. **120**: p. 263-266.
 23. Herbel, Z., Rakhely, G., Bagi, Z., Ivanova, G., Acs, N., Kovacs, E., Kovacs, K.L., *Exploitation of the extremely thermophilic Caldicellulosiruptor saccharolyticus in hydrogen and biogas production from biomasses.* Environmental Technology, 2010. **31**(8-9): p. 1017-1024.
 24. Ivanova, G., Rákhely, G., Kovács, K. L., *Hydrogen production from biopolymers by Caldicellulosiruptor saccharolyticus and stabilization of the system by immobilization.* International Journal of Hydrogen Energy, 2008. **33**(23): p. 6953–6961.
 25. Yan, R., Yi, R., Zhemin, Z., Guo, X., Li, Y., Feng, L., Wang, L., *Complete Genome Sequence of Enterobacter cloacae subsp. cloacae Type Strain ATCC 13047.* Journal of Bacteriology, 2010. **192**(9): p. 2463-2464.
 26. Kovács, K.L., Ács, N., Kovács, E., Wirth, R., Rákhely, G., Strang, O., Herbel, Z., Bagi, Z., *Improvement of biogas production by bioaugmentation.* BioMed Research International, 2013. **2013**: p. 7.
 27. Zoetendal, E.G., Heilig, H., Klaassens, E.S., Booijink, C., Kleerebezem, M., Smidt, H., de Vos, W.M., *Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract.* Nature Protocols, 2006. **1**(2): p. 870-873.
 28. Elkins, K.M., *Determination of DNA Quality and Quantity Using UV-Vis Spectroscopy*, in *Forensic DNA Biology*2013.
 29. Green, M.R., Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*2012: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

30. Thies, J.E., *Molecular Methods for Studying Soil Ecology*, in *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Third Edition)*, A.P. Eldor, Editor 2007, Elsevier. p. 85-118.
31. Tindall, K.R., Kunkel, T.A. , *Fidelity of DNA Synthesis by the Thermus aquaticus DNA Polymerase*. *Biochemistry*, 1988. **27**: p. 6008-6013.
32. <http://trex.biohpc.org/>.
33. http://www.viogene.com/product_pic/20131120092546DC1001-1002%201119.pdf.
34. Karcher, J.S., *Recombinant DNA cloning*, in *Molecular Biology*1995, Academic Press. p. 45-134.
35. Te'o, V.S.J., Saul, D. J., Bergquist, P. L. , *celA, another gene coding for a multidomain cellulase from the extreme thermophile Caldocellum saccharolyticum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995. **43**(2): p. 291-296.
36. Andriani, D., Wresta, A., Atmaja, T.D., Saepudin, A., *A Review on Optimization Production and Upgrading Biogas Through CO2 Removal Using Various Techniques*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014. **172**: p. 1909-1928.
37. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042446.pdf.
38. Kovács, E., Wirth, R., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K. L., *Biogas Production from Protein-Rich Biomass: Fed-Batch Anaerobic Fermentation of Casein and of Pig Blood and Associated Changes in Microbial Community Composition*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. 1-18.
39. Ács, N., Kovács, E., Wirth, R., Bagi, Z., Strang, O., Herbel Z., Rákhely, G., Kovács, K. L., *Changes in the Archaea microbial community when the biogas fermenters are fed with protein-rich substrates*. *Bioresource Technology*, 2013. **131**: p. 1121-127.
40. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
41. Anderson, I.J., Sieprawska-Lupa, M., Lapidus, A., Nolan, M., Copel, A., Glavina T., Rio, D., Tice, H., Dalin, E., Barry, K., Saunders, E., Han, C., Brettin, T., Detter, J. C., Bruce, D., Mikhailova, N., Pitluck, S., Hauser. L., Land, M., Lucas, S., Richardson, P., Whitman, W. B. ,Kyrpides N. C., *Complete genome sequence of Methanoculleus marisnigri Romesser et al. 1981 type strain JRI*. *Standards in Genomic Sciences* 2009. **1**: p. 189-196.

42. Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N.N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Krahn, I., Krause, L.b, Krömeke, H., Kruse, O., Mussnug, J.H., Neuweger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte, K.J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P., Goesmann, A., *The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology*. Journal of Biotechnology, 2008. **136**(1-2): p. 77-90.
43. Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. R., Gartemann, K-H., Krömeke, H., Neuweger, H., Pühler, A., Runte, K. J., Schlüter, A., Stoye, J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Goesmann, A., *Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor*. Journal of Bacteriology, 2008. **136**: p. 91-101.
44. Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K.L., *Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing*. Biotechnology for Biofuels, 2012. **5**(41).
45. Klocke, M., Mähnert, P., Mundt, K., Souidi, K., Linke, B., *Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate*. Systematic and Applied Microbiology, 2007. **30**(2): p. 139-151.
46. De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., Verstraete, W., *Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation*. Bioresource Technology, 2012. **112**: p. 1-9.
47. Engebretson, J.J., Moyer, C.L., *Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism*. Applied Environmental Microbiology, 2003. **69**(8): p. 4823-4829.
48. Zellner, G., Alten, C., Stackebrandt, E., *Isolation and characterization of Methanocorpusculum parvum, gen. nov., spec. nov., a new tungsten requiring, coccoid methanogen*. Archives of Microbiology, 1987. **147**(1): p. 13-20.
49. Dridi, B., Henry, M., Richet, H., Raoult, D., Drancourt, M., *Age-related prevalence of Methanomassiliicoccus luminyensis in the human gut microbiome*. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 2012.

50. Dridi, B., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Raoult, D., Drancourt, M., *The antimicrobial resistance pattern of cultured human methanogens reflects the unique phylogenetic position of archaea*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2011. **66**(9): p. 2038-2044.
51. Maus, I., Wibberg, D., Stantscheff, R., Eikmeyer, F-G., Seffner, A., Boelter, J., Szczepanowski, R., Blom, J., Jaenicke, S., König, H., Pühler A., Schlüter, A., *Complete Genome Sequence of the Hydrogenotrophic, Methanogenic Archaeon Methanoculleus bourgensis Strain MS2T, Isolated from a Sewage Sludge Digester*. Journal of Bacteriology, 2012. **194**(19): p. 5487-5488.
52. Joulian, C., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Roger, P.A. , *Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils*. FEMS Microbiology Ecology, 1998. **25**: p. 135-145.
53. Rastogi, G., Ranade, D.R., Yeole, T.Y., Patole, M.S., Shouche, Y.S., *Investigation of methanogen population structure in biogas reactor by molecular characterization of methyl-coenzyme M reductase A (mcrA) genes*. Bioresource Technology, 2008. **99**(13): p. 5317-5326.
54. Tang, Y., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K., *Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005. **99**(2): p. 150-164.
55. Leahy, S.C., Kelly, W.J., Altermann, E., Ronimus, R.S., Yeoman, C.J., Pacheco, D.M., Li, D., (...), Attwood, G.T., *The genome sequence of the rumen methanogen Methanobrevibacter ruminantium reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions*. PloS one, 2010. **5**(1): p. e8926.
56. Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., *Review and re-analysis of domain-specific 16S primers*. Journal of Microbiological Methods, 2003. **55**(3): p. 541-555.
57. Chong-Song, C., Liu, Y., Cummins, M., Valentine, D.L., Boone, D.R., *Methanogenium marinum sp. nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002. **81**(1-4): p. 263-270.
58. DasSarma, S., Coker, J. A., DasSarma, P., *Archaea (overview)*, in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*2009, Academic Press. p. 1-23.

