

37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

Huszár Márta

Szeged

2024

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Tudományos diákköri dolgozat

**A lignocellulóz hasznosítás fokozása a bendőben és a biogáz fermentorban
lévő anaerob gombák, metanogének és baktériumok közötti szintrófikus
kölcshatások révén**

Huszár Márta
Biológus MSc szakos hallgató

Témavezető:
Petróné Dr. Kovács Etelka

Szeged
2024

Tartalom

Bevezetés.....	4
1. Irodalmi áttekintés.....	5
1.1. A lignocellulóz hasznosítása	5
1.2. Lignocellulóz szerkezete és lebontása.....	6
1.3. Anaerob mikrobák a bendőben.....	8
1.4. Anaerob gombák, metanogének és baktériumok közötti kölcsönhatások.....	10
1.4.1. Anaerob gombák és metanogének szintrófikus kapcsolata.....	10
1.4.2. Anaerob gombák és baktériumok szintrófikus kapcsolata.....	12
1.5. Felhasználási területek	14
2. Célkitűzés.....	14
3. Anyagok és módszerek.....	15
3.1. Mintavétel.....	15
3.2. Tápoldat összetétele	15
3.3. Felhasznált szubsztrát.....	16
3.4. Anaerob gombák, metanogének és baktériumok tenyésztése	16
3.5. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)	17
3.6. DNS izolálás és új generációs szekvenálás	17
3.7. Gáz kromatográfia.....	18
3.8. Szerves sav meghatározása HPLC-vel	18
4. Eredmények kiértékelése.....	19
4.1. A gázhozamok mennyiségi és minőségi jellemzése.....	19
4.2. Szerves sav meghatározása HPLC-vel	20
4.3. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)	22
4.4. A metagenom szekvenálás eredményei.....	26
5. Összefoglalás.....	30
Felhasznált irodalom	31
Tételes szerzői hozzájárulás	39
Köszönetnyilvánítás	40

BEVEZETÉS

A lignocellulóz a legbősegebb szerves, megújuló szénforrás a Földön, ennél fogva az ilyen biomassa egyre nagyobb jelentőséggel bír, mint folyamatosan megújuló, költséghatékony, széles körben elérhető, a *Homo sapiens* számára nem ehető szerves szénforrás a fenntartható, körkörös gazdaságban. A biomassa anaerob lebontása egy széles körben használt, kiforrott technológia a kiváló megújuló energiahordozó metán előállítására. Az anaerob mikrobiális közösségek hasonló metabolikus úton alakítják át a lignocellulóz alapú takarmányt a kérődzők tej- és hústermeléséhez szükséges építőegységekké. A kérődzők bendőjében „őshonos” eukarióta anaerob gombákról (anaerobic gut fungi = AGF) és a közösségben betöltött szerepéről, azonban manapság még nem sokat tudunk [1].

A dolgozatban bemutatott munka **végső célja** egy olyan mikrobaközösség létrehozása, amely minimális, de még elegendő számú „csapat tagokkal” hatékonyan képes elvégezni a különböző, lignocellulóz tartalmú szubsztrátok lebontását. Az alkalmazott, újszerű és innovatív stratégia **alapvető munkahipotézise** az, hogy a szintrófikus kapcsolataik révén a legszorosabban együttműködő és összekapcsolódó partnerek stabil közösségként fennmaradhatnak mesterséges környezetben is. **Kísérleteimet** a bendő szilárd rosttartalmának vizsgálatával kezdtem. A szilárd fázisból származó konzorcium AGF, metanogén archaea (MA) és baktérium (BAC) tagjait anaerob tápoldatban tenyésztettem szénforrásként szalmát alkalmazva, amelyet néhány nap alatt kolonizáltak a bendő mikrobiális közösségének cellulolitikus tagjai, és tevékenységük mérhető eredményeként megindult a CH₄ termelés. A lebontási folyamat a keletkező szerves savak mennyiségének mérésével is nyomon követhető volt. A vizsgálat során 4 időpontban (0 óra, 24 óra, 48 óra, 72 óra) vettünk mintát pásztázó elektronmikroszkópiához (SEM), nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiához (HPLC) és a mikroba közösség metagenom alapú elemzéséhez. A SEM képek vizuálisan mutatták be a mikrobiális proliferációt és az AGF, MA és BAC közötti szoros sejt-sejt kölcsönhatást. A szekvenálási eredmények pedig információt adtak a mikrobiom összetételében bekövetkezett változásokról. A HPLC mérések a lebontási termékek összetételét mutatták meg.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A lignocellulóz hasznosítása

Napjainkban az emberiség egyre több energiát fogyaszt, a Föld fosszilis energia-tartaléka pedig rohamosan csökken [2]. A globális energiahiány és fokozott környezetszennyezés végett, minél inkább hangsúlyosabb szerepet kapnak a megújuló, természetbarát energiaforrások [1], [2]. Az egyik legjelentősebb energiaforrás a növényi biomassa. A cellulóz egy rendkívül gyakori molekula, a Földön a legnagyobb mennyiségben előforduló szénvegyület és egyben szerves szubsztrát is. A növényi biomassa körülbelül 65%-a lignocellulóz alapú, s ezen különböző típusú biomassa-alapanyagok pl. erdészetből, mezőgazdaságból és iparból származó növényi hulladék hatékony átalakítása energiává és hasznos termékeké létfontosságú a fosszilis tüzelőanyagoktól való függés és az üvegházhatást okozó gázok kibocsátásának mérséklésében, amelyek hozzájárulnak az éghajlatváltozáshoz [2-4]. Globálisan a növénytermesztés kevesebb mint kétharmadát (tömeges alapon) fordítják emberi élelmiszerre, szemben az állati takarmány 35%-ával és a bioenergia vagy más ipari termékek 3%-ával [5,6]. Egyes becslések szerint a világon több milliárd haszonállat él, köztük 2,5 milliárd szarvasmarha, valamint 2,5 milliárd juh és kecske [7,8]. Emellett 2050-re várhatóan az állatállomány takarmányozására szánt szántóföldi növények mennyisége meghaladhatja az emberek által fogyasztott növények mennyiségét, így az állati takarmány iránt növekvő igény új lehetőséget teremthet a lignocellulóz alapú takarmány- és bioenergiaforrások fejlesztésére [7,9].

A nehezen lebontható biomassa előkezelésére számos módszer áll rendelkezésre, amelyek között megtalálható fizikai, kémiai, fizikai-kémiai és biológiai (enzimatis) módszer is [3,10]. A módszerek hatásfokában és költséghatékonyágában azonban nagy különbségek figyelhetők meg. A fizikai-kémiai előkezelés nagy hatásfokának köszönhetően a legmegfelelőbb technológia ipari méretű alkalmazásra, azonban számos kutatás megállapította, hogy ezek a módszerek magasabb energiaköltséggel járnak a biológiai kezeléshez képest [3,11-13]. A biológia kezelés történhet közvetlenül a mikroorganizmusok hozzáadásával (tisztá mikroorganizmus kultúrák vagy mikrobális konzorciumok), vagy exogén enzimek alkalmazásával [11,12,14].

A kérődzők bendője a természet egyik legfejlettebb és leghatékonyabb növényi biomassa lebontó ökoszisztémáját tartalmazza [15,16]. Korábbi tanulmányok arról is

beszámoltak, hogy a bendőben nagyszámú szimbiotikus mikrobiális közösség (baktériumok, metanogén archeák, anaerob gombák, protozoák) képes hatékonyan lebontani a komplex lignocellulóz biomasszát és tápanyagot biztosítanak gazdaszervezet számára a növekedéshez [15-18]. A baktériumok, az anaerob gombák és a protozák megtelepednek és lebontják a gazda által emészthetetlen lignocellulózt, és a folyamat során hidrogént szabadítanak fel, amelyet a bendőben lévő metanogének hasznosítanak [19-22].

1.2. Lignocellulóz szerkezete és lebontása

A lignocellulóz szerkezetének ismerte segít megérteni, hogy milyen enzimek kellenek a lignocellulóz tartalmú növényi biomassza lebontásához, így könnyebb azonosítani azokat a mikrobákat, amelyek hatékonyan képesek használni ezt a szubsztrátot. A növényi biomassza változó mennyiségű cellulózt, hemicellulózt és lignint tartalmaz [23,24]. Ezek mellett tartalmazhat még kis mennyiségben pektint, nitrogénvegyületeket és ásványi anyagokat [2,25].

A cellulóz egy glükózpolimer (a növényi sejtfalak 38-50%-a), amely β (1 $\rightarrow$ 4)-kötésű D-glükóz egységek lineáris láncából áll [23,25]. A poliszacharid szerkezete miatt nagy mennyiségű hidroxil-csoportot tartalmaz, melyek jól rendezett hálózatot alkotnak, ami kompakt kristályszerkezetet eredményez [24,26].

Az előzővel ellentétben a hemicellulóz egy heterogén, elágazó poliszacharid, amely szorosan, de nem kovalensen kötődik az egyes cellulóz mikrofibrillumok felületéhez [23]. A hemicellulóz (a növényi sejtfal 20-40%-a), egy szabálytalanabb polimer, mely tartalmazhat különféle hexózokat és pentózszármazékokat (glükózt, mannózt, xilózt és arabinózt) [24,27]. A hemicellulóz oldhatósága nagyobb, mint a cellulózé; szerkezete gyakran elágazó [25,26]. Az előzőekben tárgyaltauktól eltérően a lignin alapvetően nem lineáris, oldhatatlan, aromás polimer, amely véletlenszerűen kapcsolódó fenilpropanoid egységekből áll, melyek p-hidroxifenil (H-típusú), guajacil- (G-típusú) és sziringil- (S-típusú) egységek lehetnek [28,29]. A lignin képes kötődni a cellulózhoz és hemicellulózhoz, így biztosítva egy stabil szerkezetet, mely gátat képez az oldatok és enzimek számára, ezáltal megnehezítve a lebontást [24,30,31].

Az anaerob gombák hatékony biomassza-bontást érnek el azáltal, hogy mechanikusan megtörik a növényi rostokat, miközben befurakodnak az anyagba, ezzel párhuzamosan számos enzimet választanak ki a biomassza lebontására [32,33].

A *Neocallimastigomycota* törzs eddig publikált genomjai között 43 glikozid-hidroláz (GH), 28 glikozil-transzferáz (GT), 9 szénhidrát-észteráz (CE), 5 poliszacharid liáz (PL)

családokba tartozó specifikus enzimeket és 19 szénhidrátkötő modult találtak [34,35]. A transzkriptumok többsége nem katalitikus dockerin doméneket is kódol, amelyek elősegítik egy extracelluláris katalitikus komplex, a celluloszóma önszerveződését, így hozzájárulva a lignocellulóz szinergikus lebontásához [24,33,36].

A *Neocallimastigomycota* gombák hemicellulázokban, különösen GH10 enzimekben, és poliszacharid-deacetilázokban gazdagok, melyek lehetővé teszik számukra, hogy a hemicellulózt monoszacharidokra és oligoszacharidokra bontsák anaerob környezetben [33,37,38].

A cellulóz glükózzá történő depolimerizációjában három kulcsfontosságú celluláz enzim vesz részt: az endoglukanáz (EC 3.2.1.4), az exoglukanáz (EC 3.2.1.176) (EC 3.2.1.91) és a β -glükozidáz (EC 3.2.1.21) [29,30,39]. Ezek a glikozid-hidrolázok (GH) család tagjai, és a cellulóz β -1,4-glikozid kötések hidrolízisét katalizálják [30,39]. Az endoglukanázok (EC 3.2.1.4) a cellulózsálak amorf régióiban bontják a kötések, ezzel oligoszacharidokat szabadítva fel és új láncvégeket létrehozva [30,39]. Ezeket a szabad láncvégeket az exoglukanázok (EC 3.2.1.176; EC 3.2.1.91) bontják tovább, cellobióz diszacharidokat szabadítva fel a redukáló (EC 3.2.1.176) vagy nem redukáló (EC 3.2.1.91) végekből [30,39]. A felszabadult cellobiózt a β -glükozidázok (EC 3.2.1.21) hidrolizálják glükózzá [29,30,39].

A hemicellulózok heterogén szerkezete miatt lebontásukhoz különböző enzimek szükségesek [30,40]. Az anaerob gombák olyan enzimekkel rendelkeznek, mint a xilanáz, xilozidáz, arabinofuranozidáz és -glükuronidáz, amelyek lehetővé teszik számukra a hemicellulóz szerkezetének bontását [29,41].

A cellulóz, illetve hemicellulóz lebontására képes mikrobiális törzsek nemcsak cellulolitikus és xilanolitikus enzimeket termelnek, amelyek e polimerek gerincét célozzák meg, hanem számos kiegészítő enzimet is, amelyek segítenek az oldalláncok eltávolításában és a lignin-hemicellulóz kötések bontásában [42,43].

