

**Bakteriális partnerek által elősegített foto-
fermentatív hidrogéntermelés *Chlamydomonas*
algában**

Ph.D. Tézisek

Készítette:

Lakatos Gergely

Témavezető:

Dr. Maróti Gergely

Biológia Doktori Iskola
MTA SZBK Biokémia Intézet
SZTE TTIK

Szeged

2015.

Bevezetés

Az ipari forradalom kezdete óta a fosszilis energiahordozók egyre nagyobb mértékű felhasználása miatt a légkör széndioxid tartalma fokozatosan növekedett. Fosszilis energiahordozóként kezdetben szenet használtak, majd az idő előrehaladtával egyre nagyobb szerepet kapott először az olaj, majd később a földgáz. Felhasználásuk mértéke napjainkban is fokozatosan növekszik. Használatuk az egyre nagyobb mennyiségű üvegházhatású széndioxid keletkezése mellett számos más problémát is felvet. A felhasználható források száma véges, viszont a felhasználás intenzitása hosszú távon folyamatosan növekszik. A források lelőhelye legtöbbször nem esik egybe a felhasználás helyével, további környezetszennyezési problémákat és geopolitikai kríziseket idézve elő. A felhasználásuk során nyert energia mennyisége nagymértékben meghatározza az egyes országok gazdasági teljesítőképességét. Ezért a gazdaság fokozatos fejlődéséhez és a lakosság életszínvonalának növekedéséhez elengedhetetlenül szükséges a felhasználási mennyiségük növelése.

A fosszilis energiahordozók részarányának csökkentésére és kiváltására számos alternatív módszer létezik. Napjainkban egyre gyorsabban terjednek a megújuló energiaforrásokat - mint a Nap, szél és víz - hasznosító technológiák. Ezen technológiák egyik komoly hátránya, hogy az így termelt energiát nehéz tárolni, ezért jelentős részét rögtön fel kell használni. A megújuló energiaforrások tárolására nyújthat kiváló eszközt a molekuláris hidrogén használata, amelynek elégetése során melléktermékként csupán vízgőz keletkezik. Energiatároló kapacitása igen magas, egy grammja 122 kJ energiát képes raktározni. A szénhidrogén alapú üzemanyagokéhoz hasonlítva ez 2.75-ször nagyobb. Szállítása megoldható a már kiépített gázvezeték rendszereken keresztül. Tárolása nagynyomású tartályokban kivitelezhető. Üzemanyagként és fűtőanyagként való felhasználása mellett még olajfinomításra, élelmiszeripari termékek előállítására, fémmegmunkálásra és műtrágya előállítására is alkalmazható. Előállítása történhet a víz elektrolízisével, viszont ez sok energiát igényel. Ezért napjainkban a hidrogén leginkább elterjedt előállítási módszere a gőzreformálás földgázból vagy metánból. Ezen technológia jövőbeli kiváltását célozza számos, jelenleg kutatási fázisban lévő biohidrogéntermelő módszer fejlesztése. Ezek közül biztató eredményeket mutatnak a zöldalgákhoz köthető biohidrogén előállítással kapcsolatos kutatások.

A zöldalgák közül egyes *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* és *Chlorella* fajokban megfelelő környezeti hatásokra bizonyítottan FeFe hidrogenázok aktiválódnak. A FeFe

