



A Magyar Mikrobiológiai Társaság
2012. évi Nagygyűlése
Október 23-26



EGY BIOGÁZ KÉPZŐ KÖZÖSSÉG ARCHAEA POPULÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

Ács Norbert
SZTE TTIK

Biotechnológiai Tanszék

Biogáz: a zöld energia

- Megújuló
- Energiatermelés kombinálása a (veszélyes) hulladék kezelésével
- Természetes környezet



Miért van szükségünk a megújuló energiaforrásokra?

- EU direktíva (20% 2020-ig)
- A fosszilis energiahordozók kimerülése
- Üvegház hatású gázok kibocsátása



Mikrobiológiai háttér

HIDROLIZÁLÓ MIKROORGANIZMUSOK

Polimerek degradálása:
poliszacharidok (cellulóz, keményítő), fehérjék, lipidek

Monomerek, oligomerek emésztése:
Cukrok, aminosavak, zsírsavak



ACETOGEN MIKROORGANIZMUSOK

Illékony zsírsavak+ H_2



METANOGENÉK
 $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$



Felhasználható biomassza

- Növényi alapanyag (pl. kukorica siló)
- Állati trágya
- Szennyvíziszap
- Hulladékok



- » Konyhai hulladék
- » Melléktermékek (alkoholgyártás)
- » Vágóhídi hulladék



Biogáz felhasználhatósága

- Gázmotorokban (CHP) történő elégetés
- Tisztítás (CO_2 eltávolítás). A tiszta biometán, a földgázzal azonos tulajdonságokkal bír



Proteinben gazdag biotassza degradálása

- Toxikusnak vélt alapanyag
- Nagy mennyiségben szabadul fel ammónia a lebontásuk közben (határérték 5g/l)



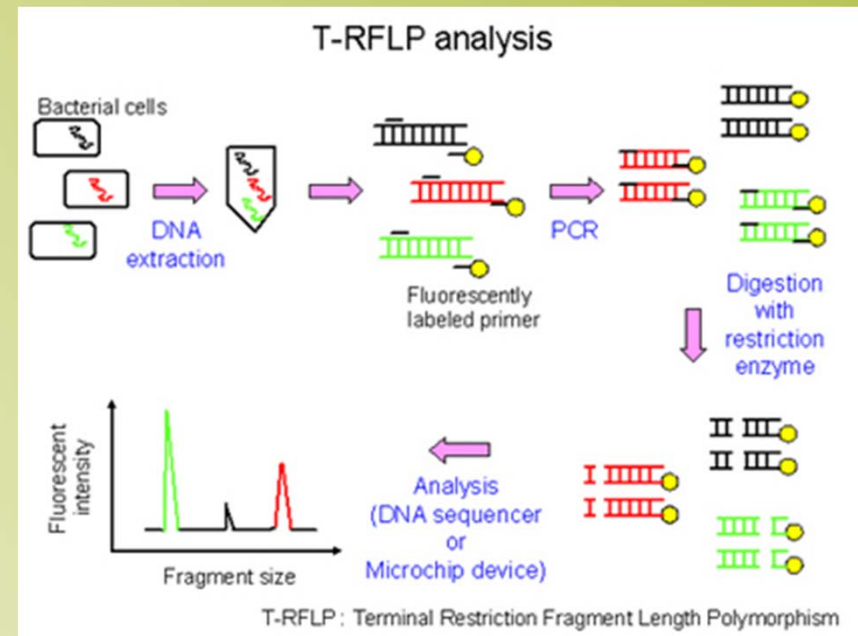
A közösségi mikrobák azonosítása

- Molekuláris biológiai módszerek szükségesek
- Ujjlenyomat módszereket (DGGE, SSCP, ARDRA, RISA, T-RFLP) fejlesztettek ki



T-RFLP módszer

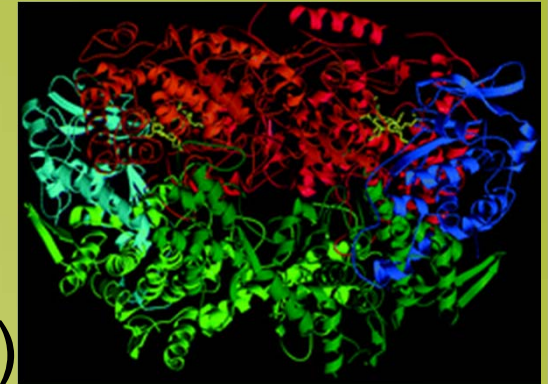
- Terminal - Restriction Eragment Length Polymorphism
- Továbbfejlesztett RFLP metódus
 - » Fluoreszcens primer(ek)
 - » Kapilláris gélelektroforézis(CE)
 - » Hasítási mintázat
 - » Klónkönyvtár
 - » Gyors screenelés
 - » Szekvenálás
 - » Azonosítás