A lignin szerkezetéből adódóan nehezen bontható le, mivel az aromás gyűrűk hasításához szükséges enzimatis reakciók oxigént igényelnek, így anaerob környezetben a folyamat nehezen megy végbe [30,44]. Az anaerob gombák akár a növényi biomasszához kapcsolódó lignin 34%-nak lebontásáért is felelősek lehetnek, de enzimatis mechanizmusuk pontosan még nem ismert [30,45,46].

1.3. Anaerob mikrobák a bendőben

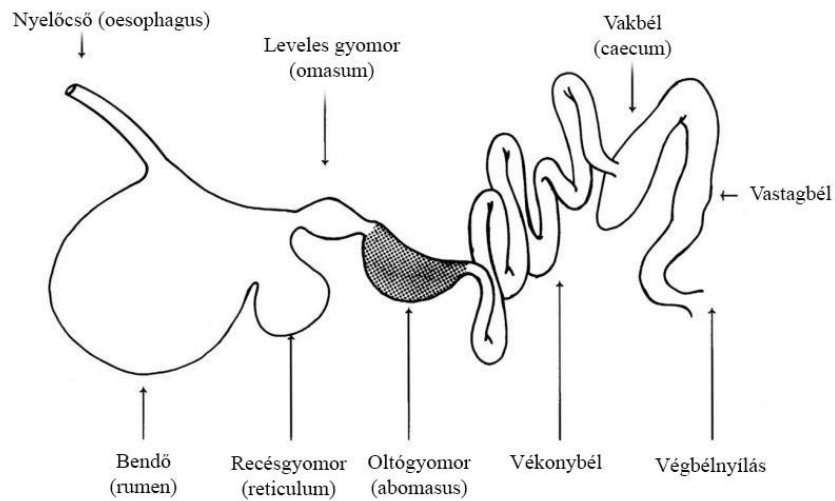
A kérődzők az *Artiodactyla* rendbe tartozó hasított patás emlősök, melyek a takarmány bendőben fenntartott mikroba közösség segítségével, hosszan tartó (60-90 óra) összetett emésztési folyamatban képesek a növényi rostok alapos emésztésére [47-49]. A kérődzőknél az előbél négy kamrából (gyomorból) áll (1. ábra) [47,48,50,51]. A bendő (rumen), a recésgyomor (reticulum) és a leveles- vagy szájrétű (omasum) a nyelőcső módosulásaiból kialakult gyomor előtti szervek; míg az oltógyomor (abomasum), mely falában mirigyek helyezkednek el, az emésztőenzimek kiválasztódásának helye [47,48,50].

A bendő a legnagyobb gyomor előtti szerv, mely a retikulummal együtt egy nagy fermentációs edényként képzelhető el (szarvasmarhánál 100-150 literes, juhoknál kb. 10 liter térfogatú), amely nagy számú mikroorganizmust tartalmaz [47,48,50]. A bendőben anoxikus környezet uralkodik, amelyet az állat homeosztázisa 39°C-on tart [48,50]. A bendő pH-értéke 6-7 között mozog, mely érték függ az állat étrendjétől és az etetés gyakoriságától [47,48,50].

A szelektív visszatartás hatására a növényi biotömegtől felhalmozódik a bendőben, ezáltal korlátozza a takarmányfelvételt [48]. A szelektív visszatartás hatására a bendőben a folyadékok visszatartási ideje körülbelül 10-24 óra, a nagy táplálékreszecskeké 2 vagy 3 nap [50].

A kérődzők -az állatok többségéhez hasonlóan- nem rendelkeznek a legtöbb összetett növényi poliszacharid lebontásához szükséges enzimekkel. Azonban a bendő olyan környezetet biztosít, amely lehetővé teszi az anaerob mikrobák gazdag közösségének működését, amelyek ellátják ezt a metabolikus feladatot [52]. A bendőmikrobák a takarmány fermentálásával illékony zsírsavakat állítanak elő, amelyek a gazdaállat fő tápanyagforrásaiként szolgálnak, és jelentős mértékben hozzájárulnak a kérődzők hús- és tejtermeléséhez [15,52].

Mindez lehetővé teszi, hogy a bevitt növényi biotömegtől nagy része gáznemű vagy oldott fermentációs végtermékké alakuljon át [48]. A bendőben lévő mikroorganizmusok legnagyobb mennyiségben három illékony zsírsav termelését eredményezik, melyek az acetát (56-70%), propionát (17-29%) és butirát (9-19%) [47,53]. A gázfázis összetétele változó, de jellemzően tartalmaz CO₂-ot, CH₄-t, melyek a nyelőcsővön keresztül távoznak a kérődzés során, az oldható fermentációs termékek pedig a bendő falán keresztül abszorpció útján jutnak a véráramba [47,48,50].



1. ábra

A kérődzők emésztőrendszere [47]

Ezek alapján elmondható, hogy a kérődzők emésztőrendszerében található mikrobák hatékonyan képesek bontani a lignocellulózt, így mintaként szolgálhatnak a megfelelő mikrobák azonosításához.

1.4. Anaerob gombák, metanogének és baktériumok közötti kölcsönhatások

A kérődző állatok emésztőrendszerében előforduló mikroorganizmusok elsődleges szerepe az összetett növényi szénhidrátok lebontása, mely előnyös mind a gazdaállat, mind a mikrobák számára [54-56]. A bendőben megtalálható mikrobák közé tartoznak a baktériumok, protozoák, metanogén archaeák és anaerob gombák [54-56]. Az anaerob gombák a lignocellulózból holocellulózt és cukrokat szabadítanak fel, amelyek szubsztrátként szolgálhatnak az anaerob emésztésben részt vevő baktériumok számára, illetve acetátot és hangyasavat állítanak elő, amelyeket a metanogének közvetlenül hasznosíthatnak [57]. Ahhoz, hogy ezt a komplex rendszert biogáz-reaktorokban utánozzuk és növeljük az anaerob lebontás hatékonyságát, szükséges figyelembe venni az összes alkalmazott mikroorganizmus közötti szinergikus és antagonistikus kapcsolatot [58].

1.4.1. Anaerob gombák és metanogének szintrófikus kapcsolata

A rendelkezésre álló szakirodalom szerint a metanogének és anaerob gombák *in vitro* körülmények között együtt tenyészthetők lignocellulóz lebontására és metán előállítására [22,59]. Az anaerob gomba-izolátumok képesek növényi monoszacharidokat, például fruktózt, glükózt, xilózt és cellobiózt hasznosítani energiaforrásként, és a fő fermentációs termékként acetátot, hangyasavat, H_2/CO_2 , tejsavat, szukcinátot és etanolt előállítani [60-62]. A metanogének által használt fő szubsztrátok a bendőben a hangyasav, a H_2 és a CO_2 [22,60,63]. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a metanogének az anaerob gombák cellulózbontó képességének növelésén kívül képesek az anaerob gombák anyagcseréjét is megváltoztatni, ezáltal több acetát keletkezik, miközben kevesebb hangyasav, tejsav, szukcinát és etanol termelődik [64-66].

Bauchop és Mountfort (1981) [60] kísérletei során juhbendőből izolált anaerob gombákat vizsgáltak monokultúrában, illetve metanogénekkal együtt kokultúrában. A monokultúrával végzett vizsgálat során a fermentációs termékekre az alábbi eredményeket kapták: acetát 72,7%, szén-dioxid 37,6%, hangyasav 83,1%, etanol 37,4%, tejsav 67,0%, és hidrogén 35,3%, ahol a százalékos érték a fermentált hexóz móljainak arányában van feltüntetve. Kokultúra esetén az acetát volt a fő termék (134,7% - a monokultúra termelésének arányában), és a szén-dioxid termelés is nőtt (88,7%). Ezzel szemben a laktát- és etanoltermelés csökkent (2,9% és 19%), míg a hangyasav szintén alacsony maradt (1%), illetve kiemelkedően

fontos, hogy hidrogén felhalmozódást nem tapasztaltak. A kokultúrában jelentős mennyiségű metán keletkezett (58,7%), amelynek mértéke a metanogének típusától függött. Az acetáttal kapcsolatos vizsgálatok azt mutatták, hogy az acetát nem a metán prekursora. A metanogének hatását úgy értelmezték, mint az elektronáramlás eltolódását az elektronnyelő termékek irányából a hidrogénen keresztül a metán felé. A tanulmány új példát nyújtott a mikrobák közötti hidrogéntranszferre, és elsőként igazolta a gombák általi hidrogéntermelést.

Mountfort és mtsai (1982) [61] vizsgálták az anaerob gomba monokultúrák, illetve az anaerob gomba-metanogén (*Methanobrevibacter sp.*, *Methanosarcina barkeri*) kokultúrák milyen hatással vannak a cellulóz lebomlására, ezáltal a metán és szén-dioxid termelésre. Az eredményeik azt mutatták, hogy az egyedül anaerob gombákkal kezelt mintákban volt a leglassabb a cellulóz bomlási sebessége, és a kezdeti cellulóznak csak 53%-a bomlott le a fermentáció végén. A gomba *M. barkeri*-vel történő növesztése során a cellulóz 69%-a lebomlott, míg az összes keletkezett metán 550 μmol volt. A cellulóz leggyorsabb lebontását az anaerob gomba- *Methanobrevibacter sp.* kokultúra (87%), illetve trikultúra (anaerob gomba, *Methanobrevibacter sp.*, *M. barkeri*) érte el, utóbbinál 98%-os bomlási arányt figyeltek meg. A gomba- *Methanobrevibacter sp.* kokultúra esetében 320 μmol metán keletkezett, míg a trikultúra 870 μmol metánt állított elő. A 100 mol hexózra vetített CH_4 mol mennyisége a trikultúrában nagyobb volt, mint a *Methanobrevibacter sp.* vagy *M. barkeri* esetében, melyek értéke 137 mol, illetve 68 mol volt 100 mol hexózra vetítve. A trikultúras rendszerrel a metán hozama (majdnem 2 mol/mol hexóz) magasabb volt, mint bármelyik kéttenyészetes rendszernél, és teljes cellulóz lebomlás érhető el. Továbbá az acetát és a formiát metántermelésre való hasznosítása csak trikultúrával volt elérhető. A tanulmány példával szolgált arra, hogy az anaerob gombákat többféle metanogénnel kombinált tenyészetként, több szubsztrát felhasználását eredményezték, mintha az anaerob gombákat egy metanogénnel tenyészténék.

Jin és mtsai. (2011) [67] kutatásaiban anaerob gombákat (*Piromyces*, *Anaeromyces* és *Neocallimastix*) és metanogéneket (*Methanobrevibacter spp.*) vizsgáltak rizsszalmán *in vitro* körülmények között. Az eredmények azt mutatták, hogy ezek a tenyészetek 33,5-48,3% szubsztrátot bontottak le, és 0,33-0,84 mmol/100 ml tenyészet metánt termeltek. Az előzetes vizsgálatok alapján két tenyészetet választottak ki további tanulmányozásra, mely során arra voltak kíváncsiak, hogy ezek a mikrobák képesek-e lebontani a különböző lignocellulóz alapanyagokat. A metanogének gátlása esetén a tenyészetek lignocellulóz-bontó képessége jelentősen csökkent. Az anaerob gombák által termelt többlet hidrogénért cserébe a metanogének jótékony hatással vannak az anaerob gombák növekedésére és aktivitására; ezt

igazolta a magasabb cellulolitikus enzimaktivitás és a szubsztrát szárazanyag-tartalmának nagyobb mértékű csökkenése a metanogén kokultúrákban az anaerob gomba monokultúrákhoz képest [64,67]. Az anaerob gombák és metanogének azon képessége, hogy a lignocellulóiban gazdag növényi anyagokat képesek bontani és ezáltal gyorsan metánná alakítani, szintén ígéretes lehetőségeket kínál biotechnológiai alkalmazások számára [63,67].

Az áttanulmányozott szakirodalom alapján elmondható, hogy lignocellulóz biomasszát tartalmazó rendszerekben, ahol az anaerob gombákat és metanogéneket együtt tenyésztették, a metanogének jótékony hatást gyakorolnak az anaerob gombákra. A vizsgálati értékek legtöbb esetben azonban nehezen összehasonlíthatók, mivel sok esetben eltérőek a mértékegységek, illetve eltérő szubsztrátot alkalmaztak a kísérletek során.

1.4.2. Anaerob gombák és baktériumok szintrófikus kapcsolata

A bendőben a gombák a növényi sejtfal lebontásában részt vevő fibrolitikus baktériumok, valamint, más bendő-mikroorganizmusok sejtfaldegradációja során keletkező termékeket és metabolitokat hasznosító baktériumok közvetlen közelében fordulnak elő [68]. A baktériumok száma legalább 4 nagyságrenddel meghaladja az anaerob gombák számát [47,55]. A gombák és a baktériumok kokultúrában történő növesztésével kapcsolatos *in vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a gombák és baktériumok közötti kölcsönhatás jellege a konkrét gomba-baktérium párostól függ [55]. Számos tanulmány tárgya ezen kölcsönhatások megértése és vizsgálata [68-71].

