

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai Tanszék

Biomérnök Bsc IV. évfolyam

Biológia TDK 2014, Őszi forduló

**Újgenerációs alga alapú biohidrogéntermelési
módszer fejlesztése**

**(Development of a novel method of algae-based biohydrogen
production)**

Készítette

Dorogházi Beáta

Témavezető: Dr. Maróti Gergely kutatásvezető

(MTA SzBK, Biokémiai Intézet)

Belső konzulens: Dr. Rákhely Gábor egyetemi docens

2014

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés	4
1.1. Korunk energiahelyzete	4
1.2. A napenergiában rejlő megoldások.....	5
1.3. Az algák adta lehetőségek.....	6
1.3.1. A hidrogén jelentősége korunk és jövőnk számára	8
1.4. A Biohidrogén előállítása	9
1.4.1. Hidrogenázok	9
1.4.2. Alga alapú biohidrogén termelés	11
1.4.3. A hidrogéntermelés megvalósításának eszközei, a fotobioreaktorok.....	14
1.4.4. Biohidrogén termeltetési módszerek	15
2. Célkitűzés	18
3. Anyagok és módszerek.....	19
3.1. Tiszta és kevert kultúrák növesztése.....	19
3.2. Természetes baktérium fertőzés vizsgálata.....	22
3.3. Alga és baktérium sejtszám meghatározás	22
3.4. Gázkromatográfiás analízis.....	22
3.5. Oldott oxigén koncentráció mérése	23
3.6. Az ecetsav analitikai mérése	23
4. Kutatómunkám eredményei.....	24
4.1. A megfelelő törzsek kiválasztása.....	24
4.2. Alga-baktérium keverékek hidrogéntermelése	25
4.2.1. Három természetes bakteriális partner hatása az alga hidrogéntermelésére.....	25
4.2.2. Oldott oxigén koncentráció mérése	27
4.2.3. A hidrogéntermelő konzorciális partner meghatározása vad és hidrogenáz defficiens baktérium törzsek használatával	28

4.3.1. Alga sejtszám vizsgálat tiszta és kevert kultúrákban.....	30
4.3.2. Bakteriális sejtszám vizsgálat tiszta és kevert kultúrákban	31
4.4. Ecetsav hatásának vizsgálata	32
5. Összefoglalás.....	34
6. Irodalomjegyzék	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
7. Köszönetnyilvánítás	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
8. Nyilatkozat	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
9. Mellékletek jegyzéke.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Korunk energiahelyzete

Napjaink ütemesen fejlődő világában egyre égetőbb problémává válik a megfelelő energiamennyiség előállítása. A jelenlegi színvonal fenntartásához és fejlesztéséhez elengedhetetlen a biztonságos energiaellátás megteremtése, ami így egyre sürgetőbb és megkerülhetetlen feladattá válik, hiszen elengedhetetlen az ipar, a háztartások, a mezőgazdaságok, az infrastruktúra és még számos ágazat számára.

A globális energiafelhasználást 2008-ban évi $5,1 \times 10^{20}$ Joule-ra becsülték (IEA, 2010), azonban ez az érték fokozatosan növekszik. Az IEA 2010-es becslése szerint 2030-ra 44%-kal fog növekedni, ami évi $7,4 \times 10^{20}$ Joule energiamennyiséget jelent.

A természet védelme mellett az élhetőbb, tisztább és biztonságosabb környezet kialakításának érdekében hatékonyabb energiatermelésre és kifinomult felhasználásra van szükség. A jelenleg nagymértékben használt fosszilis energiaforrások mennyisége végesnek tekinthető és az ipari felhasználásuk sem feltétlenül megfelelő hatásfokkal bír. A modern hőerőművek is mindössze körülbelül 40%-os hatásfokkal teljesítenek, ezért célszerű az olyan megoldások kutatása, ahol az energiaforrás állandó megléte és használhatósága mellett a hatékonyság is magas fokú.

Napjaink egyre növekvő energiaigénye két okra vezethető vissza:

- A fejlődő országok jelenleg a világ teljes energiafelhasználásából csak mintegy 20 – 25 %-ban részesednek, miközben népességük a világ népességének 75 - 80 %-át teszi ki. Folyamatos fejlődésükhöz - részesedésük arányában – az idő előrehaladtával egyre több és több energiára lesz szükségük. (Halász J., 2007)
- A világ népessége 50 év alatt a statisztikák szerint megduplázódik. A népesség növekedése döntő mértékben a fejlődő országokban megy végbe. Ez a körülmény a fejlődés fenntartásához szükséges energiaigényeket még inkább növelni fogja. (Halász J., 2007)

A jelenleg nagy számban alkalmazott fosszilis energiaforrások használatakor nem csak a kimerülés veszélyével állunk szemben, hanem az egyre inkább megmutatkozó környezetszennyezési problémákkal is. Azért, hogy Földünk a jövő generációi számára is élhető, tiszta és biztonságos legyen, és hogy lépést tarthassunk az egyre növekvő népességgel és kockázataival fejlettebb energiafelhasználásra lesz szükségünk.

