

Biogáz termelő
mikrobaközösségek molekuláris
biológiai vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

Készítette: Ács Norbert

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél

Dr. Bagi Zoltán

Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

Szeged, 2014

Bevezetés

Jelen társadalmunk egyértelmű meghatározója az energiaszükség. A növekedő populációval az energia igényünk is együtt növekszik. Számos vizsgálat bebizonyította, hogy a jelenleg használt fosszilis energiahordozók hamarosan nem fogják tudni kielégíteni ezeket a magas igényeket. Figyelmünket egyre inkább a megújuló energiák felé kell irányítanunk újratermelő természetű és környezetbarát mivolta miatt. Ezt felismerve a legtöbb fejlett ország különféle energiastratégiákat dolgozott ki annak érdekében, hogy a fenntartható fejlődést biztosítani tudják. Magyarország az Európai Unió tagjaként vállalta, hogy 2020-ra az energiaszükségletének 14,65%-a megújuló energiából fog állni. A cél elérése érdekében sokat kell fejlődünk, hiszen a jelenlegi ez az érték 7% körül mozog. A különféle környezetbarát megújuló energiahordozók közül kiemelkedik a biogáz, hiszen szinte minden szerves anyagot felhasználhatunk anaerob módon történő lebontás útján biogáz előállítására. Ez különösen hasznos az esetben, amikor az iparban, a mezőgazdaságban vagy a

Strang O, Bagi Z, Ács N, Kovács E, Wirth R, Kovács KL (2013) Biogas production from cellulosic substrates. Acta Microbiol. Immunol. Hung., 60, 80-81. IF (2013): 0,787

Kakuk B, Strang O, Ács N, Kovács E, Rákhely G, Kovács KL, Bagi Z (2013) The impact of bacterial pretreatment on corn stover for biogas production. Bul. AGIR, 1:9-12.

Szabadalmi bejelentés

Kovács E, Kovács KL, Maróti G, Wirth R, Rákhely G, Bagi Z, Ács N (2013) Production of biogas from protein rich resources. P1100510 sz. magyar szabadalmi bejelentésből származó PCT/HU2012/000092 sz. nemzetközi bejelentésnek megfelelő 12805746.0 alapszámú európai bejelentés.

háztartásokban keletkező szerves hulladékokról beszélünk, amelyek sokszor veszélyes hulladékként költséges ártalmatlanítást igényelnek. Ily módon kezelve ezeket az anyagokat kettős célt érhetünk el egyszerre. Megtakaríthatjuk a hulladék ártalmatlanításának, vagy akár tárolásának a költségeit, illetve értékes energiához is juthatunk.

Egy különleges, nagyon összetett mikroba közösség végzi a szerves anyagok anaerob lebontását, amelyet három külön működési egységre bonthatunk. Az első csoportba tartoznak a polimert bontó mikrobák, amelyek különféle exoenzimek segítségével bontják le a nagy molekulájú szerves anyagokat. Az így keletkező intermediereket használják fel a második csoportba tartozó acetogén mikrobák, amelyek anyagcsere folyamataik végtermékeként illékony szerves savakat képeznek. A legutolsó csoportba tartozó metanogén archaeabaktériumok aztán felveszik ezeket az anyagokat, hogy elkészítsék a biogáz két fő alkotóelemét a széndioxidot valamint a metánt. A keletkező biogáz felhasználása is igen sokrétű lehet. A legegyszerűbb, ha a gázkeveréket elégetjük gázmotorokban, ami által

villamos energiára tehetünk szert közvetlenül. Ez esetben azonban elengedhetetlen a gázelegy kéntelenítése, a korrózió megelőzése érdekében. Egy másik probléma a sok esetben feleslegesen keletkező hulladék hő, ami ronthatja a hatásfokot, amennyiben nem használjuk fel megfelelő módon. Ajánlatosabb a keletkező biogázt megtisztítani a szén-dioxidtól is, melynek végeredményeként tiszta biometánt kapunk. Ez az energiahordozó alkalmas szállításra, tárolásra, illetve megfelelő törvényi szabályzás esetén akár a lakossági földgázhálózatba is betáplálható

Célkitűzés

Ahhoz, hogy a biogáz versenyképesebb energiahordozó legyen a fosszilis energiahordozókkal szemben, növelnünk kell az előállítás hatékonyságát. Ennek elérése érdekében átfogóbb tudást kell szereznünk a biogáz termelő közösségről, amelyet csak molekuláris biológiai eszközök használatával valósíthatunk meg.