Roger és mtsai. (1993) [71] két anaerob gombát, *Neocallimastix frontalis* MCH3-at és *Orpinomyces joyonii* TP 90-9-et búzaszalmán, illetve kukoricaszáron tenyésztették monokultúráként vagy a két bendő cellulolitikus baktérium egyikével, a *Ruminococcus flavefaciens* 007-tel vagy a *Fibrobacter succinogenes* -szel együtt. A *N. frontalis* vagy az *O. joyonii* és a *F. succinogenes* együttes tenyésztésében a búzaszalma vagy a kukoricaszár ugyanolyan mértékben került lebontásra, mint a gombás monokultúrák alkalmazásakor. A *N. frontalis* és az *R. flavefaciens* mindkét szubsztrátumon, az *O. joyonii* és a *R. flavefaciens* a búzaszalmán kevésbé hatékonyak, mint a gombás monokultúrák. A *R. flavefaciens* gátló hatást fejtett ki az *N. frontalis* és *O. joyonii* cellulolitikus aktivitására., míg a *F. succinogenes* nem lép kölcsönhatásba a két gombafajjal.

Ezzel szemben Paul és mtsai.[72] kutatásaikban megfigyelték, hogy a *Piromyces* sp. jelentős növekedést mutatott a cellulolitikus és hemicellulolitikus baktériumok jelenlétében

[21,72]. Mindezzel együtt a fibrolitikus mikrobiális populációk számának növekedése megnövekedett illó zsírsav-termeléssel, valamint megnövekedett xilanáz-, celluláz-, proteáz-, valamint acetil- és feruloil-észteráz-aktivitásokkal járt [21,73].

Lee és mtsai. (2000) [74] kutatásaik során szarvasmarha bendőből izolált baktériumok, protozoák és anaerob gombák egymáshoz viszonyított szerepét becsülték meg, növényi sejtfal emésztésben mesterséges körülmények között. A tenyészetek felülúszójának karboxi-metil-celluláz (CMCase) aktivitását vizsgálták. A monokultúráknál a gomba, míg kokultúrák esetében a baktérium-gomba rendszerben figyeltek meg magasabb CMCase aktivitást a többi kultúrához képest. Ezen kívül megfigyelték, hogy a baktérium-gomba frakciók együttes növesztése magasabb szintre növelte a xilanáz aktivitást, mint a baktérium- vagy gombafrakciók külön tenyésztése. Ez a tanulmány az elsők között volt, mely a bendőben előforduló mikrobiális frakciók növényi sejtfalbontó képességét vizsgálta.

Ezek alapján a szakirodalomból azt a következtetést tudtuk levonni, hogy nem egyértelmű az anaerob gombák és baktériumok közötti kapcsolat. A baktériumoknál előfordulnak olyanok, melyek a gombákat segítik; esetleg olyanok, melyek nincsenek hatással a gombákra; illetve olyanok is, amelyek gátolhatják a gombák növekedését.

A kutatások során nem találtam olyan tanulmányt, amely mindhárom tagot vizsgálta volna, legtöbb esetben két partnert vizsgáltak, így előzetesen nem tudtam következtetni, hogy az általam használni kívánt kultúrában lévő mikrobák hogyan fognak együttműködni.

1.5. Felhasználási területek

A lignocellulóz lebontásában és a biogáz előállításban az anaerob mikroorganizmusok – különösen a bendőben található anaerob gombák, metanogének és baktériumok – szoros együttműködése kulcsszerepet játszik [22,30,56,57,75]. Az anaerob gombák hatékonyan bontják le a növényi rostokat, hozzájárulva ezzel a biogáz-hozam növekedéséhez [30,76]. Az anaerob gombák metanogénekkel való kölcsönhatása különösen előnyös, mivel szinergikus hatásukkal fokozzák a lignocellulóz depolimerizációját és az energiatermelést, így csökkentve a bioreaktorban szükséges előkezelési lépéseket [22,77].

Emellett az anaerob gombákról feltételezik, hogy potenciális probiotikumként is felhasználhatók az állattenyésztésben, mivel képesek javítani a kérődzők takarmányhasznosítását és növekedését [56,75,78,79].

A lignocellulózt bontó mikrobák felhasználási lehetőségeinek ismerete lehetővé teszi, hogy célzottan keressünk olyan fajokat, amelyek az adott alkalmazási területhez (pl. biogáz előállítás, hulladékhasznosítás stb.) legjobban illeszkednek. A kiválasztott mikrobák későbbi felhasználása olyan irányba terelhető, amely gazdasági és környezeti szempontból a jövőben kedvező eredményekhez vezethet.

2. CÉLKITŰZÉS

Laboratóriumi munkám során célul tűztem ki egy olyan lignocellulóz lebontó konzorcium létrehozását, amely minimális tagokkal is hatékonyan képes cellulóz tartalmú szubsztrátok lebontására. Ennek vizsgálatához a konzorciumi tagokat együtt kívántam izolálni és feltételeztem, hogy a szintrófikus kapcsolataik révén stabil közösségként fennmaradnak mesterséges környezetben. A rendszer hatékonyságának követésére gázkromatográfiát alkalmaztam, hogy meghatározzam a keletkező gázelegy komponenseinek összetételét, valamint a lebontási folyamat során felszabaduló szerves savak koncentrációját. A mikrobiális proliferáció és az anaerob gomba (AGF), metanogén archaea (MA) és baktérium (BAC) közötti szoros sejt-sejt kölcsönhatás vizualizálásához pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeket készítettem. Emellett a szekvenálási eredmények alapján értékeltem a mikrobiom összetételében bekövetkező változásokat.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Mintavétel

A bendőmintákat egy Csongrád-Csanád vármegyei vágóhídról gyűjtöttük. A bendőtartalmat egy egészséges felnőtt marha bendőzsákjából távolítottuk el, közvetlenül a vágás után. A mintát anaerob tartályban szállítottuk, és 39°C-on tároltuk.

3.2. Tápoldat összetétele

A medium C tápoldatot a Peng és mtsi. által leírt, anaerob gomba izoláláshoz ajánlott eljárás alapján készítettük [80].

Medium C: 1000 ml-re egészítve desztillált vízzel [80]

2,5 g élesztőkivonat

10,0 g tripton

6,0 g NaHCO_3

150 ml minimál oldat I

150 ml minimál oldat II

100 ml centrifugált, sterilen szűrt bendőfolyadék (3220*g centrifugálva, 1 óra, 4°C)

1,0 g L-cisztein-hidroklorid

1,0 ml Resazurin oldat (1 g/l)

1% w/v szénforrás (szalma)

Minimál oldat I: 1000ml

3,0 g K_2HPO_4

Minimál oldat II: 1000ml

3,0 g KH_2PO_4

6,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

6,0 g NaCl

0,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,6 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

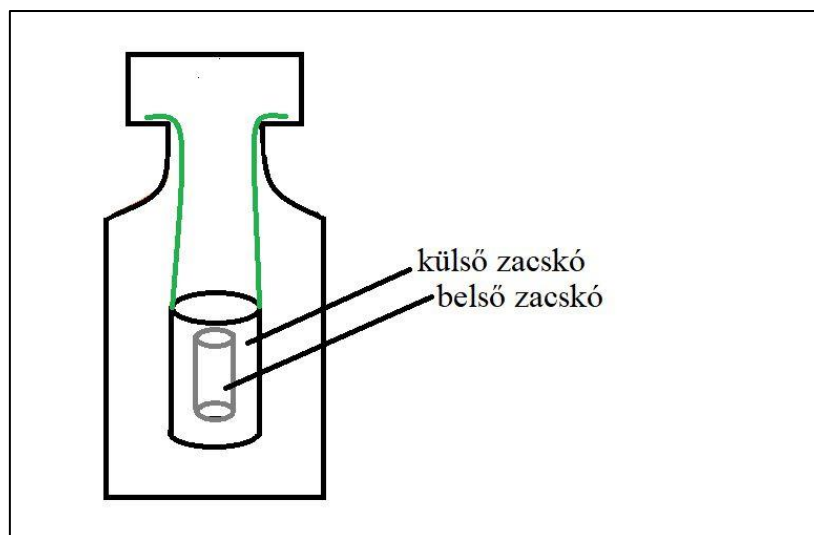
3.3. Felhasznált szubsztrát

A vizsgálatokhoz szubsztrátként búzaszalmát használtunk fel, amelyet javasolnak az anaerob gomba fenntartási kísérletekhez. A szubsztrát kiválasztásánál fontos volt, hogy rostban gazdag legyen, és noha a szalma nem képezi a kérődző állatok táplálékát, minősége és összetétele könnyen meghatározható.

3.4. Anaerob gombák, metanogének és baktériumok tenyésztése

Egy 500 ml-es kék kupakos ISO üvegedénybe 350 ml medium C tápoldatot öntöttünk. Az edényeket előre elkészített, speciálisan tervezett dupla tasakkal láttuk el (2. ábra). A zacskók 100 µm pórusméretű inert polimer textilből készültek, amely lehetővé tette az anaerob gombák, baktériumok és metanogén archaeák könnyebb átjutását a zacskókon. A külső és a belső zacskóba 2 mm-es mérettartományba tartozó búzaszalmát tettünk. A külső zacskóba helyezett szubsztrát tömege 1 g, míg a belsőbe 0,2 g volt. Az edényekbe 20 g friss bendőtartalmat is tettünk, mely tartalmazta a szemcsés frakciót is, és 75 fordulat/perc sebességgel 39°C-on 5 g üveggyönggyel ráztattuk, hogy az anaerob gombák, baktériumok és metanogén archaeák elváljanak az rostos inokulum felszínéről. A szalma lebontásában résztvevő mikrobák így elkülönültek a bendőtartalomban jelenlevő biofilmképző részecskéktől. A mikrobák így feltételeztük, hogy képesek lesznek a belső és külső zacskót is kolonizálni. A további elemzésekhez a belső és külső zacskóból is mintát vettünk 0, 24, 48 és 72 óra elteltével. Az inkubálás során pH-t folyamatosan mértünk, mely értéke 6,6-6,8 tartományban maradt, mely megfelelő volt a közösség minden tagja számára.

A kísérleteket három biológiai párhuzamossal végeztük el.



2. ábra

Az általunk használt tenyésztőrendszer sematikus rajza

3.5. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A mintákat mostuk, foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) újra szuszpendáltuk, és 2,5% (v/v) glutáraldehiddel és 0,05 M kakodilát pufferrel (pH=7,2) rögzítettük PBS-ben egy éjszakán át 4 °C-on. A mintákat kétszer mostuk PBS-sel és dehidratáltuk fokozatos etanol sorozattal (30%, 50%, 70%, 80%, 100% etanol (v/v), egy éjszakán át 4°C-on). A mintákat kritikus pontszárítóval szárítottuk, majd 12 nm-es aranybevonattal vontuk be (Quorum Technologies, Laughton, East Sussex, Egyesült Királyság), ezután JEOL JSM-7100 F/LV pásztázó elektronmikroszkóppal (JEOL Ltd., Tokió, Japán) figyeltük meg.

3.6. DNS izolálás és új generációs szekvenálás

A teljes közösség DNS izolálásához a belső zacskókból mintákat vettünk. A DNS-kivonásokat a Zymo Research Fecal DNS kit (D6010, Zymo Research, Irvine, USA) segítségével végeztük. A lízis után (a gyöngyverést Vortex Genie 2-vel végeztük, gyöngyméret: 0,1 mm; verési idő: 15 perc, verési sebesség: max) a Zymo Research kit protokollt követtük. A DNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) és Qubit 2.0 fluorométerrel (Life Technologies, Carlsbad, USA) határoztuk meg.

Az Illumina szekvenáló platform ajánlásait szigorúan betartottuk (Illumina Inc., USA). DNS-mintákat használtunk a NEBNext Ultra II Library Prep Kit segítségével *in vivo* szekvencia-előkészítéshez. A metagenomikai szekvenálást az Illumina MiSeq platform és a MiSeq Reagent Kit v2 használatával végeztük.

3.7. Gáz kromatográfia

A légtérben lévő bio-metán koncentrációkat az első, második és harmadik napon Agilent 7880 gázkromatográf (GC) mértük egy HP Molesieve oszlopon, amelynek hossza 30 m, belső átmérője 0,53 mm, hővezető képesség detektorral felszerelt. A vivőgáz Ar volt, a kemence (oszlop) hőmérséklete 37°C, az áramlási sebesség 1,2 ml/perc és a detektor hőmérséklete 160°C. 250 µl-es Hamilton fecskendővel 50 µl gázmintát fecskendeztünk be.