hidrogenázok jó hatékonysággal, megközelítőleg 10%-os konverzióval, képesek a biohidrogén előállításra. Viszont jellemző rájuk az oxigénérzékenység, amely a direkt fotolízis útján történő folyamatos hidrogéntermelésnek komoly gátat szab. Erre kínál megoldást az indirekt fotolízis alkalmazása, melynek során először a fényből nyert energia elraktározódik, majd a tartalék tápanyagok lebontásával felhasználódik. Mindez lehetővé teszi az oxigén és hidrogéntermelés szakaszainak szétválasztását időben, és lehetőséget nyújt arra, hogy a tartalék tápanyagok lebontása során keletkező többlet elektronoktól a sejt a hidrogenázok által termelt hidrogén útján szabaduljon meg. Az indirekt fotolízis egyik leginkább ismert példája a kénmegvonáson alapuló hidrogéntermelés. A kénmegvonás során a zöldalga sejtek először tápanyagot halmoznak fel, majd a kénhiány hatására fehérje tartalékaik lebontásába kezdenek a túlélésük érdekében. Ez a II. fotokémiai rendszer (PSII) aktivitásának a csökkenésével jár, amely idővel ellehetetleníti a további oxigéntermelést. A csökkent oxigéntermelés és a fennmaradt sejtlégzés fordított aránya lehetővé teszi a zárt kultúra oxigénszintjének lecsökkenését, ezáltal elősegítve a hidrogenázok aktiválódását. A módszer hátránya, hogy először fel kell növeszteni az alga sejt kultúrát, majd a hidrogéntermeléshez ki kell cserélni a tápoldatot kénmentes tápoldatra. Ez a jövőbeli ipari alkalmazást tekintve komoly hátrányt jelent, mivel ez sok időt, többlet alapanyagot és energiát igényel. A hidrogéntermelő folyamat önmagában 5 nap után leáll, a meghosszabbított, de alacsonyabb hatásfokú termelés csak a kén kis mennyiségű újraadagolásával lehetséges. Ugyanakkor szintén jelentős időt vesz igénybe, amíg az oldat anaerobbá válik és megindul a hidrogéntermelés. Emellett a tápanyag-stressz hatására a sejtek fokozatosan elpusztulnak és az élő sejtszám fokozatosan lecsökken.

Célkitűzések

Számos energiaforrás és energiahordozó között jelentős potenciállal bír a hidrogén, mint energiahordozó. Ennek egy speciális szegmensét képezi a biológiai úton előállítható biohidrogén, amely előállítási technológiájára jelenleg több, kutatás alatt álló módszer létezik. Jelen dolgozat az alga-baktérium kevert kultúrák hidrogéntermelésének tulajdonságaira és a mikrobiális partnerek kapcsolatára fókuszál.

Specifikus célok:

1. A Mosonmagyaróvári Alga Kultúra Gyűjteményből a 4 leghatékonyabb biomassza termelésre képes hidrogéntermelő *Chlamydomonas* törzs közül a hidrogéntermelésre legalkalmasabb kiválasztása.
2. A *Chlamydomonas* sp. 549-es törzs bakteriális partnereinek azonosítása, és a hidrogéntermelést, valamint az alga biomassza hozamot leginkább elősegítő bakteriális partnerek meghatározása.
3. A *Chlamydomonas* sp. 549 kultúrához hozzáadott természetes és mesterséges bakteriális partnerek hatásának vizsgálata a hidrogéntermelésre, az oxigénszint változásra, az algakultúra sejtszám változásaira és a tápoldat összetételbeli változásaira.
4. A kevert és tiszta algakultúrák hidrogéntermelésének tanulmányozása sötétben, valamint fényen kénmegvonás mellett, a különböző hidrogéntermelési módszerek kombinációban történő alkalmazása.
5. A *Chlamydomonas* sp. 549 fotoszintetikus rendszerének vizsgálata fluoreszcencia mérésekkel, a modell alga hidrogéntermelési útvonalainak azonosítása.

Módszerek

Az alga-baktérium konzorciumokat számos módszerrel vizsgáltuk. A légtér hidrogén és oxigén szintjeinek változásait gázkromatográfiával követtük, míg a tápoldatban oldott oxigén monitorozásához oxigén elektródot használtunk. Lemezelésen alapuló élő sejtszám vizsgálatokat, Bürker-kamrát és spektrofotométert alkalmazva követtük az alga-baktérium konzorciumok sejtszám változásait. A tápoldatok minőség és mennyiségbeli változásainak vizsgálatához pH mérőt és HPLC-t alkalmaztunk. A fotoszintetikus rendszer működését DCMU alkalmazásával manipuláltuk és klorofill fluoreszcencia mérésekkel követtük nyomon. A kísérletekhez használt természetes bakteriális partnereket rifampicinnel kiegészített minimál TP tápon többszörös átoltás után a legjobb biomassza hozammal rendelkező *Chlamydomonas* sp. 549 alga partnertől elválasztottuk, majd LB lemezen izoláltuk őket, hogy végül 16S rDNS szekvenciáik amplifikálásán alapuló polimeráz láncreakció (PCR) felhasználásával határozzuk meg identitásukat.