59. Volant, A., Desoeuvre, A., Casiot, C., Lauga, B., Delpoux, S., Morin, G., Personné, J.C., Héry, M., Elbaz-Poulichet, F., Bertin, P.N., Bruneel O., *Archaeal diversity: temporal variation in the arsenic-rich creek sediments of Carnoulès Mine, France*. Extremophiles, 2012. **16**(4): p. 645-657.
60. Seung, G.S., Gyuseong, H., Juntaek, L., Changsoo, L., Seokhwan, H., *A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater*. Water Research, 2010. **44**(17): p. 4838-4849.
61. Nelson, M.C., Morrison, M., Zhongtang, Y., *A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters*. Bioresource Technology, 2011. **102**(4): p. 3730-3739.
62. Xia, Y., Massé, D. I., McAllister, T. A., Kong, Y., Seviour, R., Beaulieu, C., *Identity and diversity of archaeal communities during anaerobic co-digestion of chicken feathers and other animal wastes*. Bioresource Technology, 2012. **110**: p. 111-119.
63. Pobeheim, H., Munk, B., Müller, H., Berg, G., Guebitz, G. M., *Characterization of an anaerobic population digesting a model substrate for maize in the presence of trace metals*. Chemosphere, 2010. **80**: p. 829-836.
64. Nazina, T.N., Rozanova, E.P., Beliakova, E.V., Lysenko, A.M., Poltarau, A.B., Turova, T.P., Osipov, G.A., Beliaev, S.S., *Description of Desulfotomaculum nigrificans subsp. salinus as a new species, Desulfotomaculum salinum sp. nov.* Microbiology, 2005. **74**(5): p. 654-662.
65. Tsutomu, K., Yueqin, T., Toyoshi, U., Shigeru, M., Kenji K., *Digestion performance and microbial community in full-scale methane fermentation of stillage from sweet potato-shochu production*. 2014. **26**: p. 423-431.
66. Hinse, D., Vollmer, T., Erhard, M., Welker, M., Moore, E.R.B., Kleesiek, K., Dreier, J., *Differentiation of species of the Streptococcus bovis/equinus-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to sodA sequence analyses*. Systematic and Applied Microbiology, 2011. **34**(1): p. 52-57.
67. Farrow, J.A.E., Kruze, J., Phillips, B.A., Bramley, A.J., Collins, M.D. , *Taxonomic Studies on Streptococcus bovis and Streptococcus equinus: Description of Streptococcus alactolyticus sp. nov. and Streptococcus saccharolyticus sp. nov.* Systematic and Applied Microbiology, 1984. **5**(4): p. 467-482.

68. Fang, H.H.P., Zhang, T., Liu, H., *Fang HHP, Zhang T, Liu H. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. 58: p. 112-118.*
69. Menes, R.J., Muxí, L., *Anaerobaculum mobile sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptidefermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus Anaerobaculum. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002. 52: p. 157-164.*
70. Shiratori, H., Sasaya, K., Ohiwa, H., Ikeno, H., Ayame, S., Kataoka, N., Miya, A., Beppu, T., Ueda, K., *Clostridium clariflavum sp. nov. and Clostridium caenicola sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009. 59: p. 1764-1770.*
71. Kao, W.C., Lin, D.S., Cheng, C.L., Chen, B.Y., Lin, C.,Y., Chang, J.S., *Enhancing butanol production with Clostridium pasteurianum CH₄ using sequential glucose–glycerol addition and simultaneous dual-substrate cultivation strategies Bioresource Technology, 2013. 135: p. 324-330.*
72. Yung-Chung, L., Xue-Jiao, C., Chi-Yu, H., Ying-Jin Y., Jo-Shu, C., *Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. International Journal of Hydrogen Energy, 2013. 38: p. 15815-15822.*
73. Devriese, L.A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K., Haesebrouck, F., *Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. International Journal of Food Microbiology, 1995. 26: p. 187-197.*

A PhD dolgozat összefoglalása

Jelen társadalmunk egyértelmű meghatározója az energiaszükség. Ez a népesség növekedésével egyenes arányosságban emelkedik, így a hagyományosan használt fosszilis tüzelőanyagok hamarosan már nem lesznek képesek kielégíteni a felmerülő szükségleteket. Figyelmünket egyre inkább a megújuló energiahordozók felé kell irányítani, hiszen csak ezekkel vagyunk képesek a fenntartható fejlődés megőrzésére.

Egy igen ígéretes környezetbarát energiaforrás a biogáz, hiszen szinte bármilyen biomasszából képesek vagyunk természetes mikrobapopuláció felhasználásával értékes biometánt előállítani. Ezáltal kettős célt valósítunk meg, mivel a hulladéknak, vagy sok esetben akár veszélyes hulladéknak minősülő biomasszából képesek vagyunk energia előállítására, amelyet nem csak eladhatunk, hanem így megtakaríthatjuk az esetleges ártalmatlanítás költségeit is.