3.8. Szerves sav meghatározása HPLC-vel

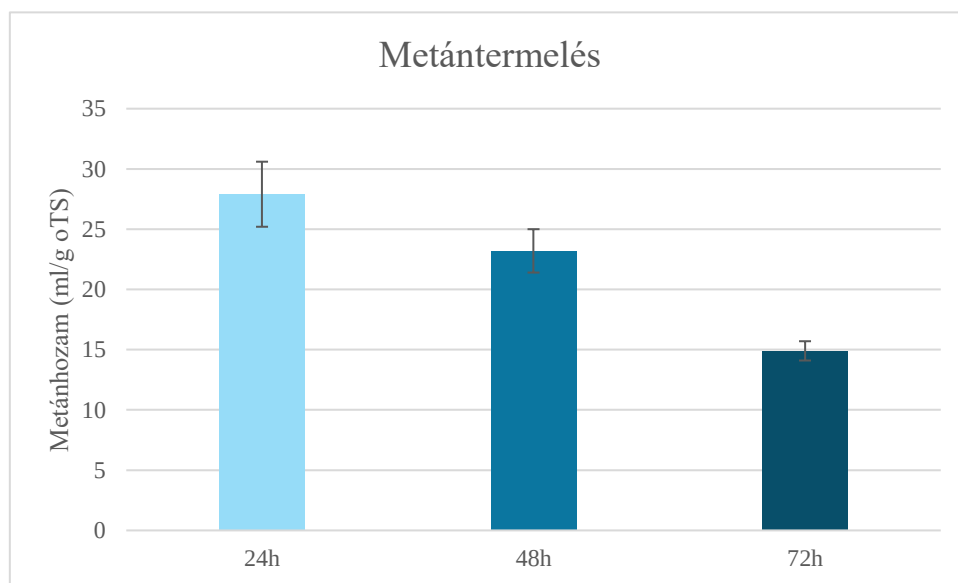
A szerves sav analíziséhez a mintákat az izolált minták folyadékfázisából vettük. A mintákat centrifugáltuk (13 000 fordulat/perc 10 percig), és a felülúszót PES (poliéterszulfon) centrifugális szűrőn (PES 516-0228, VWR) 13 000 fordulat/perc sebességgel 20 percig szűrtük. Az illékony szerves savak koncentrációját Chromaster 5450 törésmutató detektorral felszerelt HPLC-vel (Hitachi Chromaster) mértük. Az elválasztást Agilent Hi-Plex H oszlopon végeztük. Az oszlop és a detektor hőmérséklete 50°C, illetve 41°C volt. Az eluens 0,02 M H₂SO₄ (0,6 ml/perc).

4. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

4.1. A gázhozamok mennyiségi és minőségi jellemzése

Munkahipotézisünk az volt, hogy az anaerob gombák és baktériumok fizikailag is összetapadó együttese képes bontani a lignocellulózt, a hozzájuk társuló szintrófikus metanogének pedig a felszabaduló termékeket metánná alakítják. A folyamatot a minták metán termelésével lehetett követni. Ezzel igazolni tudjuk a metanogén mikrobák jelenlétét a mintákban, illetve a lignocellulóz szubsztrát bontásának mértékét. A metántartalom méréséhez gázkromatográfiás módszert használtunk, a méréseket pedig 3 időpontban (24 óra, 48 óra, 72 óra) végeztük (3. ábra), majd a gázteret CO₂-dal ismét átmostuk.

Az elsődleges szempont az volt, hogy figyelembe vegyünk a rendszer által termelt metán mennyiségét, mivel ebből tudtunk arra következtetni, hogy a rendszerben előforduló metanogének és anaerob gombák és/vagy cellulózbontásra képes baktériumok kölcsönhatnak. Az első mérés a leoltást követő 24h elteltével történt, ekkor már jelentős mennyiségű metán volt kimutatható a rendszerből. A 48h mérésnél némileg alacsonyabb metánkoncentrációt mértünk a mintáinkból, s ez a 72h mérésre tovább csökkent. A metán jelenléte, illetve a gázkromatográfiás mérések által igazolt oxigénmentes közeg azt bizonyítja, hogy a rendszer anaerob volt és a kezdeti állapot kedvezett a metántermelésnek. A metán termelés az idővel visszaesett, amit a hasznosítható lignocellulóz mennyiségének csökkenése okozott.



3. ábra

A mikrobák együttműködésének eredményeképpen termelendő metán mértéke

4.2. Szerves sav meghatározása HPLC-vel

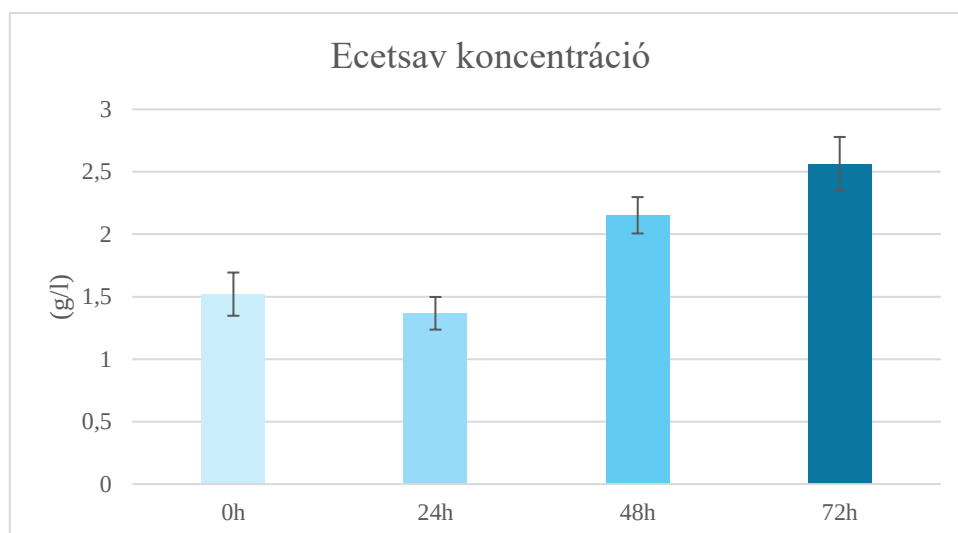
A szerves savak azonosítása és mennyiségi meghatározása lényeges lépés a mikrobák életműködéseinek tanulmányozásában, mivel a felhalmozódó közti termékek gátolhatják a mikrobák szaporodását. Ezért szükséges a szerves savak jelenlétének alapos vizsgálata, amelyhez a HPLC módszer kiváló eszközt biztosít.

A mintáinknál megfigyeltük számos illékony szerves sav, valamint az etanol, cellobióz és glükóz jelenlétét. Egyes tanulmányok [27,68] arról számoltak be, hogy a metanogének jelenléte jelentősen javítja az anaerob gombák xilanáz aktivitását, ezáltal elősegítve a xilóz hatékonyabb hasznosulását. Hasonló megfigyelésekről számoltak be, amikor anaerob gombákat baktériumokkal együtt tenyésztettek, ilyenkor megnőtt a xilanáz aktivitás [74]. A mintáinkban nem keletkezett xilóz, ebből arra következtethetünk, hogy az általunk használt kokultúra képes volt hasznosítani a xilózt. A kimutatható vegyületek közül az ecetsav és propionsav keletkezett legnagyobb koncentrációban, így ezeket tüntettük fel a diagramokon (4. és 5. ábra).

Bauchop és Mountfort (1981) [60] publikációjukban kifejtik, hogy anaerob gomba-metanogén kokultúrák együttes növesztése során csökken a keletkező etanol mennyisége. Az általunk használt kultúráknál nem volt kimutatható etanol, mely utalhat a rendszerben található mikrobák együttműködésére, noha az sem kizárható, hogy az általunk izolált anaerob gomba fajok nem termelnek etanolt.

Az ecetsav a metanogenezis egyik alapvető szubsztrátja, mivel később ebből képződik a metán és szén-dioxid, melyek lényegesek a biogáz előállításában. A biogáz fermentorokban az optimális ecetsav-koncentráció 1-3 g/l körül mozog, az ettől az értéktől való eltérés a fermentor nem megfelelő működésére utalhat. Ugyanakkor a szakirodalomból nem álltak rendelkezésünkre pontos adatok, hogy az általunk használt kokultúra milyen vegyületeket és milyen mértékben képes előállítani, valamint arra vonatkozóan sem találtunk adatot, hogy milyen koncentrációban képesek tolerálni a képződő és felhalmozódó mellék- és végtermékeket.

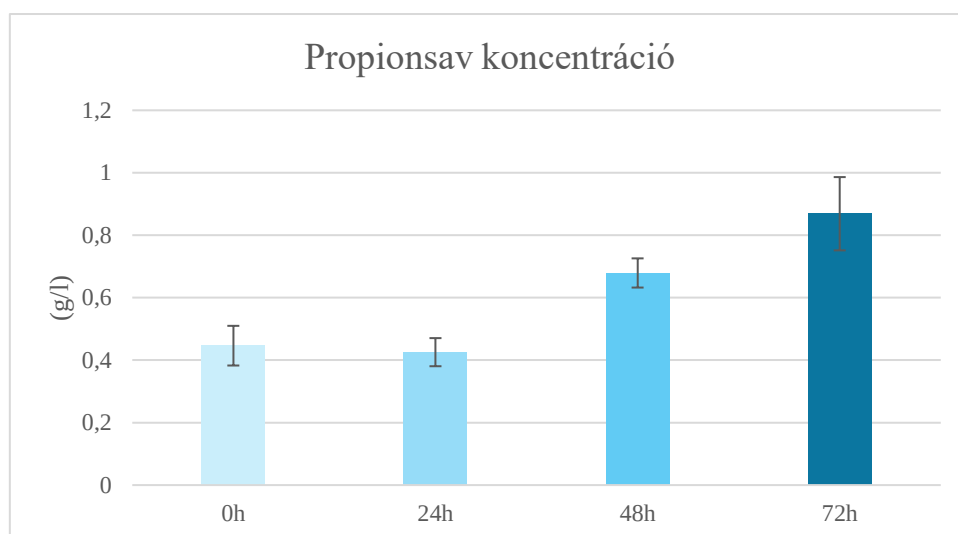
A kezdeti ecetsav koncentráció 1,52 g/l körül mozgott, majd 24 óra elteltével ez a szám elkezdett csökkeni 1,36 g/l -re. Az elkövetkező órákban azonban folyamatosan kezdett növekedni az ecetsav koncentráció, így 48 óra alatt 2,15 g/l, 72 óra után 2,56 g/l ecetsav keletkezett (4. ábra). A 72 órás időpontban mért magasabb koncentráció közösség aktivitásának csúcspontját jelezheti, ami egy stabil anaerob fermentációs folyamatra utal.



4. ábra

A kumulatív ecetsav koncentráció értéke a különböző időben mért anaerob gomba-metanogén-baktérium minták esetében

A propionsav esetében (5. ábra) az ecetsavhoz hasonlóan 24 óra elteltével csökkent a propionsav koncentrációja, majd 48 óra elteltével fokozatos növekedés figyelhető meg. A propionsav koncentrációja a mintákban 0,38-0,98 g/l között mozgott.