Megoldásként előtérbe kerülnek a megújuló energiaforrások, Nap-, szél-, vízenergia, melyek számos új lehetőséggel kecsegtetnek.

1.2. A napenergiában rejlő megoldások

Az energiaforrásokat két csoportra oszthatjuk, a kimerülő és a megújuló energiaforrásokra (1.2.1. ábra). A primer energiafajták legnagyobb részének ősforrása a Nap, kivéve a nukleáris energiának, mert a hasadóanyagok a Naprendszer kialakulása előtti magreakciók következményeképpen jöttek létre.

Kimerülő energiaforrások	Megújuló energiaforrások
<i>Kémiai (fosszilis) tüzelőanyagok</i> kőszén kőolaj földgáz egyéb éghető anyagok	<i>Napenergia</i> napsugárzás (közvetlen hőhasznosítás) fotoszintézis: biomassa – növényi eredetű tüzelő és motorhajtó anyagok mikrobiológiai reakciók: biogáz szél
<i>Nukleáris üzemanyagok</i> hasadóképes anyagok fűzőképes anyagok	felszíni vízfolyások tengeri áramlások, hőfokkülönbségek és hullámozás
<i>Geotermikus energia</i> konvektív hőhordozók kőzetek hőtartalma	<i>Gravitációs energia</i> ár-apály energia

1.2.1. ábra: Energiaforrások (Halász J., 2007)

A napsugárzásból érkező energia évente körülbelül 5×10^{24} Joule-ra tehető (Miyamoto, 1997), ami körülbelül 11000-szerese a 2008-ban mért energiafelhasználásnak. Ebből adódóan érdemes lenne ennek a területnek a kiaknázása, kutatások folytatása azért a célért, hogy minél több lehetőség nyíljon ennek a nagy mennyiségben jelen lévő energiának a hatékony felhasználására.

A Nap által kisugárzott energia hasznosítása történhet közvetlenül, a napenergia passzív építészeti hasznosításával, napkollektorok alkalmazásával, az óceánok termikus hőhasznosításával, naperőművek (naphőerőművek és napkéményes erőművek) létesítésével. Ezek mellett felhasználhatjuk tengervíz-sótalanítók és víztisztítók működtetésére vagy hasznosíthatjuk akár a naptavakban rejlő hő energiáját is (1.2.1. ábra).

A fotovillamos effektus kihasználásával pedig napjaink szinte egyik legnépszerűbb, leggyakrabban használt energiafajtáját, az elektromos áramot is elő tudjuk állítani napelemek segítségével.

További lehetőséget jelent a közvetett hasznosítás, tehát a napenergia révén kialakuló kinetikai energiaforrások felhasználása, például a szél- és vízenergia. Továbbá egy viszonylag új, különleges terület, a fotoszintézis során keletkező biomassa energetikai célú hasznosítása. Külön lehetőségeket nyitnak azok a fény energiáját hasznosítani képes mikrobák, melyek a fényenergia felhasználása révén magas energiatartalmú vegyületeket tudnak felhalmozni, mint például a fototróf baktériumok (zöld- és bíborbaktériumok, cianobaktériumok, halobaktériumok) és az algák.

1.3. Az algák adta lehetőségek

Az algák immár 4 milliárd éve jelen vannak a Földön, hiszen rendkívül jó túlélő szervezetek. Jól tudnak alkalmazkodni az állandóan változó környezethez és az új körülmények között is képesek a gyors biomassa képzésre. Fotoszintézisük során a napfény energiáját kémiai energiává alakítják át. Mind a szerves mind a szervetlen anyagokból, mint például a nitrogén, foszfor, kén, stb. szerves anyagokat tudnak képezni. Létezik olyan algafajta is, amely napfény nélkül képes a szerves anyag szintézisére, például a *Navacula* algafaj tagjai képesek glükóz tápanyagforrás jelenlétében fény hiányában is nőni (Lewin J.C., 1953). Továbbá fel tudják használni a szén-dioxidot tápanyagforrásként és abból egyszerű cukrokat és oxigént képezni, ezáltal képesek az üvegházhatást ellensúlyozni.

A napenergia begyűjtésére alkalmas zöld mikroalgákat több évtizede alkalmazzák már kereskedelmi termelésre, ugyanis képesek az elhasznált, legalacsonyabb energiájú (zéró-energiájú) szénforrásokat (pl.: CO_2) hasznosítani és nagy sűrűségű lipidekké redukálni, vagyis természetes olajat képezni. Ez a magas energiatartalmú olaj-produktum alapanyaga lehet a biodízelgyártásnak, ezáltal a szén-dioxid újrahasznosítására is megoldást jelenthet. Jelenleg közel háromszáz olyan algafaj ismert (pl. *Amphora*, *Cymbella*, *Nitzschia*, *Chlorella* fajok), amelyek jelentős olajtartalommal rendelkeznek, teljes sejttömegüknek akár felét is olajok alkothatják (Mark Edwards, 2008).