Eredmények

1. Teszteltük a három azonosított természetes bakteriális partner (*Rhodococcus* sp., *Brevundimonas* sp., *Leifsonia* sp.) hatását a *Chlamydomonas* sp. 549 sejtszám növekedésére és hidrogéntermelésére. A legkiválóbb eredményeket a *Rhodococcus* sp. - *Chlamydomonas* sp. 549 párosítás adta. Ezután vizsgálatainkat kibővítettük a mesterségesen a *Chlamydomonas* sp. 549 alga partnerhez adott *Escherichia coli* és *Ralstonia eutropha* vad típusú és hidrogenáz deficiens törzsekkel is. Az eredmények alapján kizártuk annak lehetőségét, hogy a bakteriális partnerek részt vesznek a hidrogéntermelésben, annak ellenére, hogy a vad típusú baktérium törzsek rendelkeznek saját hidrogenázokkal. A legmagasabb hidrogén hozamot a hidrogenáz deficiens *E. coli* $\Delta hypF$ mesterségesen hozzáadott bakteriális partner használatával értük el ($1196.06 \pm 4.42 \mu\text{L L}^{-1}$).
2. A *Chlamydomonas* sp. 549 – *E. coli* $\Delta hypF$ kevert kultúra hidrogéntermelését összehasonlítottuk a kontrollként vizsgált *Ch. reinhardtii* cc124 - *E. coli* $\Delta hypF$ kevert kultúráéval. A mérések során jelentős különbségeket figyeltünk meg nem csak a megtermelt hidrogénmennyiségek (*Ch. reinhardtii* cc124 - *E. coli* $\Delta hypF$: $5800.54 \pm 65.73 \mu\text{L L}^{-1}$ vs. *Chlamydomonas* sp. 549 – *E. coli* $\Delta hypF$: $1196.06 \pm 4.42 \mu\text{L L}^{-1}$), de a termelés dinamikájának szempontjából is. A *Chlamydomonas* sp. 549 – *E. coli* $\Delta hypF$ és a *Ch. reinhardtii* cc124 - *E. coli* $\Delta hypF$ kevert kultúrákban a hidrogéntermelés egyaránt megközelítőleg egy napig tartott, majd a légtérben felhalmozott hidrogén mennyisége csökkenésnek indult. Viszont a *Ch. reinhardtii* cc124 - *E. coli* $\Delta hypF$ esetében a negyedik nap után a hidrogéntermelés ismét elindult. Az oxigén szintje a bakteriális partner használata mellett jellemzően 4 órán belül lecsökkent arra a szintre (légtérben 3 %, folyadékban 1 – 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ahol a hidrogenázokat már nem gátolta. Az ecetsavfogyással összhangban, miután a kevert kultúrában a *Chlamydomonas* sp. 549 felhasználta az összes ecetsavat, az oxigénszint a második nap után intenzív emelkedésnek indult mind a folyadék fázisban (1 – 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ -ről 1300 - 1600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ -re), mind pedig a légtérben (3 %-ról 60 %-ra). A pH szint az ecetsav fogyasztásával párhuzamosan növekedésnek indult és a kezdeti pH 7.3-ról pH 8.7-re emelkedett.

3. A *Chlamydomonas* sp. 549 sejtszáma fényen a tiszta és kevert kultúrákban egyaránt 4 napig emelkedett, de a kevert *Chlamydomonas* sp. 549 – *E. coli* $\Delta hypF$ sejtszám növekedése gyorsabb volt a tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 kultúráénál. A bakteriális sejtszámot a *Rhodococcus* sp.-t használva vizsgáltuk, melynek során arra a következtetésre jutottunk, hogy megvilágítás mellett a bakteriális sejtszámot pozitívan befolyásolta az alga partner jelenléte egészen addig, amíg a légtér nem telítődött hidrogénnel. A megvilágítás mellett egy napig magas szinten stagnáló bakteriális sejtszám az alga partner egy napig tartó hidrogéntermelésével mutatott összefüggést. A hidrogéntermelés leállításával és a hidrogénfogyással párhuzamosan a *Rhodococcus* sp. sejtszáma is drasztikus csökkenésnek indult.