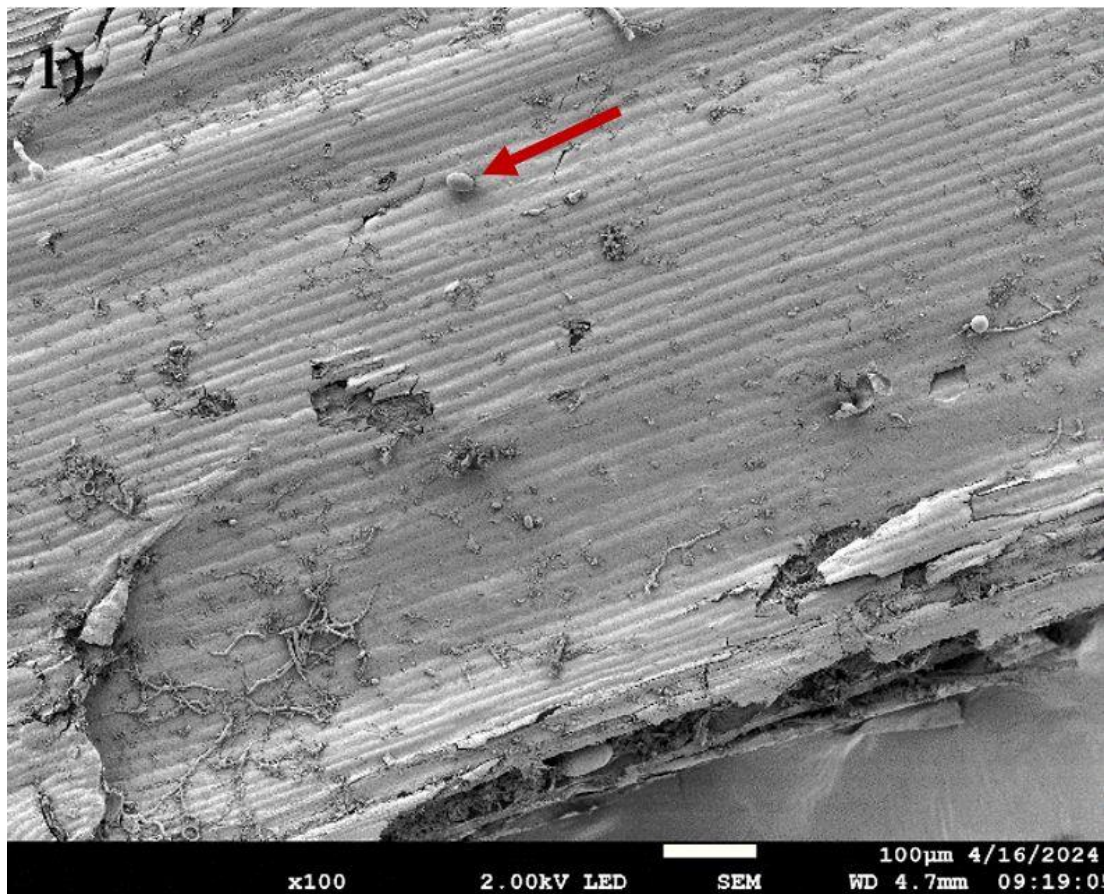
5. ábra

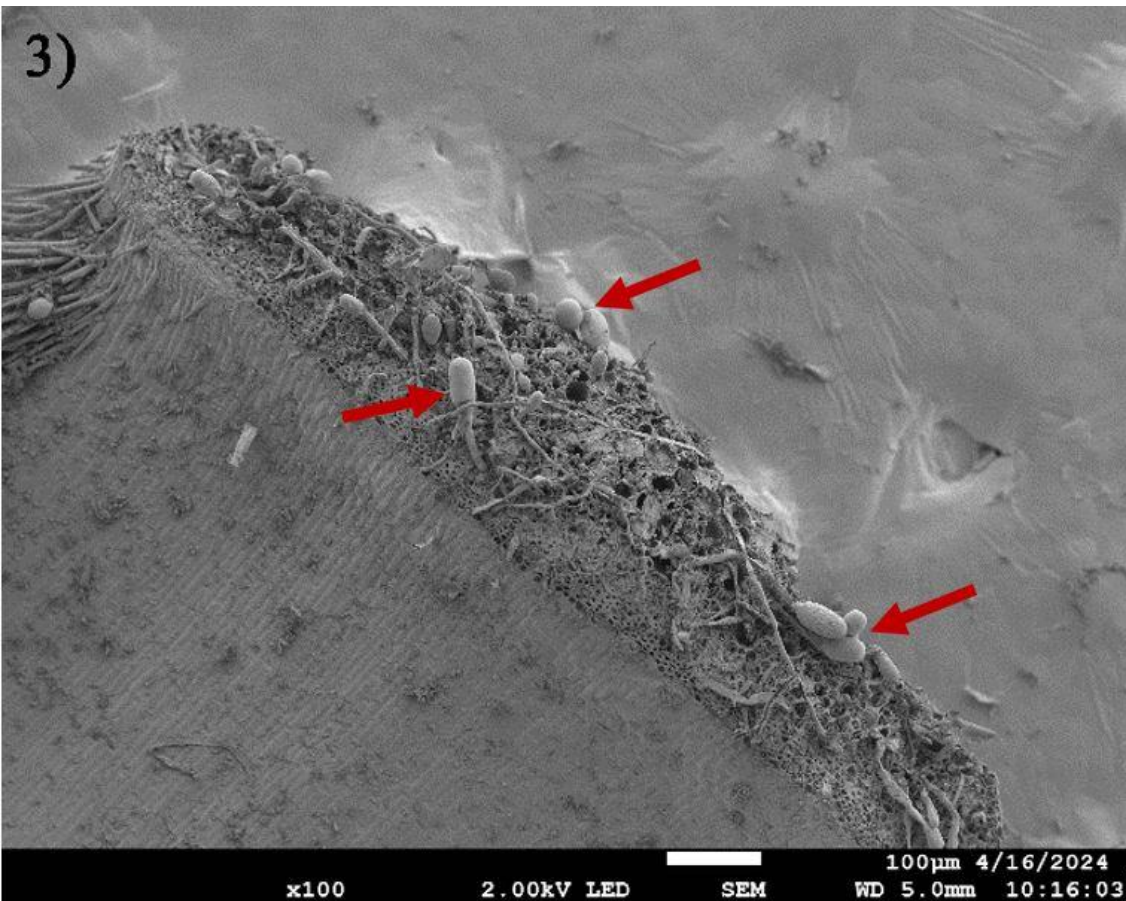
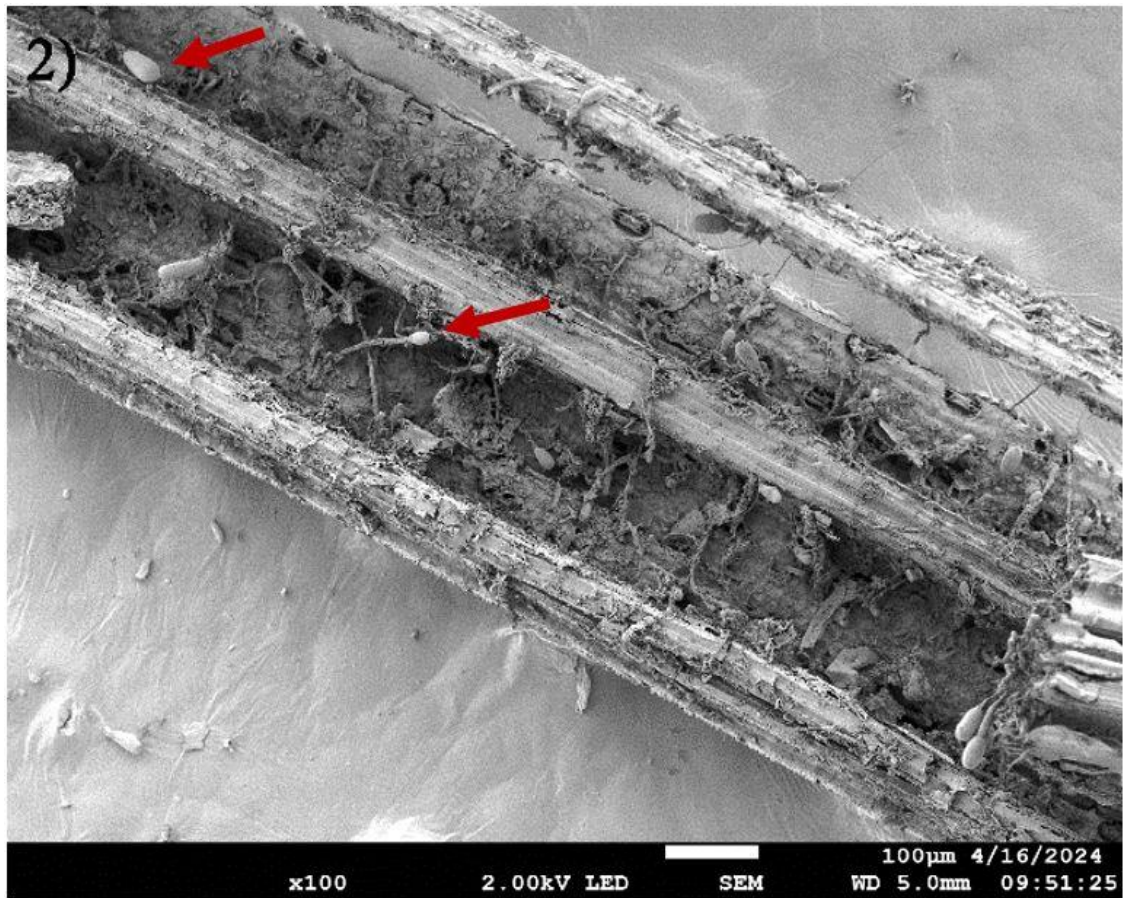
A kumulatív propionsav koncentráció értéke a különböző időben mért anaerob gomba-metanogén-baktérium minták esetében

Az anaerob gomba-baktérium-metanogén kokultúrákban a szervesanyag lebontó folyamatok nemcsak elindultak, hanem idővel fokozódtak is, amit az ecetsav és a propionsav koncentrációjának emelkedése egyértelműen igazol.

4.3. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

Feltételeztük, hogy a mintákban jelenlévő mikrobák száma az idő előrehaladtával fokozatosan növekedni fog, ezzel együttesen a szubsztrát is hasznosul, illetve az anaerob gomba, metanogén archaea és baktériumok azon tagjai között, amelyek valós szintrófikus kapcsolatban állnak akár sejt-sejt kölcsönhatás is kialakulhat. Annak érdekében, hogy ezt vizuálisan is igazolni tudjuk, pásztázó elektronmikroszkópiát (SEM) használtunk. A mikroszkópos felvételekhez (6. és 7. ábra) a mintákat a belső zacskókból vettük. A SEM használatával a 24, 48 és 72 órás mintákat figyeltük meg. A későbbiek során számokkal fogok hivatkozni egyes mintákra, még pedig a 24 órás az 1., a 48 órás a 2. és a 72 órás a 3. mintát jelenteni.





6. ábra

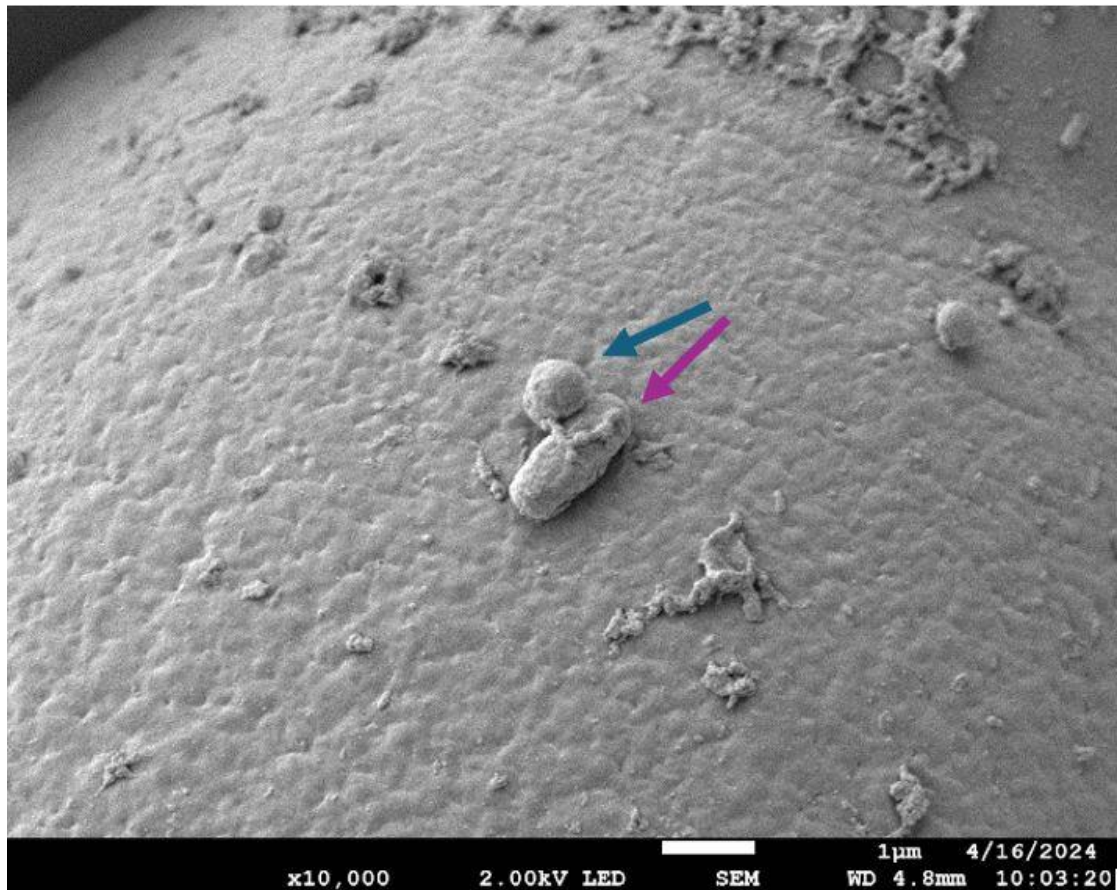
A SEM képek az általunk használt rendszerből származó mikrobákat mutatják a szalma szubsztrát felületén különböző időpontokban. Az 1. kép a 24 órás, a 2. a 48 órás, a 3. pedig a 72 órás mintákat ábrázolja. Az anaerob gombák jellegzetes struktúráit nyilakkal jelöltem.

Az 1. minta esetében még csekély a betelepült mikrobák száma, azonban a bontási folyamat indulásának első lépései számos információt mutatnak pl. legnagyobb számban anaerob gombákat találtunk, miközben baktérium és metanogén tagok csupán elenyésző mennyiségben voltak jelen.

A 2. mintánál már észlelhetők baktérium és metanogén betelepülések, illetve az 1. képhez képest még több anaerob gomba volt jelen. Ezzel egyidőben a szubsztrátot is elkezdték bontani a mikrobák.

A 3. minta esetében már sokkal nagyobb változás figyelhető meg. Az anaerob gombák száma látványosan több az 1. és 2. mintákhoz képest. A szubsztrátként használt búzaszalmát a mikrobák még nem teljesen, de jelentős mértékben bontották.