Az adaptálás

- Unkonvencionális biomasszával történő fermentálás
- Az adaptációt periodikusan növekvő mennyiségű szubsztrát bevitelével értük el
 - Az adaptáció alatt nyomon követtük a metanogén populációban bekövetkező változásokat

A cél gének

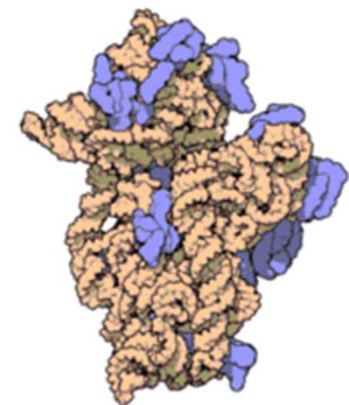


methyl-coenzyme-M-reductase (mcrA)

- Csak metanogénekben található
- A módszert Luton és mts. írták le 2002-ben.
- Alkalmas a metanogén populációk filogenetikai analízisére

16s *rRNS* gén

- Archaea specifikus univerzális primereket alkalmazva
- Bevett módszer a különféle mikrobák azonosítására
- Széles körű szekvencia adatbázis (NCBI, RBP)



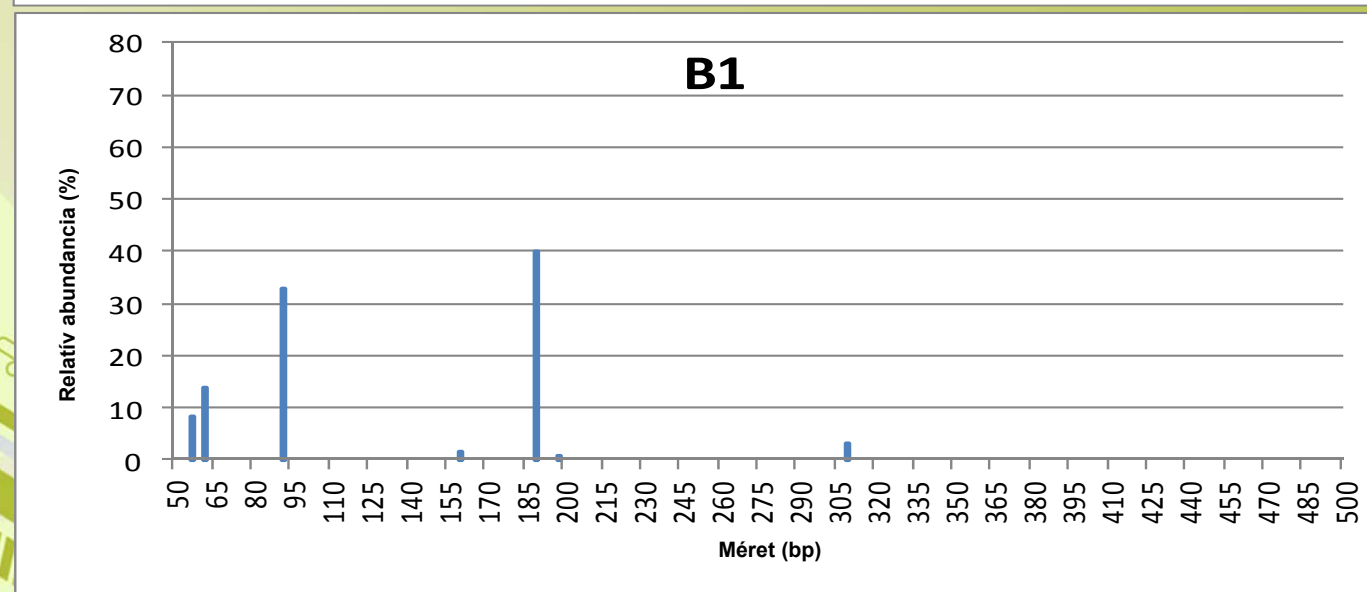
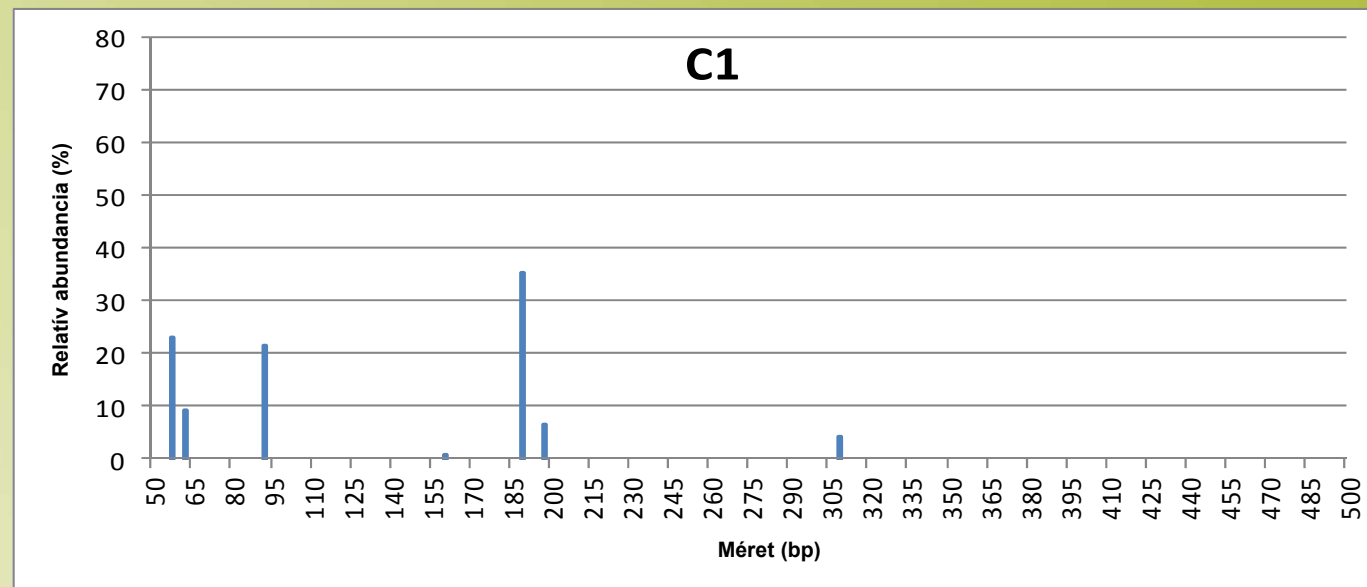
Vizsgált minták