4. Az alga-baktérium konzorcium hidrogéntermelő módszerét a kénmegvonás és a sötét fermentáció módszerével kombinálva is vizsgáltuk. A sötét fermentáció során a tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 és a kevert *Chlamydomonas* sp. 549 – *E. coli* $\Delta hypF$ kultúrák között az összes megtermelt hidrogén tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget ($6114 \pm 369 \mu\text{L L}^{-1}$ vs. $5621 \pm 645 \mu\text{L L}^{-1}$). A kénmegvonás során összehasonlítottuk a tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 és *Ch. reinhardtii* cc124 kultúrák és a kevert *Chlamydomonas* sp. 549 – *E. coli* $\Delta hypF$ és *Ch. reinhardtii* cc124 - *E. coli* $\Delta hypF$ kultúrák összes megtermelt hidrogén mennyiségét és a termelésük dinamikáját. Jelentős különbséget figyeltünk meg a tiszta és kevert kultúrák által termelt hidrogénmennyiségek között. Az *E. coli* $\Delta hypF$ bakteriális partnert tartalmazó kultúrák jellemzően több hidrogént termeltek, mint a kizárólag alga partnert tartalmazó kultúrák (*Chlamydomonas* sp. 549: $193.5 \pm 66.81 \mu\text{L L}^{-1}$ vs. *Chlamydomonas* sp. 549 - *E. coli* $\Delta hypF$: $2637.49 \pm 555.42 \mu\text{L L}^{-1}$ és *Ch. reinhardtii* cc124: $25028.1 \pm 3943.47 \mu\text{L L}^{-1}$ vs. *Ch. reinhardtii* cc124 - *E. coli* $\Delta hypF$: $47241.3 \pm 4660.69 \mu\text{L L}^{-1}$). A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az alga hidrogéntermelésében történt pozitív változás a bakteriális partner jelenlétének tulajdonítható. Az összes megtermelt hidrogén mennyiségében, a légtér oxigénszint változásában és a hidrogéntermelés dinamikájában is jelentős különbséget fedeztünk fel a *Chlamydomonas* sp. 549 és a *Ch. reinhardtii* cc124 tiszta és kevert kultúrái között. A klorofill fluoreszcenciás mérések és az ecetsav koncentráció változásainak adatai alapján úgy gondoljuk, hogy ezt a különbséget a két algatörzs eltérő ecetsav felhasználása és a II. fotokémiai rendszerek aktivitásának eltérő csökkenése határozta meg. A *Chlamydomonas* sp. 549 esetében a II. fotokémiai rendszer aktivitása a

negyedik nap után kezdett el csökkenni, míg a *Ch. reinhardtii* cc124 esetében ez már az első nap folyamán elkezdődött. Az ecetsav koncentráció a *Chlamydomonas* sp. 549 esetében két nap alatt megközelítőleg 0-ra csökkent, míg a *Ch. reinhardtii* cc124 esetében az ecetsav teljes felhasználása 4 - 5 napot vett igénybe.

Eredmények megtárgyalása

Az előbb bemutatott eredmények jól mutatják, hogy a hidrogéntermelés szempontjából mennyire meghatározó a megfelelő alga és baktérium partnerek kiválasztása. Az általunk vizsgált módszer kiváló lehetőséget ad a különböző bakteriális és hidrogenáz enzimmel rendelkező alga partnerek kombinálására a nagyobb hatékonyságú hidrogéntermelés eléréséhez. Figyelemre méltó előnye a rendszernek, hogy jelentősebb anyagi ráfordítást nem igénylő módon, külső beavatkozás nélkül, a zárt rendszer önmagát alakítja anaerobbá. A hidrogéntermelés során a biomassza mennyisége folyamatosan növekszik, amely egyre intenzívebbé teszi a hidrogéntermelést. Az alga kultúra jó hatékonysággal képes felhasználni az oldott szénforrást és képes a bakteriális sejt kultúra fenntartására alacsony erősségű megvilágítás mellett. Kedvező tulajdonságai alapján a módszer alkalmazható lehet szennyvizek kezeléséhez és ezzel párhuzamosan alga biomassza- és biohidrogéntermeléshez.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Maróti Gergelynek a lehetőséget, hogy kutatócsoportjában elsajátíthattam a biotechnológiai és molekuláris biológiai technikákat és ismereteket. Hálás vagyok az irántam tanúsított bizalmáért és tanácsaiért, melyekkel önálló kutatómunkára ösztönzött. Köszönöm az áldozatos munkáját, mindenre kiterjedő nélkülözhetetlen segítségét és türelmét.