A dolgozat elkészítése előtt célul tűztem ki, hogy több molekuláris biológiai módszert is alkalmazva (Real

Bagi Z, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2013) Anaerobic fermentation of distillery thin stillage. Acta Microbiol. Immunol. Hung., 60, 3. IF (2013): 0,787

Ács N, Bagi Z, Kovács E, Wirth R, Kovács KL (2013) Monitoring the biogas producing archaea community via molecular biological methods. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 60:1. IF (2013): 0,787

Összesített IF: 4,565

Egyéb közlemények

Kovács KL, Bagi Z, Ács N, Perei RK, Imre E, Telekes G, Bartha I (2009) Biotechnological methods to increase landfill gas production and degradation of organic waste. Proc. 3rd Int. Workshop “Hydro-Physico-Mechanics of Landfills”. Braunschweig, Germany, March 10-13 (2009)

Kovács KL, Kovács E, Ács N, Bagi Z (2009) Mikróbák a biogáz fermentorokban. Környezetvédelem. 17, 10-11.

Kovács KL, Kovács E, Ács N, Wirth R, Bagi Z (2010) Egy különösen hasznos megújuló energiahordozó: a biogáz. Energetika, 11, 5-8.

Bagi Z, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2011) Improvement of biogas production via microbiology. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58:3-4. IF (2011): 0,551

Kovács E, Bagi Z, Ács N, Kovács KL (2011) Biogas production from protein rich substrates. Acta Microbiol. Immunol., 58, 54-55. IF (2011): 0,551

Kovács KL, Bagi Z, Kovács E, Maróti G, Szögi-Dorogházi E, Ács N, Wirth R, Tengölics R, Fülöp A, Rákhely G (2011) Industrial microbiology for the production of biohydrogen and biogas. Acta Microbiol. Immunol., 58, 171-172. IF (2011): 0,551

Bagi Z, Kovács E, Wirth R, Ács N, Böjti T, Strang O, Kakuk B, Kovács KL (2013) Microbiology and biotechnology of biogas production. In: Teparic, R., Frice, J., Mrsa, V (eds). Power of Microbes in industry and Environment. Zagreb: Croatian Microbiological Society ISBN: 978-953-7778-06-4. pp. 18.

Kovács E, Wirth R, Maróti G, Bagi Z, Ács N, Kovács KL (2013) Changes in microbial community metagenome upon adaptation to protein substrate. Acta Microbiol. Immunol. Hung., 60, 36-37. IF (2013): 0,787

Time PCR és T-RFLP, vagyis Terminális Restrikciós Fragmenthossz Polimorfizmus) megvizsgálom a különféle biogáz reaktorok mikroba közösségeit, különös tekintettel, azok domináns tagjaira. Ezen vizsgálataim célgénjei egyrészt egyediek voltak, specifikusak az adott törzsekre (*celA*: celluláz gén nagy alegysége, *ech*: extrém kondenzált hidrogenáz génje), vagy univerzálisnak tekinthetőek az adott csoportra (*16S rRNS*: riboszomális RNS kis alegységének génje mind eubaktériumok, mind pedig archaeabaktériumok esetében, valamint *mcrA*: metil koenzim M reduktáz gén nagy alegysége a metanogének esetében). A gének előfordulási gyakoriságát időben nyomon követtem számos paraméter megváltoztatása mellett, melyek eredményeiből kulcsfontosságú információ szűrhető le az adott biogáz termelő rendszer működését illetően.

Módszerek

Vizsgálataim során 5 literes térfogatú, folyamatos üzemű fermentorokból származó mintákat analizáltam,

melyeket különféle szerves anyaggal tápláltunk (kazein, sertésvér, silókukorica, sertéshígtrágya). A speciálisan erre a célra kifejlesztett berendezések folyamatosan mérték a termelt gáz térfogatát és néhány kulcsfontosságú működési paramétert (pH, redox potenciál, hőmérséklet). Az általam végzett fermentációk esetében a keletkezett gáz összetételét a fermentáció teljes időszakában gázkromatográf segítségével nyomon követtem. A fermentációs folyamat során keletkező szerves savak mennyiségének változását folyadék kromatográfia (HPLC) alkalmazásával követtem nyomon. A fermentorhoz külsőleg hozzáadott hidrogéntermelő baktériumok mennyiségét specifikusan tervezett primerek, valamint Real-Time PCR segítségével határoztam meg. Az archaeális mikrobaközösséget T-RFLP módszerrel, az *mcrA*, valamint a *16S rRNS* génszakaszok analizálásával valósítottam meg. Az eubakteriális mikrobaközösséget csak a *16S rRNS* génszakasz vizsgálatával határoztam meg. A kapott csúcissorozatok kiértékeléséhez, a T-REX on-line kiértékelő szoftvert használtam, míg a csúcsok azonosításához klónkönyvtárakat hoztam létre minden

Konferencia kiadványok

Kovács KL, Bagi Z, Ács N, Kovács E, Wirth R, Rákhely G (2011) Biohydrogen and Biogas Biotechnology. Proc. The Bioenergy Question: Reality or Wishful Thinking. Tulln, Austria, pp. 11-13.