Három fő mikroba csoport játszik szerepet az anaerob biokonverzióban: a hidrolizáló baktériumok, az acetogén baktériumok, valamint a metanogén archaeabaktérium törzsek. A polimerbontó törzsek megtámadják a nagymolekulájú szerves anyagokat különféle extracelluláris enzimeik segítségével, melynek eredményeként oligo- és monomer köztitermékek keletkeznek. Az acetogének ezeket a köztitermékeket hasznosítják, az anyagcsere folyamataik eredményeként szerves savak keletkeznek, mint például hangyasav, ecetsav, propionsav, vajsav valamint szén-dioxid. Más acetogén törzsek képesek felhasználni ezeket a szerves savakat például etanolt, hidrogént és szén-dioxidot termelve. A fermentációs folyamat utolsó lépcsőfokán álló metanogén törzsek a szerves savak, hidrogén és szén-dioxid felhasználásával metánt állítanak elő, amely a biogáz fő komponense a szén-dioxid mellett.

Sajnos ez az igen sokrétűen felhasználható zöld energia árban még nem veszi fel a versenyt a nem megújuló társaival, ezért is szükséges a versenyképességén javítani. Ezt elérhetjük oly módon is, ha a rendszer hatékonyságát növeljük azáltal, hogy felismerjük azokat a lépéseket, amelyek a sebességet korlátozzák, így utána beavatkozhatunk, annak érdekében, hogy egy nagyobb hatásfokkal működő technológiát kapjunk, amely végső soron

olcsóbb biogáz előállításához vezethet. Ennek eléréséhez szükséges jobban megismernünk a különféle biogáztermelő rendszerek komplex mikrobiológiai összetételét. Ezt hagyományos mikrobiológiai módszerekkel nem tudjuk megvalósítani, molekuláris biológiai eszközöket kell alkalmaznunk.

A dolgozat elkészítéséhez több ilyen módszert (Real-Time PCR, T-RFLP) is alkalmaztam, hogy ezek segítségével nagyobb ablakot nyithassak a vizsgált reaktorokban dolgozó mikrobák sokaságára. Ezen ujjenyomati módszerekről már számos esetben kiderült, hogy megfelelően alkalmazhatóak akár ilyen komplex rendszerek vizsgálatára is. Reprodukálhatónak, jól alkalmazhatónak, illetve költséghatékonyak bizonyultak más alkalmazásokkal összehasonlítva.

Dolgozatomban bemutattam több, a biogáz reaktorba kívülről bevitt baktérium pozitív hatását a gáztermelésre, valamint nyomon követtem azok mennyiségi változását a reaktorokban. Bemutattam, hogy a korábban tapasztalt intenzifikáció eltűnéséért az alacsony szubsztrát beviteli mennyiség volt a felelős. A duplájára megemelt tápanyagbevitel pozitív hatással volt a bevitt baktériumtörzsek túlélésére a fermentorban, azok mennyisége, mind pedig a gázhozam többlet stabilnak bizonyult.

Megvizsgáltam továbbá egy normál paraméterek mellett üzemeltetett biogáz fermentor mikrobiális közösségét a Metil koenzim-M reduktáz enzim nagy alegységének génje (*mcrA*), valamint a riboszomális RNS kis alegységének génje (16S *rRNS*) segítségével. Nyomon követtem a metanogén populáció összetételének időbeni változását, miközben a biogáztermelő közösséget proteinben gazdag tápanyaghoz adaptáltuk. Megállapítottam, hogy a megváltozott tápanyag hatására nem csak a hidrolizáló, valamint az acetogén baktériumok összetétele változik, hanem a metanogének is reagálnak a megváltozott körülményekre.

Ezen felül meghatároztam egy silókukoricával működtetett fermentor eubakteriális mikrobaközösségét, különös tekintettel a domináns fajokra, valamint ezen törzsek átrendeződését is nyomon követtem az időben, ami egy kívülről beadott hidrogéntermelő törzs integrációjának volt köszönhető. Bemutattam, hogy a leoltott baktérium ez esetben is jótékony hatással volt a gázkihozatalra, valamint hogy hatással volt a fermentor eubakteriális közösségének szerkezetére is.

Összefoglalásként elmondható tehát, hogy számos kísérleti biogáz képző rendszert vizsgáltam meg molekuláris biológiai módszerekkel, melyekből sikerült nyomon követnem a leoltott baktériumokat. Emellett a biogáz reaktorok archaeális, valamint eubakteriális mikrobaközösségét is sikerült monitoroznom, azokból a domináns csúcsokat azonosítanom.