- Kazeinrel táplált fermentor
 - o 1 héttel az adaptáció kezdete után (C1)
 - o 5 héttel az adaptáció kezdete után (C5)
- Vérrel táplált fermentor
 - o 1 héttel az adaptáció kezdete után (B1)
 - o 5 héttel az adaptáció kezdete után (B5)

Kísérleti összeállítás

- DNS izolálás
- A kevert *mcrA* gén fragmentum, valamint 16s *rDNS* fragmentum amplifikálása (~500 bp)
- Restrikciós hasítás (*RsaI*)
- Restrikciós mintázat futtatása (CE)
 - Klónkönyvtár készítés
 - Screenelés
 - Domináns csúcsokhoz tartozó klónok szekvenálása, azonosítása

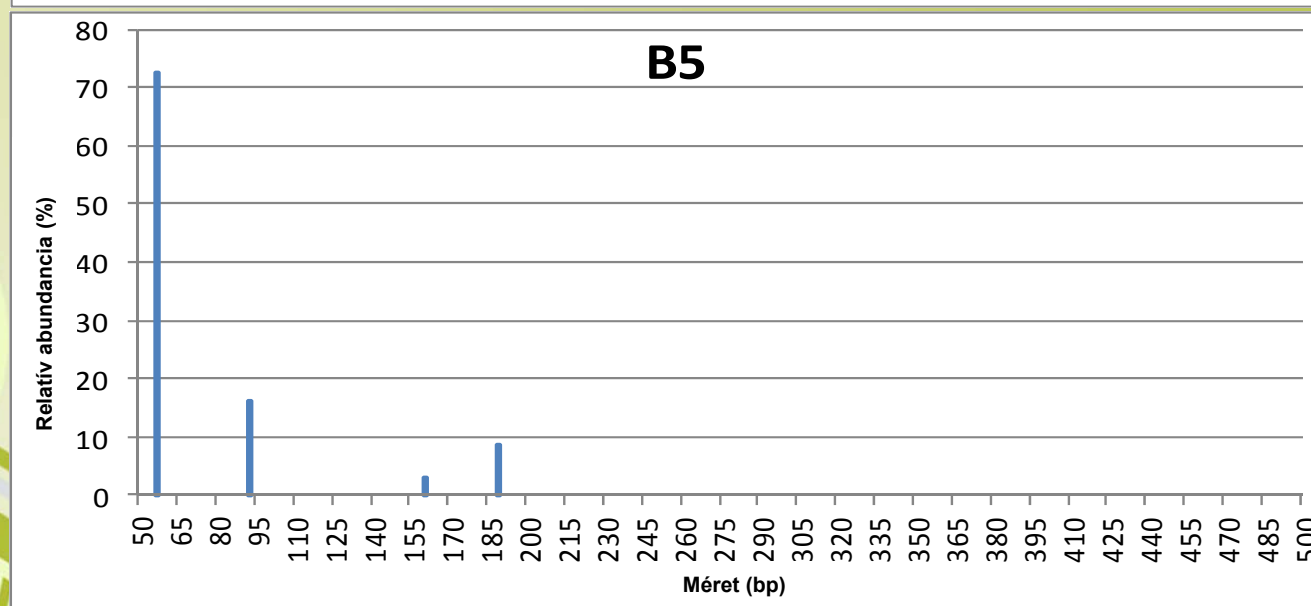
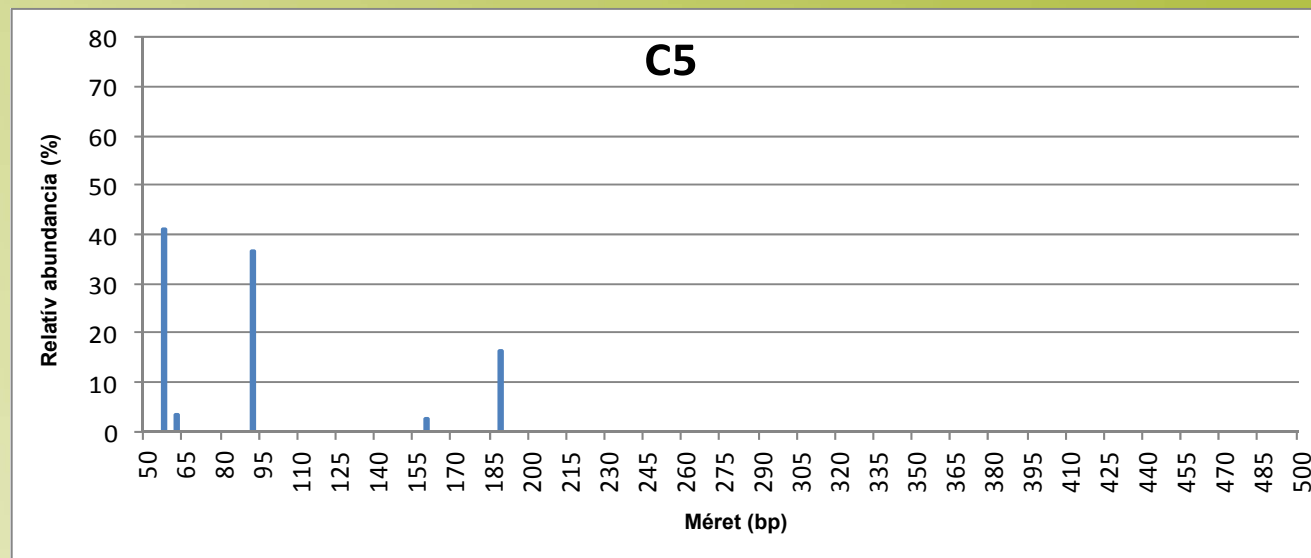
C1 és B1 minták restriktációs hasítást követő csúcssorozatai (*mcrA*)