A mikrobák méretbeli különbsége miatt a 6. ábrán az anaerob gombák, illetve a lebontott szubsztrát figyelhető meg, viszont a baktériumok és metanogének kevésbé látszódnak, ugyanakkor jelen vannak a rendszerben. A 48 órás minta nagyobb nagyítású vizsgálata során érdekes jelenséget figyeltünk meg: az egyik anaerob gomba felszínén baktériumok és metanogének is jelen voltak, amelyek feltételezhetően sejt-sejt szintű kapcsolatot alakítottak ki egymással (7. ábra).



7. ábra

Az anaerob gomba felszínén megfigyelhető baktérium és metanogén. Az metanogén (kék) és baktérium (lila) jellegzetes struktúráit nyilakkal jelöltem.

A pásztázó elektronmikroszkópia alkalmazásával sikerült nyomon követnünk a vizsgálni kívánt mikrobák jelenlétét az általunk alkalmazott rendszerben. Az idő előrehaladtával fokozatosan megnövekedett a kokultúrákban lévő mikrobák száma, mivel a lignocellulóz tartalmú szubsztrát bontásával nemcsak saját szaporodásukat segítették elő, hanem egyre intenzívebb ütemben fogyasztották el a rendelkezésre álló szubsztrátot is.

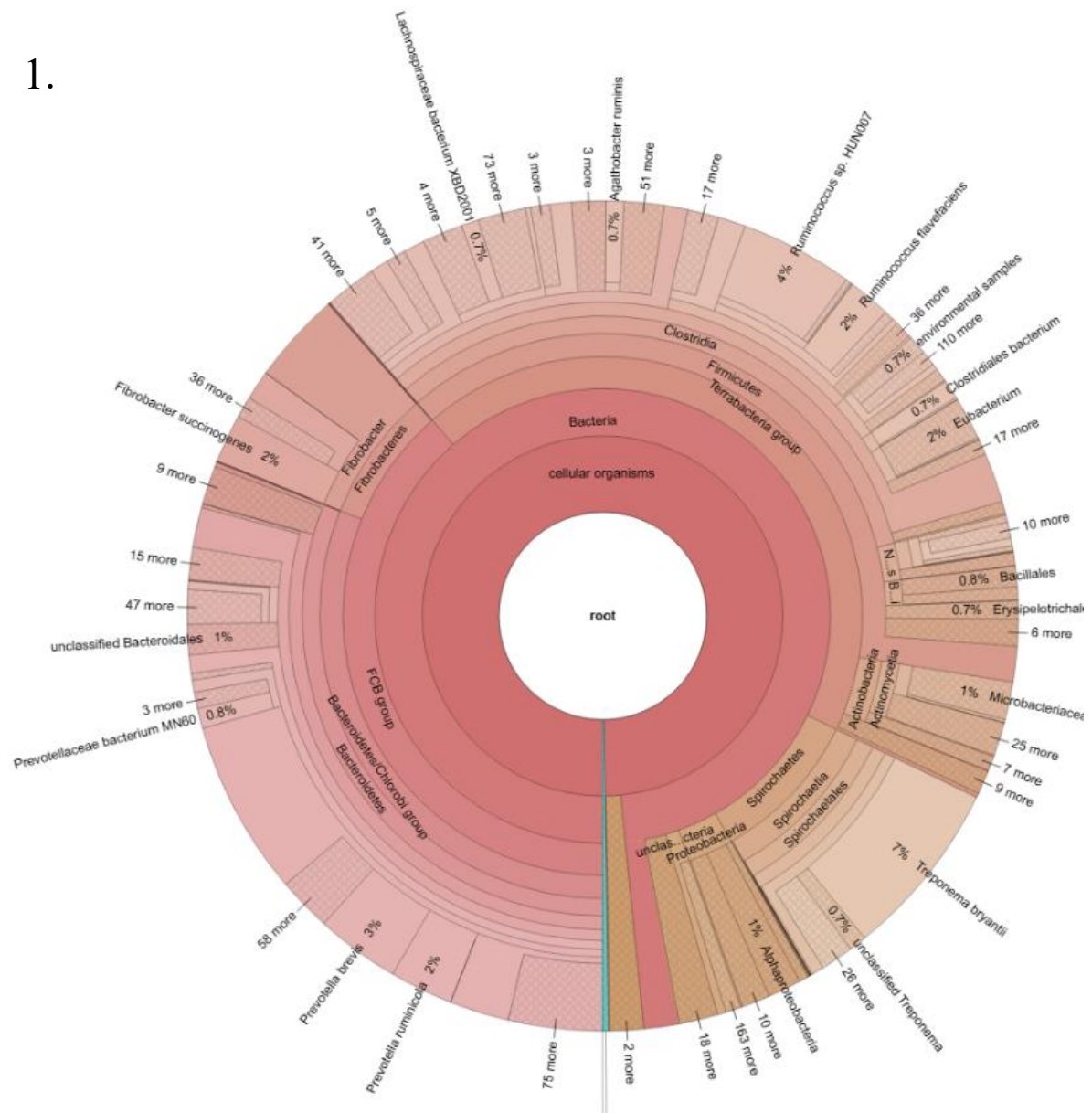
A szakirodalmakban [60,64] olvasottak szerint az anaerob gomba és metanogén sejt-sejt szintű kapcsolatot már többször megfigyelték, amely az általunk vizsgált mintákban is gyakorta megfigyelhető volt.

4.4. A metagenom szekvenálás eredményei

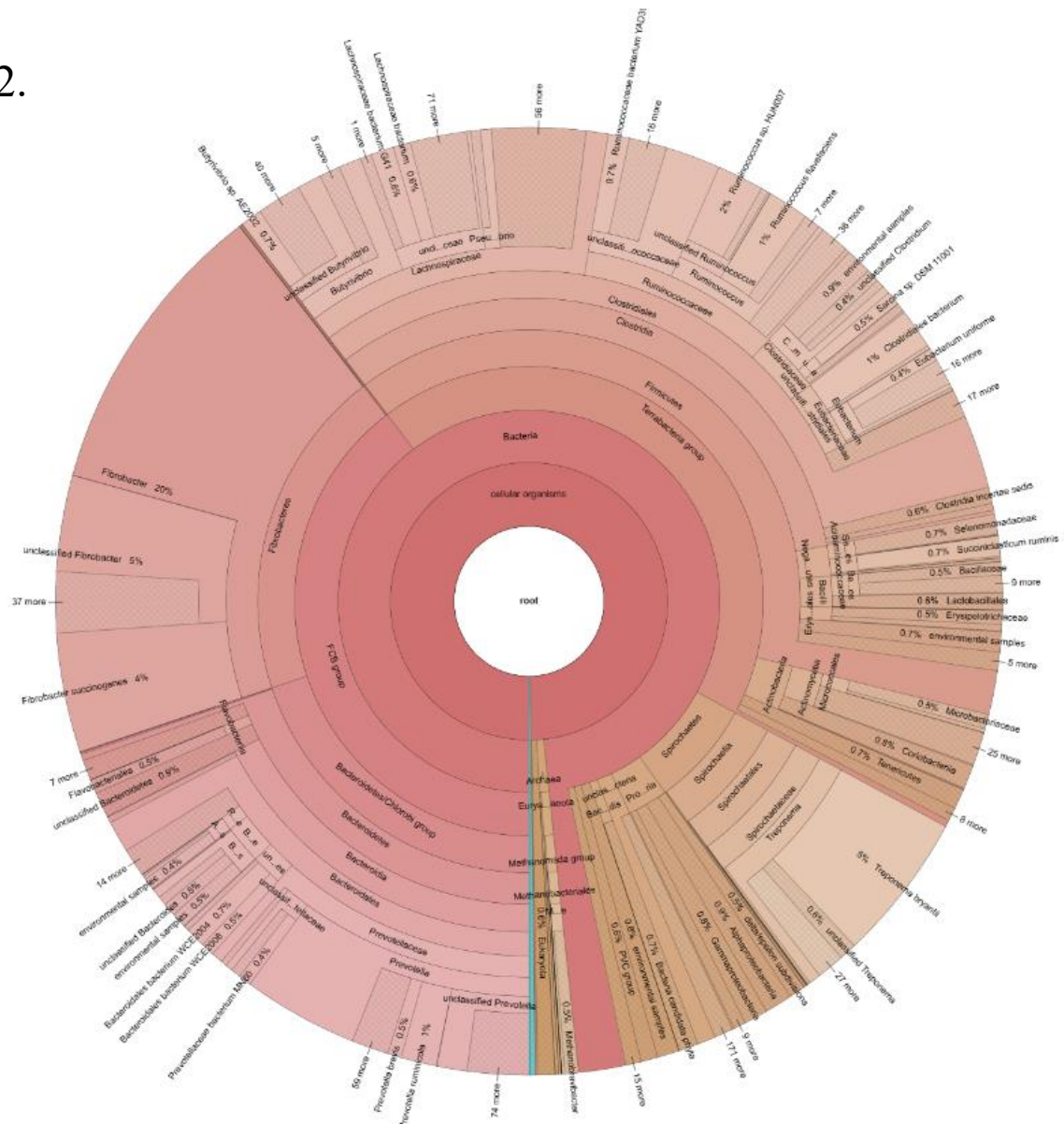
A magasabb taxonómiai szinteken a közösség összetétele a 24, 48 és 72 órás minták esetében nagyon hasonló (8. ábra). Mindhárom közösséget főként baktériumok alkották; ezen kívül előfordultak archeák (0,7-0,8%) és eukarióták (0,6%) is kis mennyiségben. A baktériumok főként a FCB (*Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes*) csoportból (39% 1-ben, 40% 2-ben, 45% 3-ban), *Terrabacteria* (44% 1-ben, 44% 2-ben, 39% 3-ban) csoportból származnak; ezenkívül *Spirochaetes* (10% 1-ben, 7% 2-ben, 6% 3-ban) és *Proteobacteria* (3% 1-ben, 3% 2-ben, 5% 3-ban) alacsonyabb arányban szerepelnek. A mintákon belül a legelterjedtebb törzsnek a *Firmicutes* törzs (39% 1-ben, 39% 2-ben, 34% 3-ban) számított, azon belül is a *Clostridia* osztály (az egész mintára nézve 32% 1-ben, 32% 2-ben, 28% 3-ben).

A Krona ábra alapján az 1-es mintában (8. ábra) *Fibrobacter succinogenes* (2%), *Prevotella brevis* és *Prevotella ruminicola* (3%), illetve a *Ruminococcus sp.* HUN007 és *Ruminococcus flavefaciens* (2%) fordulnak elő nagyobb mértékben. A 2-es mintában *Fibrobacter succinogenes* (4%), besorolatlan *Lachnospiraceae* (4%), *Treponema bryantii* (5%). A 3-as mintában *Fibrobacter succinogenes* (5%), besorolatlan *Lachnospiraceae* (4%), *Bacteroidales bacterium* WCE2008 (4%).

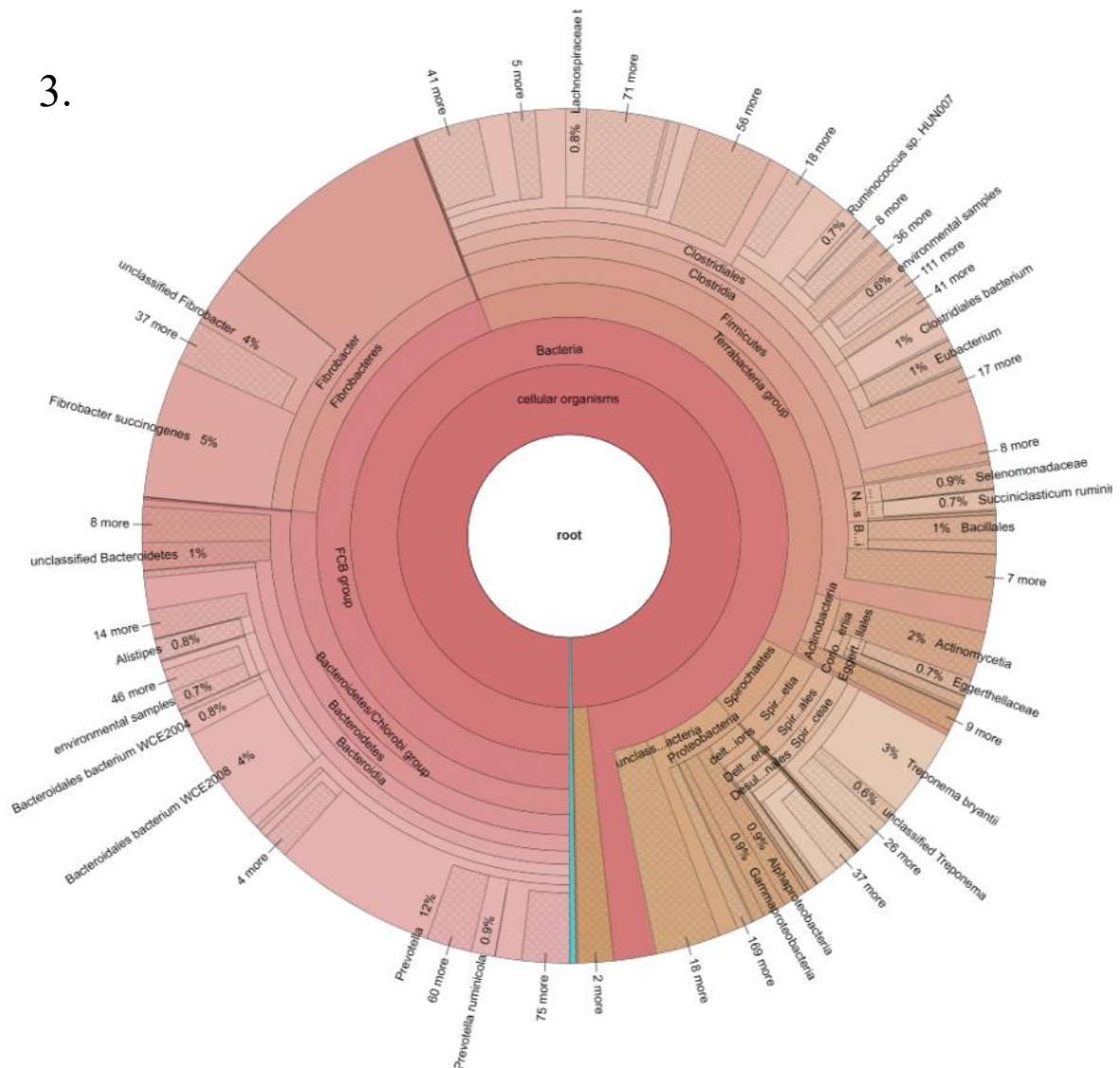
1.