A fehérje alapanyagok anaerob biogáz fermentációjával kapcsolatos munkánkat EP 12805746.0 számon szabadalmi oltalmat nyert az Európai Szabadalmi Hivataltól.

Summary of the Ph.D. Thesis

The energy consumption is a basic prerequisite in our modern society. The amount of the energy need is increasing with the population growth hence the fossil energy carriers cannot satisfy the demand. Consequently, we must focus on the renewable energy carriers in order to achieve sustainable development.

Biogas is a promising and environmentally friendly energy carrier, since almost any kind of organic material can be converted to biomethane exploiting the unique microbial consortia that produces the biogas. In the biogas reactor we can hit two birds with the same stone as elimination of organic waste, which is often considered as hazardous, is combined with the production of valuable green energy at the same time. In other words, we can save money on the elimination of the waste during the production of biogas.

There are three distinct microbial groups involved in the biogas generation, namely the hydrolysing bacteria, the acetogenic bacteria and the methanogenic archaeobacteria. The polymer degrading bacteria attack the various organic materials such as fat, polysaccharides or cellulose with their exoenzymes to produce oligomers and monomers. These intermediates are used by the acetogenic bacteria to produce volatile fatty acids like formate, acetate, propionate, or butyrate. Other acetogenic microbes can use these compounds to produce carbon dioxide, ethanol or hydrogen. Finally the last step in this microbial food chain is carried out by the methanogenic archaeobacteria, which release methane and carbon dioxide together with traces of other gases.

Unfortunately, this versatile green energy source cannot compete in price with the fossil energy carriers. This underlines the importance of the need to improve the competitiveness of the technology. Improvement can be achieved via the intensification of the system efficacy, which in turn requires a thorough understanding of the metabolic bottlenecks of the process. Such intervention may bring about cheaper bioenergy production. Therefore in-depth knowledge about the complex microbial consortium, the driving force of biogas generation, is indispensable. Due to the complexity of the system conventional microbiological methods cannot be used up to date molecular biological tools must be employed.

In this study several molecular detection and fingerprinting methods were used (Real Time PCR, T-RFLP) in order to achieve a wider knowledge about the microbial composition of various biogas producing systems. These fingerprinting methods have proven to be accurate and easy to use even when working with highly complex samples. Their reliability and cost effectiveness are outstanding relative to other molecular biological methods.

During my research the positive effect of the inoculation of several hydrogen producing bacteria to the biogas fermentor was established. The presence or absence and the microbial community variations in time as the result of an added strain were detected with the help of Real-Time PCR. I have also demonstrated that the previously observed dampening of the intensification due to the addition of a hydrogen producing strain was associated with the low biomass input into the fermentor. Doubling the feeding load restored the survival of the strain and the positive effect and sustainable and elevated biogas yield could be maintained.

In a separate set of experiments I have characterized the archaeal consortia of laboratory-size continuous biogas fermentors using the gene coding for methyl coenzyme-M large subunit (*mcrA*), which is characteristic of methanogenic archaea exclusively. In addition, a clone library using the generally occurring ribosomal RNA small subunit gene (16S *rRNA*) was also created and analysed. These data sets were compared with the library generated from the corresponding *mcrA* gene sequences on samples originating from the methanogenic community adapted to high protein content biomass substrate. It was revealed that the alteration in the substrate composition brought about a pronounced effect on the archaeobacteria although these microbes were not directly involved in the breakdown of the substrate protein molecules.

Finally, I have determined the eubacterial composition, especially the dominant groups, present in a biogas reactor fed with corn silage. This information was related to the changes in the microbial community as a result of supplementation with a hydrogen producing pure strain. The integration of this bacterium intensified the biogas yield in the fermenter by more than 20%, and it affected the eubacterial taxa as well. Almost every dominant group was involved in the community rearrangement.

As a summary, I have successfully analysed the community structure of various kinds of biogas digesters with the help of molecular fingerprinting methods. The fate of a single inoculated microbe species within the extremely diverse population of the fermentor was traced in time. I have also determined the archaeal and eubacterial microbial community of several biogas reactors and identified the dominant groups.

Our work related to the anaerobic digestion of protein-rich biogas substrates has been recognized as intellectual property (Patent number: EP-12805746.0) by the European Patent Office and the results were reported in several publications (IF=11,206).