Kovács KL, Bagi Z, Ács N, Kovács E, Wirth R, Maróti G, Rákhely G (2011) Engineering biogas microbial communities. Proc. 1st Int. Conf. on Biogas Microbiology. Leipzig, Germany. p. 46.

Ács N, Bagi Z, Kovács E, Wirth R, Rákhely G, Kovács KL (2011) Monitoring archaea and selected strains of bacteria in a biogas producing system via their unique genes. Proc. 1st Int. Conf. on Biogas Microbiology. Leipzig, Germany. p. 66.

Bagi Z, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2011) Anaerobic fermentation of distillery thin stillage. Proc. 1st Int. Conf. on Biogas Microbiology. Leipzig, Germany. p. 68.

Ács N, Rákhely G, Bagi Z, Kovács E, Kovács KL (2011) The usage of real-timePCR to monitor specific eubacteria in biogas producing systems. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58:1-2. IF (2011): 0,551

A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó közlemények

Bagi Z, Ács N, Bálint B, Horváth L, Dobó K, Perei KR, Rákhely G, Kovács KL (2007) Biotechnological intensification of biogas production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:473-482. IF (2007): 2,569

Herbel Zs, Rákhely G, Bagi Z, Ivanova G, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2010) Exploitation of the extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in hydrogen and biogas production from biomasses. Env. Technol. 31(8-9):1017-1024. IF (2010): 1,007

Ács N, Kovacs E, Wirth R, Bagi Z, Strang O, Herbel Zs, Rákhely G, Kovács, KL (2013) Changes in the Archaea microbial community when the biogas fermenters are fed with protein-rich substrates. Bioresource Technology 131: 121-127. IF (2013): 4,750

Kovacs KL, Acs N, Kovacs E, Wirth R, Rakhely G, Strang O, Herbel Z, Bagi Z (2013) Improvement of biogas production by bioaugmentation. BioMed Research International, Article ID 482653, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/482653> IF (2013): 2,880

Összesített IF: 11,206

minta esetében. Ezekből előzetes vizsgálatok után kiválogattam a különös fontossággal bírót, majd ezeknek meghatároztam a bázissorrendjét. Az így kapott szekvencia adatokat on-line hasonlóság keresésnek alávetve (NCBI BLAST, RDP) kutattam rokon törzsek után.

Eredmények

1. Sikeresen kidolgoztam egy azonosítási eljárást mindkét általunk alkalmazott hidrogéntermelő törzs esetében specifikus génekre (*celA*, *ech*) alapozva. A módszer segítségével megállapítottam, hogy a korábban bizonyos körülmények között tapasztalt csökkenés a gázhozam intenzifikációban az alacsony terheléssel beadagolt biomassza miatt állt elő. Kétszeresére megemelt tápanyag bevitel hatására stabilnak bizonyult a baktérium sejtszám a fermentorban, valamint az általuk generált biogáz többlet is.

2. Dolgozatomban bemutattam, egy tipikus paraméterek mellett működő fermentor archaeális mikroba összetételét, mind *mcrA*, mind pedig 16S *rRNS* géneket vizsgálva T-RFLP módszer segítségével. Meghatároztam a domináns fajokat, illetve a legközelebbi rokontörzseket, ahol a szekvencia keresés egyezést mutatott. A kapott adatokat összevettem irodalmi adatokkal, értelmezve így az eredményeimet.

3. Megvizsgáltam két, magas proteintartalmú alapanyaghoz adaptált fermentor archaeális mikrobaközösségeit az *mcrA* gén segítségével T-RFLP módszert használva. Ez esetben is azonosítottam a domináns fajokat, valamint meghatároztam az azokhoz legközelebb álló rokon fajokat. Megállapítottam, hogy az adaptáció hatására komoly változással reagál a metanogén közösség is, ami azért érdekes felfedezés, számukra a rendszerben biztosított szubsztrátok (illékony szerves savak és hidrogén) kémiai természete lényegében alapanyag független.

4. Meghatároztam egy silókukoricával táplált folyamatos üzemmódban működtetett biogáz fermentor működési paramétereit és eubakteriális mikrobaközösségét azok 16S *rRNS* génszekvenciái alapján, különös tekintettel a domináns fajokra. A nagy gyakorisággal előforduló fajok jelenlétét szakirodalmi adatok is alátámasztották.

5. Ezt követően változatlan körülmények mellett üzemeltetve a kísérleti fermentorokat leoltottam a korábban is vizsgált hidrogéntermelő törzssel. A biogáz termelő mikroba közösséghez adott baktériumok hatására több mint 20%-os növekedést tapasztaltam a gázképződésben a kontroll fermentorhoz képest. Ez esetben is meghatároztam a fermentor eubakteriális összetételét, amely számottevő eltéréseket mutatott az előzőekben detektáltakhoz képest.