2.



3.



8. ábra

A 24, 48 és 72 órás mintákban található közösségek taxonómiai összetétele. Az 1-es kép a 24 órás, a 2-es a 48 órás, a 3-as pedig a 72 órás mintákat ábrázolja.

A további lépésekben a három mintából válogattuk ki azokat a fajokat, melyek leolvasás alapján a leggyakrabban előfordultak mindhárom mintában. Ezek alapján 3 FCB csoportba tartozó, 3 *Terrabacteria*, 1 *Proteobacteria* csoportba tartozó mikroorganizmust kaptunk. A válogatott baktériumok közül ki kell emelni a *Butyrivibrio hungatei*, *Lachnospiraceae bacterium G11*, *Succinoclasticum ruminis*, *Schwartzia succinivorans*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter ruminantium* fajokat, amelyek a szakirodalom alapján [81-86] megfelelő jelöltek az anaerob gomba-baktérium-metanogén konzorcium kialakítására.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A népesség növekedésével egyre több energiát használunk el a mindennapi tevékenységeinkhez. Az energia nagy részét nem megújuló energiaforrásokból fedezzük, melyek készlete véges. A növényi biomassa, mint megújuló energiaforrás nagy potenciállal rendelkezik biotechnológiai alkalmazás vonatkozásában, azonban az összetétele megnehezíti a bontási folyamatokat, így számos hulladék és melléktermék keletkezik. A kérődzők bendőjében számos mikroorganizmus megtalálható, melyek egymással együttműködve képesek a növényi anyagot gáznemű és oldható végtermékké alakítani. Ezért laboratóriumi munkám során célul tűztem ki, a bendőben jelenlevő tagokat is tartalmazó, lignocellulózt lebontó konzorcium létrehozását, amely minimális tagszámmal is hatékonyan képes a kívánt növényi szubsztrátok lebontására.

A kísérletek során egy olyan rendszert hoztunk létre, amely a bendőből izolált mikroorganizmusokat tartalmazta, és feltételeztük, hogy a mikrobák szintrófikus kapcsolataik révén képesek stabilan fennmaradni a mesterséges rendszerben. A bendőből származó anaerob gomba, metanogén archaea és baktérium tagokat anaerob tápoldatban tenyésztettük, szénforrásként szalmát alkalmazva. A szubsztrátot néhány óra alatt elkezdték a mikrobák kolonizálni, ezzel együtt megindult a lebontási folyamat és metántermelés. Ennek során a keletkező szerves savak és megtermelt gázkeverék mennyiségét és minőségét nyomon követtük. A vizsgálat során 4 időpontban (0 óra, 24 óra, 48 óra, 72 óra) vettünk mintát pásztázó elektronmikroszkópiához (SEM), és metagenom szekvenáláshoz.

A kutatásunk eredményei új lehetőségeket mutatnak a lignocellulózt biomassza hasznosításának terén. Az általunk használt mikrobák nemcsak, hogy hatékonyan bontják a lignocellulózt, hanem egy rendszertani szempontból izgalmas és széleskörű együttműködést is megvilágítanak a mikroorganizmusok között. A szintrófikus kapcsolatok, amelyek a különböző eukarióta, prokarióta és archaea fajok között zajlanak, lenyűgöző példát mutatnak arra, hogyan képesek az élő rendszerek egymást segítve hatékonyan átalakítani a biomasszát fenntartható módon. Ez a kapcsolat alapvetően átalakíthatja a jövőben a kérődzők tápanyag hasznosítását, hozzájárulhatnak a metánkibocsátás csökkentéséhez, és jelentősen növelhetik a biogáz reaktorok hatékonyságát.

A kutatás során bizonyítottuk, hogy a hipotézisünk, mely a különböző mikrobiális közösségek szintrófikus együttműködésére épít, működik, azonban a gyakorlatba történő átültetéséhez további vizsgálatok szükségesek.

FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Bhagat NR, Kumar S, Kumari R, Bharti VK. A Review on Rumen Anaerobic Fungi: Current Understanding on Carbohydrate Fermentation and Roughages Digestion in Ruminants. *Appl Biochem Microbiol*. 2023. június 25.;59(3):231–49.
2. Ren F, Wu F, Wu X, Bao T, Jie Y, Gao L. Fungal systems for lignocellulose deconstruction: From enzymatic mechanisms to hydrolysis optimization. *GCB Bioenergy* [Internet]. 2024. május 11.;16(5). Elérhető: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gcbb.13130>
3. Periyasamy S, Beula Isabel J, Kavitha S, Karthik V, Mohamed BA, Gizaw DG, és mtsai. Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review. *Chemical Engineering Journal*. 2023. február;453:139783.
4. Nurika I, Shabrina EN, Azizah N, Suhartini S, Bugg TDH, Barker GC. Application of ligninolytic bacteria to the enhancement of lignocellulose breakdown and methane production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). *Bioresour Technol Rep*. 2022. február;17:100951.
5. Teletchea F. Animal Domestication: A Brief Overview. In: *Animal Domestication*. IntechOpen; 2019.
6. Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, és mtsai. Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 2011. október 12.;478(7369):337–42.
7. Wilkinson JM, Lee MRF. Review: Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. *Animal*. 2018;12(8):1735–43.
8. Thornton PK. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010. szeptember 27.;365(1554):2853–67.
9. Bailey R, Froggatt A, Wellesley Energy L. Livestock-Climate Change's Forgotten Sector Global Public Opinion on Meat and Dairy Consumption. Chatham House. 2014;
10. Sha Y, Zhang C, Xu Z, Zhai R, Jin M. Quantitative assessment of ash effects on densifying lignocellulosic biomass with chemicals followed by autoclave (DLCA) pretreatment. *Ind Crops Prod*. 2024. szeptember;216:118767.
11. Gurovic MSV, Viceconte FR, Bidegain MA, Dietrich J. Regulation of lignocellulose degradation in microorganisms. *J Appl Microbiol*. 2023. január 23.;134(1).
12. Agustina S, Wiryawan KG, Suharti S, Meryandini A. The addition of anaerobic fungi isolates from buffalo rumen to increase fiber digestibility, fermentation, and microbial population in ruminants. *Biodiversitas*. 2024;25(1):107–15.
13. Stabel M, Haack K, Lübbert H, Greif M, Gorenflo P, Aliyu H, és mtsai. Metabolic shift towards increased biohydrogen production during dark fermentation in the anaerobic

- fungus *Neocallimastix cameroonii* G341. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2022. szeptember 19.;15(1):96.
14. Abdel-Aziz NA, Salem AZM, El-Adawy MM, Camacho LM, Kholif AE, Elghandour MMY, és mtsai. Biological treatments as a mean to improve feed utilization in agriculture animals—An overview. *J Integr Agric*. 2015. március;14(3):534–43.
 15. Liang Z, Zhang J, Ahmad AA, Han J, Gharechahi J, Du M, és mtsai. Forage lignocellulose is an important factor in driving the seasonal dynamics of rumen anaerobic fungi in grazing yak and cattle. *Microbiol Spectr*. 2023. október 17.;11(5).
 16. Weimer PJ, Russell JB, Muck RE. Lessons from the cow: What the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2009. november;100(21):5323–31.
 17. Li Y, Li Y, Jin W, Sharpton TJ, Mackie RI, Cann I, és mtsai. Combined genomic, transcriptomic, proteomic, and physiological characterization of the growth of *Pecoramyces* sp. F1 in Monoculture and Co-culture with a Syntrophic Methanogen. *Front Microbiol*. 2019;10(MAR).
 18. Li F, Li C, Chen Y, Liu J, Zhang C, Irving B, és mtsai. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. *Microbiome*. 2019. december 13.;7(1):92.
 19. Kumar S, Indugu N, Vecchiarelli B, Pitta DW. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. *Front Microbiol*. 2015;6(JUL).
 20. Janssen PH, Kirs M. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2008. június 15.;74(12):3619–25. Elérhető: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02812-07>
 21. Wunderlich G, Bull M, Ross T, Rose M, Chapman B. Understanding the microbial fibre degrading communities & processes in the equine gut. *Köt. 5, Animal Microbiome*. BioMed Central Ltd; 2023.
 22. Li Y, Meng Z, Xu Y, Shi Q, Ma Y, Aung M, és mtsai. Interactions between Anaerobic Fungi and Methanogens in the Rumen and Their Biotechnological Potential in Biogas Production from Lignocellulosic Materials. *Microorganisms* [Internet]. 2021. január 17.;9(1):190. Elérhető: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/190>
 23. McKendry P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol*. 2002. május;83(1):37–46.
 24. Seppälä S, Wilken SE, Knop D, Solomon K V., O'Malley MA. The importance of sourcing enzymes from non-conventional fungi for metabolic engineering and biomass breakdown. *Köt. 44, Metabolic Engineering*. Academic Press Inc.; 2017. o. 45–59.
 25. Malherbe S, Cloete TE. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol* [Internet]. 2002. június;1(2):105–14. Elérhető: <http://link.springer.com/openurl.asp?id=doi:10.1023/A:1020858910646>

26. Sun S, Sun S, Cao X, Sun R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016. január 1.;199:49–58. Elérhető: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415011670>
27. Sun XF, Sun, Fowler P, Baird MS. Extraction and Characterization of Original Lignin and Hemicelluloses from Wheat Straw. *J Agric Food Chem*. 2005. február 1.;53(4):860–70.
28. Chen H. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In: *Biotechnology of Lignocellulose* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. o. 25–71. Elérhető: https://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6898-7_2
29. Cullen D, Kersten P. Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In: *Applied molecular genetics of filamentous fungi*. 1992. o. 100–31.
30. Dollhofer V, Podmirseg SM, Callaghan TM, Griffith GW, Fliegerová K. Anaerobic fungi and their potential for biogas production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015;151:41–61.
31. Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol* [Internet]. 2003;2(12):602–19. Elérhető: <http://www.academicjournals.org/AJB>
32. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2014. január;42(D1):D490–5.
33. Solomon K V., Haitjema CH, Henske JK, Gilmore SP, Borges-Rivera D, Lipzen A, és mtsai. Early-branching gut fungi possess large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. *Science* (1979). 2016. március 11.;351(6278):1192–5.
34. Lillington SP, Chrisler W, Haitjema CH, Gilmore SP, Smallwood CR, Shutthanandan V, és mtsai. Cellulosome localization patterns vary across life stages of anaerobic fungi. *mBio*. 2021. június 1.;12(3).
35. Solomon K V., Henske JK, Theodorou MK, O'Malley MA. Robust and effective methodologies for cryopreservation and DNA extraction from anaerobic gut fungi. *Anaerobe* [Internet]. 2016. április 1.;38:39–46. Elérhető: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996415300846>
36. Raghothama S, Eberhardt RY, Simpson P, Wigelsworth D, White P, Hazlewood GP, és mtsai. Characterization of a cellulosome dockerin domain from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Nat Struct Biol*. 2001. szeptember 1.;8(9):775–8.
37. Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, és mtsai. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* (1979). 2007. február 9.;315(5813):804–7.
38. Ma Y, Li Y, Li Y, Cheng Y, Zhu W. The enrichment of anaerobic fungi and methanogens showed higher lignocellulose degrading and methane producing ability