A kiválasztott klónok szekvenálási eredményei

OTU	Closest Species	Similarity (%)	No. of clones	Abundance C1;B1 (%)	Abundance C5;B5 (%)
OTU-1 (57bp)	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	88	14	23; 8	41; 73
OTU-2 (62bp)	<i>Methanosarcina mazei</i>	94	2	10; 14	3.5; 0
	<i>UAC rlm_R_380Bc</i>	100	5		
OTU-3 (92bp)	<i>Methanocorpusculum parvum</i>	98	3	21; 33	37; 16
	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	84	4		
	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	98	2		
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	86	7		
OTU-5 (189bp)	<i>UAC MCR-HID-UND-38</i>	100	5	35; 40	16; 8.5
	<i>UAC barb-M-21</i>	100	2		
	<i>UAC VAL25</i>	100	6		
OTU-6 (198bp)	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	94	2	6.5; 0.5	0
OTU-7 (309bp)	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	88	3	4; 3	0

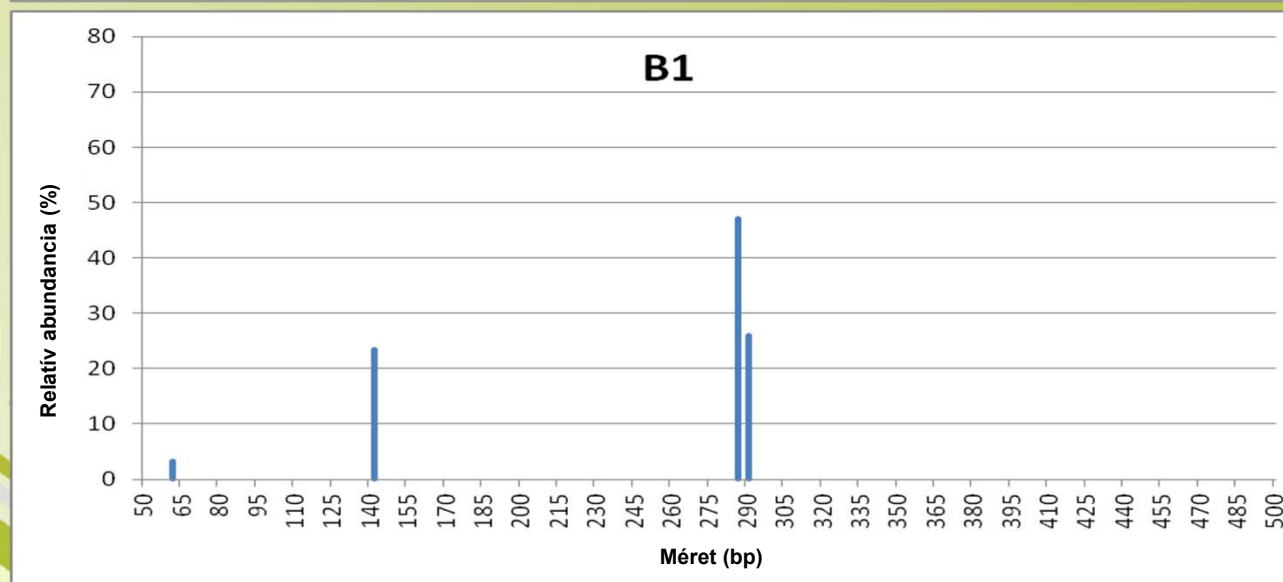
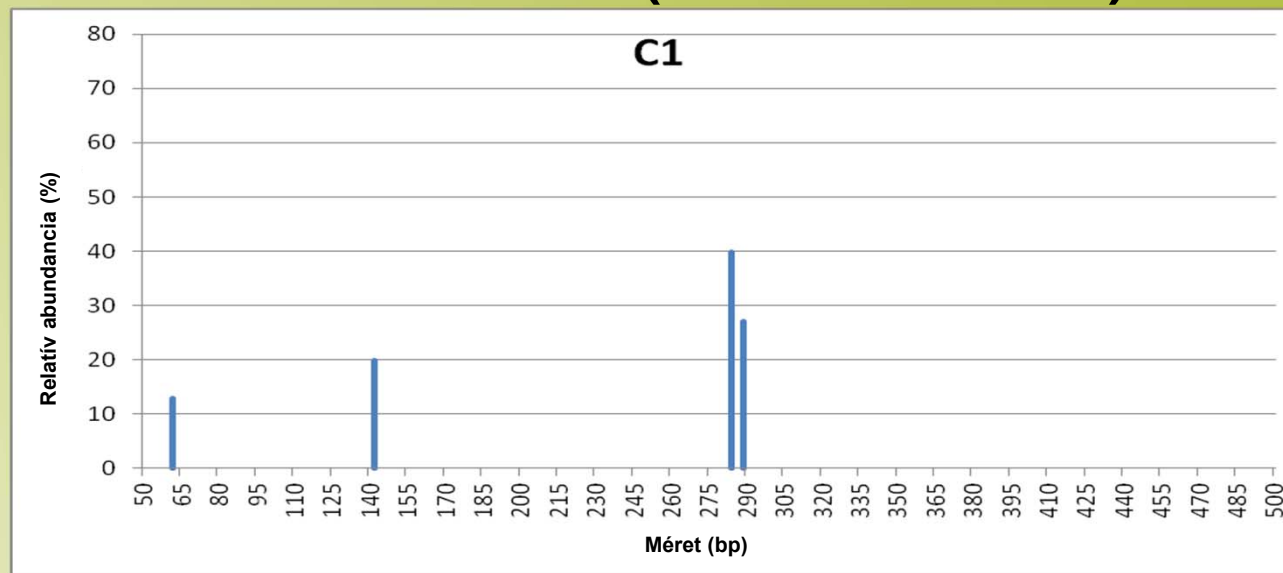
C5 és B5 minták restriktációs hasítást követő csúcssorozatai (*mcrA*)