- Köszönöm Prof. Dr. Kondorosi Évának, hogy lehetővé tette számomra a kutatótevékenységében való részvételt és észrevételeivel segítette munkámat.
- Hálásan köszönöm Dr Rákhely Gábornak, hogy lehetővé tette számomra a laboratóriumi munkát és észrevételeivel segítette munkámat.
- Hálásan köszönöm Dr. Vass Imrének, hogy együttműködésével segítette laboratóriumi munkámat.
- Köszönet illeti Dr. Deák Zsuzsát a fluoreszcencia mérésekben nyújtott segítségéért.
- Köszönöm munkatársaimnak hogy mindig barátsággal fordultak hozzám.
- Köszönöm a segítségét a volt BayGen intézet valamennyi dolgozójának.
- Végtelen hálával tartozom családomnak az odaadó támogatásukért és végtelen türelmükért.

A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó közlemények

Lakatos, G., Deák, Zs., Vass, I., Rétfalvi, T., Rozgonyi, Sz., Rákhely, G., & Maróti, G. (2014). Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas* algae. *Green Chemistry*, 16(11), 4716-4727.

Impakt faktor: 6.83

Wirth, R., Lakatos, G., Maróti, G., Bagi, Z., Minárovics, J., Nagy, K., Kondorosi, É., Rákhely, G., Kovács, K. L. (2015) Exploitation of algal-bacterial associations in a two-stage biohydrogen and biogas generation process. *Biotechnology for Biofuels* (megjelenés alatt)

Impakt faktor: 6.22

További közlemények

Cikk:

Virágh, M., Vörös, D., Kele, Z., Kovács, L., Fizil, Á., Lakatos, G., & Galgóczy, L. (2014). Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections. *Protein expression and purification*, 94, 79-84.

Impakt faktor: 1.43

Poszter:

Lakatos, G., Keresztúri, K., Horváth, B., Maróti, G., (2012) Investigation of the symbiotic interaction between *Chlamydomonas intermedia* and *Brevundimonas* sp. consortium.

In: 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (2012): p. 126

Konferencia helye, ideje: Porto, Portugália 2012.08.05-10.

Wirth, R., Böjti, T., Maróti, G., Lakatos, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K. L., Alga biomass as biogas substrate: Laboratory fermentations and metagenomic studies.

In: Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése. p. 81-82

Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország 2014.10.15-17.

Előadás:

Wirth, R., Böjti, T., Maróti, G., Lakatos, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K. L., Alga biomass as biogas substrate: Laboratory fermentations and metagenomic studies. *BiogasScience* (2014).

In: International Conference on Anaerobic Digestion. p. 105

Konferencia helye, ideje: Bécs, Ausztria 2014.10.26-30.

Lakatos, G., Deák, Zs., Vass, I., Rétfalvi, T., Rozgonyi, Sz., Rákhely, G., & Maróti, G. (2014). Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas* algae.

In: Tavaszi Szél 2014

Konferencia helye, ideje: Debrecen, Magyarország 2014.03.21-23.

Lakatos, G., Deák, Zs., Vass, I., Rétfalvi, T., Rozgonyi, Sz., Rákhely, G., & Maróti, G. (2014). Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas* algae.

In: Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2014): p. 29.

Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország 2014.03.07.

Magyar nyelvű közlemények

Lakatos, G., Deák, Zs., Vass, I., Rétfalvi, T., Rozgonyi, Sz., Rákhely, G., Maróti, G. (2014). Bakteriális szimbionták által elősegített foto-fermentatív hidrogéntermelés *Chlamydomonas* alga törzsben. Tavaszi Szél 2014 Konferenciakötet Biológiai tudományi szekció, 43-57