- than that of bacteria and methanogens. *World J Microbiol Biotechnol*. 2020. szeptember 1.;36(9).
39. Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014. május;33:188–203.
 40. Mussatto SI, Fernandes M, Milagres AMF, Roberto IC. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb Technol*. 2008. augusztus;43(2):124–9.
 41. Youssef NH, Couger MB, Struchtemeyer CG, Liggenstoffer AS, Prade RA, Najar FZ, és mtsai. The Genome of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* sp. Strain C1A Reveals the Unique Evolutionary History of a Remarkable Plant Biomass Degradation. *Appl Environ Microbiol*. 2013. augusztus;79(15):4620–34.
 42. Couger MB, Youssef NH, Struchtemeyer CG, Liggenstoffer AS, Elshahed MS. Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. strain C1A. *Biotechnol Biofuels*. 2015. december 8.;8(1):208.
 43. Chung D, Cha M, Guss AM, Westpheling J. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. június 17.;111(24):8931–6.
 44. Berg B, McClaugherty C. Decomposer Organisms. In: *Plant Litter*. Cham: Springer International Publishing; 2020. o. 45–65.
 45. Lankiewicz TS, Choudhary H, Gao Y, Amer B, Lillington SP, Leggieri PA, és mtsai. Lignin deconstruction by anaerobic fungi. *Nat Microbiol*. 2023. március 9.;8(4):596–610.
 46. McSweeney CS, Dulieu A, Katayama Y, Lowry JB. Solubilization of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Appl Environ Microbiol*. 1994. augusztus;60(8):2985–9.
 47. Trinci APJ, Davies DR, Gull K, Lawrence MI, Bonde Nielsen B, Rickers A, és mtsai. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol Res [Internet]*. 1994. február;98(2):129–52. Elérhető: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756209801780>
 48. Saye LMG, Navaratna TA, Chong JPJ, O'Malley MA, Theodorou MK, Reilly M. The Anaerobic Fungi: Challenges and Opportunities for Industrial Lignocellulosic Biofuel Production. *Microorganisms [Internet]*. 2021. március 27.;9(4):694. Elérhető: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/4/694>
 49. Demment MW, Van Soest PJ. A Nutritional Explanation for Body-Size Patterns of Ruminant and Nonruminant Herbivores. *Am Nat [Internet]*. 1985. május;125(5):641–72. Elérhető: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/284369>
 50. Hobson PN, Wallace RJ, Bryant MP. MICROBIAL ECOLOGY AND ACTIVITIES IN THE RUMEN: PART 1. 1982;
 51. Puniya AK, Salem AZM, Kumar S, Dagar SS, Griffith GW, Puniya M, és mtsai. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant

- productivity: A review. Köt. 14, Journal of Integrative Agriculture. Editorial Department of Scientia Agricultura Sinica; 2015. o. 550–60.
52. Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH, és mtsai. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. Sci Rep. 2015. október 9.;5.
 53. Lin KW, Patterson JA, Ladisch MR. Anaerobic fermentation: Microbes from ruminants. Enzyme Microb Technol [Internet]. 1985. március;7(3):98–107. Elérhető: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022985901371>
 54. Knapp JR, Laur GL, Vadas PA, Weiss WP, Tricarico JM. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. Köt. 97, Journal of Dairy Science. Elsevier Ltd; 2014. o. 3231–61.
 55. Swift CL, Louie KB, Bowen BP, Hooker CA, Solomon K V., Singan V, és mtsai. Cocultivation of Anaerobic Fungi with Rumen Bacteria Establishes an Antagonistic Relationship. Taylor JW, szerkesztő. mBio [Internet]. 2021. augusztus 31.;12(4). Elérhető: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01442-21>
 56. Hooker CA, Lee KZ, Solomon K V. Leveraging anaerobic fungi for biotechnology. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2019. október;59:103–10. Elérhető: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166918301484>
 57. Kazemi Shariat Panahi H, Dehghani M, Guillemin GJ, Gupta VK, Lam SS, Aghbashlo M, és mtsai. A comprehensive review on anaerobic fungi applications in biofuels production. Science of The Total Environment. 2022. július;829:154521.
 58. Vinzelj J, Joshi A, Insam H, Podmirseg SM. Employing anaerobic fungi in biogas production: challenges & opportunities. Bioresour Technol. 2020. március;300:122687.
 59. Mountfort DO, Asher RA, Bauchop T. Fermentation of Cellulose to Methane and Carbon Dioxide by a Rumen Anaerobic Fungus in a Triculture with *Methanobrevibacter* sp. Strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. Appl Environ Microbiol. 1982. július;44(1):128–34.
 60. Thomas Bauchop, Douglas O. Mountfort. Cellulose Fermentation by a Rumen Anaerobic Fungus in Both the Absence and the Presence of Rumen Methanogens. Köt. 42, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 1981.
 61. Mountfort DO, Asher RA, Bauchop T. Fermentation of Cellulose to Methane and Carbon Dioxide by a Rumen Anaerobic Fungus in a Triculture with *Methanobrevibacter* sp. Strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1982. július;44(1):128–34. Elérhető: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.44.1.128-134.1982>
 62. Gordon GLR, Phillips MW. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. Nutr Res Rev. 1998. június 14.;11(1):133–68.
 63. Cheng YF, Edwards JE, Allison GG, Zhu WY, Theodorou MK. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on

- lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresour Technol.* 2009. október;100(20):4821–8.
64. Hess M, Paul SS, Puniya AK, van der Giezen M, Shaw C, Edwards JE, és mtsai. *Anaerobic Fungi: Past, Present, and Future.* Köt. 11, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2020.
 65. Teunissen MJ, Kets EPW, Op Den Camp HJM, Huis In't Veld JHJ, Vogels GD. Effect of coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminants with methanogenic bacteria on cellulolytic and xylanolytic enzyme activities. Köt. 157, *Arch Microbiol.* 1992.
 66. Marvin-Sikkema FD, Richardson AJ, Stewart CS, Gottschal, ' And JC, Prins' RA, Bryant MP. Influence of Hydrogen-Consuming Bacteria on Cellulose Degradation by Anaerobic Fungi Organisms. *M. smithii* PS was provided by. Köt. 56, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* 1990.
 67. Jin W, Cheng YF, Mao SY, Zhu WY. Isolation of natural cultures of anaerobic fungi and indigenously associated methanogens from herbivores and their bioconversion of lignocellulosic materials to methane. *Bioresour Technol.* 2011. szeptember;102(17):7925–31.
 68. Hobson, Stewart, Peter N., Colin S., eds. *The Rumen Microbial Ecosystem* [Internet]. Springer Science & Business Media; 1988. Elérhető: <http://www.thomson.com>
 69. Fonty G, Joblin KN. Rumen Anaerobic Fungi: Their Role and Interactions with Other Rumen Microorganisms in Relation to Fiber Digestion. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* [Internet]. Elsevier; 1991. o. 655–80. Elérhető: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780127022901500333>
 70. Joblin KN, Naylor GE, Williams AG. Effect of *Methanobrevibacter smithii* on Xylanolytic Activity of Anaerobic Ruminant Fungi. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1990. augusztus;56(8):2287–95. Elérhető: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.56.8.2287-2295.1990>
 71. Roger V, Bernalier A, Grenet E, Fonty G, Jamot J, Gouet P. Degradation of wheat straw and maize stem by a monocentric and a polycentric rumen fungi, alone or in association with rumen cellulolytic bacteria. *Anim Feed Sci Technol.* 1993. június;42(1–2):69–82.
 72. Paul SS, Deb SM, Punia BS, Singh D, Kumar R. Fibrolytic potential of anaerobic fungi (*Piromyces* sp.) isolated from wild cattle and blue bulls in pure culture and effect of their addition on *in vitro* fermentation of wheat straw and methane emission by rumen fluid of buffaloes. *J Sci Food Agric.* 2010. május;90(7):1218–26.
 73. Paul SS, Kamra DN, Sastry VRB, Sahu NP, Agarwal N. Effect of administration of an anaerobic gut fungus isolated from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) to buffaloes (*Bubalus bubalis*) on *in vivo* ruminal fermentation and digestion of nutrients. *Anim Feed Sci Technol.* 2004. július;115(1–2):143–57.
 74. Lee SS, Ha JK, Cheng KJ. Relative Contributions of Bacteria, Protozoa, and Fungi to *In Vitro* Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions. *Appl Environ*

- Microbiol [Internet]. 2000. szeptember;66(9):3807–13. Elérhető: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.66.9.3807-3813.2000>
75. Gruninger RJ, Puniya AK, Callaghan TM, Edwards JE, Youssef N, Dagar SS, és mtsai. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): Advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. FEMS Microbiol Ecol. 2014. október 1.;90(1):1–17.
 76. MIAH MS, TADA C, SAWAYAMA S. Enhancement of Biogas Production from Sewage Sludge with the Addition of *Geobacillus* sp. Strain AT1 Culture. Japanese Journal of Water Treatment Biology. 2004;40(3):97–104.
 77. Cheng Y, Shi Q, Sun R, Liang D, Li Y, Li Y, és mtsai. The biotechnological potential of anaerobic fungi on fiber degradation and methane production. Köt. 34, World Journal of Microbiology and Biotechnology. Springer Netherlands; 2018.
 78. Saxena S, Sehgal JP, Puniya AK, Singh K. Effect of administration of rumen fungi on production performance of lactating buffaloes. Benef Microbes. 2010;1(2):183–8.
 79. Dey A, Paul Sehgal J, Kumar Puniya A, Singh K, Author C. Influence of an Anaerobic Fungal Culture (*Orpinomyces* sp.) Administration on Growth Rate, Ruminal Fermentation and Nutrient Digestion in Calves. Asian Aus J Anim. 2004;17(6):820–4.
 80. Peng X, Swift CL, Theodorou MK, O'Malley MA. Methods for Genomic Characterization and Maintenance of Anaerobic Fungi. In: Methods in Molecular Biology [Internet]. 2018. o. 53–67. Elérhető: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7804-5_5
 81. Kopečný J, Zorec M, Mrázek J, Kobayashi Y, Marinšek-Logar R. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. Int J Syst Evol Microbiol. 2003. január 1.;53(1):201–9.
 82. Suksong W, Kongjan P, Prasertsan P, O-Thong S. Thermotolerant cellulolytic Clostridiaceae and Lachnospiraceae rich consortium enhanced biogas production from oil palm empty fruit bunches by solid-state anaerobic digestion. Bioresour Technol. 2019. november;291:121851.
 83. Van GYLSWYK NO. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a Ruminal Bacterium Converting Succinate to Propionate as the Sole Energy-Yielding Mechanism. Int J Syst Bacteriol [Internet]. 1995. április 1.;45(2):297–300. Elérhető: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-45-2-297>
 84. Van GYLSWYK NO, HIPPE H, RAINEY FA. *Schwartzia succinivorans* gen. nov., sp. nov., Another Ruminal Bacterium Utilizing Succinate as the Sole Energy Source. Int J Syst Bacteriol. 1997. január 1.;47(1):155–9.
 85. Rea S, Bowman JP, Popovski S, Pimm C, Wright ADG. *Methanobrevibacter millerae* sp. nov. and *Methanobrevibacter olleyae* sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. Int J Syst Evol Microbiol. 2007. március 1.;57(3):450–6.

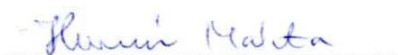
86. Leahy SC, Kelly WJ, Altermann E, Ronimus RS, Yeoman CJ, Pacheco DM, és mtsai. The Genome Sequence of the Rumen Methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* Reveals New Possibilities for Controlling Ruminant Methane Emissions. PLoS One. 2010. január 28.;5(1):e8926.

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Huszár Márta** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott „**A lignocellulóz hasznosítás fokozása a bendőben és a biogáz fermentorban lévő anaerob gombák, metanogének és baktériumok közötti szintrófikus kölcsönhatások révén**” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértke (ötfokozatú skálán jellemezve)
<i>Mintavétel, tápoldat elkészítése</i>	4
<i>A mikrobák tenyésztésére használt rendszer megtervezése és kivitelezése</i>	3
<i>Mérések kivitelezése</i>	3
<i>Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)</i>	3
<i>DNS izolálás</i>	3
<i>Az adatok statisztikai feldolgozása</i>	4

Kelt: Szeged, 2024.11.10.



Pályamunkát benyújtó hallgató (*Huszár Márta*)

aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (*Petróné Dr. Kovács Etelka*, SZTE TTIK

Biotechnológiai és Mikrobiológiai tanszék)

aláírása

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni, Dr. Rákhely Gábor tanszékvezető úrnak, hogy lehetőséget biztosított, hogy a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszékén dolgozhassak és elkészíthessem a tudományos diákköri dolgozatomat. Továbbá köszönöm Dr. Kovács L. Kornél professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy csatlakozzam az anaerob gombákkal foglalkozó kutatáshoz, és köszönetet szeretnék mondani a tanszék munkatársainak segítségükért, különösen Juhász-Erdélyi Annabellának és témavezetőmnek Petroné Dr. Kovács Etelkának, akik a segítségen kívül rengeteg hasznos tanáccsal láttak el, amiért nagyon hálás vagyok. Szeretnék még köszönetet mondani Dr. Wirth Rolandnak a metagenom elemzésért, valamint Dr. Maróti Gergelynek és Farkas Attilának, akik segédkeztek a SEM képek elkészítésében.