A kiválasztott klónok szekvenálási eredményei

OTU	Closest Species	Similarity (%)	No. of clones	Abundance C1;B1 (%)	Abundance C5;B5 (%)
OTU-1 (57bp)	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	88	14	23; 8	41; 73
OTU-2 (62bp)	<i>Methanosarcina mazei</i>	94	2	10; 14	3.5; 0
	<i>UAC rlm_R_380Bc</i>	100	5		
OTU-3 (92bp)	<i>Methanocorpusculum parvum</i>	98	3	21; 33	37; 16
	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	84	4		
	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	98	2		
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	86	7		
OTU-5 (189bp)	<i>UAC MCR-HID-UND-38</i>	100	5	35; 40	16; 8.5
	<i>UAC barb-M-21</i>	100	2		
	<i>UAC VAL25</i>	100	6		
OTU-6 (198bp)	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	94	2	6.5; 0.5	0
OTU-7 (309bp)	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	88	3	4; 3	0

C1 és B1 minták restriktációs hasítást követő csúcssorozatai (*16s rRNS*)



A kiválasztott klónok szekvenálási eredményei

OTU (bp)	<i>In silico</i> T-RF (bp)	Closest species	Similarity (%)	No. of clones	Abundance C1; B1
OTU-1 (62, 142)	62	<i>Methanobacterium formicicum</i>	97	2	13; 3.5
		<i>Methanobacterium formicicum</i>	95	1	20; 23.5
OTU-2 (284)	287	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	99	11	40; 47
		<i>Methanogenium marinum</i>	98	1	
OTU-3 (289)	289	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	97	4	27; 26
		<i>Thermogymnomonas</i> sp.	81-98	8	
	290	<i>Thermogymnomonas</i> sp.	87-98	11	
	291	<i>Methanobrevibacter</i> sp.	95	2	
		<i>Thermogymnomonas</i> sp.	85-95	3	

Összefoglalás

- Létre hoztunk egy adaptált mikrobaközösséget, kizárólag oly módon, hogy növekvő mennyiségben adtuk a fermentorokhoz a proteinben gazdag tápanyagot.
 - A megváltozott szubsztrát nemcsak a hidrolizáló, valamint az acetogén baktériumokra volt hatással, hanem kihatott a metanogén populációra is.

Összefoglalás 2

- A kísérleteink alátámasztják a korábbi tapasztalatunknak, mely szerint a metanogén populációt egy hidrogenotróf törzs, a *Methanoculleus sp.* dominálja
 - A hidrogén nagyon fontos regulátor a biogáz képződésében



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



MAGYARORSZÁG MEGÚJUL



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



SZÉCHENYI TERV

Investing in your future
New Hungary Development Plan



Hungary-Romania
Cross-Border Co-operation
Programme 2007-2013



Hungary-Serbia

IPA Cross-border Co-operation Programme

Az itt bemutatott munka az Európai Unió támogatásával, illetve az Európai Szociális alap társfinanszírozásával valósult meg.

Projekt számok:

HUSRB/1002/214/041 IPA, HURO/1001/193/2.2.2. CBC and IEE/10/235 SI2.591589 GreenGasGrids. Hazai források: TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005, Baross_ALGOLABH, OMFB-00356/2010 and TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012

Köszönöm a megtisztelő
figyelmet!