Bizonyos algafajok, például a *Spirulina platensis* emberi fogyasztásra alkalmas élelmiszer alapanyaga is lehet, így az ilyen algák felhasználhatóak egészséges emberi vagy

állati táplálékként, de étrend-kiegészítők előállítása céljából végzett, fotobioreaktorokban történő növesztésük is fontos alkalmazási területnek mutatkozik.

Számos természetes színezőanyag is kinyerhető különböző fajtáikból. Ennek legismertebb példája a karotinoidok: az asztaxantin, amely a *Haematococcus pluvialis* mikroalgában található és a β -karotin, melyek természetes színezőanyagok és fontos szerepük lehet az egészségmegőrzésben is (Ohgami K., 2003). (A β -karotin a szemünk éleslátásához elengedhetetlenül szükséges A-vitamin előanyaga, mely hiánya következtében alakul ki a farkasvakság illetve egyéb látásproblémák is visszavezethetők a vitamin hiányára. Az asztaxantin pedig egy piros-narancssárgás színű páratlan antioxidáns, ami 50-szer erősebb, mint a béta-karotin, 60-szor erősebb, mint a C-vitamin és 550-szer erősebb, mint az E-vitamin (Ohgami K., 2003)).

Mindezek mellett előállíthatóak velük biopolimerek, terápiás szerekben használt proteinek, mint például vakcinák, antitestek és a kozmetikai ipar számára is hasznos egyéb értékes molekulák. Rengeteg faj ismert még az antioxidánsokat, telítetlen zsírsavakat, különböző vitaminokat, rákmegelőző anyagokat és antivirális molekulákat termelő képességükről.

Az algasejtek általában akkor termelik az értékes metabolitokat, ha valamilyen stressz éri őket. Stressz faktor lehet a nem megfelelő pH, a magas sótartalom, az alacsony hőmérséklet és a különböző tápanyagokban szegény környezet (Skjanes és mtsai., 2013; Shuangxiu és mtsai., 2012).

Mindemellett amennyiben a környezetük hirtelen anaerobbá válik számos algafaj képes áttérni egy alternatív anyagcsereútra és O_2 helyett H_2 -t termelni, mely a jövő fő energiaforrásává válhat.

A biofotolitikus folyamataik előnye, hogy nincs szükség drága és ritka fémekre a katalizáláshoz. Emellett lehetőség nyílik más folyamatokkal történő összekapcsolásra, kezdve a szennyvízkezeléstől, a vizek sómentesítési folyamatán és a nehézfém eltávolításon keresztül a gyógyszerészeti készítmények elkészítésig. A leginkább számottevő előny azonban az, hogy lehetőséget adnak egy környezetbarát, tiszta energiahordozó, a már említett biohidrogén előállítására.

A tiszta biohidrogén egy grammja 122 kJ energiamennyiséget hordoz magában (Guan Y. F. és mtsai., 2004), de emellett még jelentősebb tulajdonsága az, hogy égése során semmiféle káros, környezetszennyező anyag nem képződik, helyettük mindössze vízgőz keletkezik.

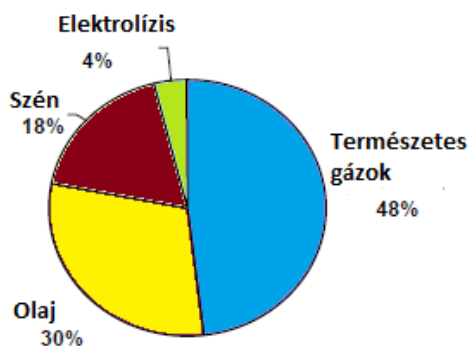
1.3.1. A hidrogén jelentősége korunk és jövőnk számára

Napjainkban gyakran hallhatjuk a hidrogénforradalom kifejezést, mely egy olyan új energiahordozóra utal, ami környezetünkben nagy mennyiségben van jelen, ugyan jórészt kötött formában, de rendkívüli hatékonysággal állíthatunk elő vele energiát és mindemellett felhasználása környezetkímélő is. Energetikailag többféle módon hasznosítható: termikus égetésével alkalmazható hőerőművek működtetésére, alkalmazhatjuk motorhajtóanyagként és mindezek mellett üzemanyagcellákban történő felhasználásával hálózati elektromos áram is előállítható vele (Halász J., 2007).

A hidrogén nem energiaforrás, hanem energiahordozó, hiszen más forrásokból kell előállítanunk, ugyanis molekuláris állapotában, szabadon csak nagyon kis mennyiségben fordul elő, aminek oka a rendkívüli reakcióképessége.

Kötött formájában azonban óriási mennyiségben rendelkezésre áll. Alkotórésze a víznek, földgáznak, kőolajnak, a legtöbb szervesanyagnak, jóformán bárhol megtalálható. 1 kilogrammjának fűtőértéke 143 MJ, ami háromszorosa a benzin és ötszöröse az etanol fűtőértékének (Steven J. Burgess és mtsai., 2011).

Előállítása többféleképpen megvalósítható, például szénelgázosítással, földgáz vízgőzös reformálásával, vízelektrolízissel üzemanyagcellákban, fotolízissel a napenergia felhasználása révén vagy akár hidrogéntermelő mikroorganizmusokkal. Energiatöbblet nélkül, spontán módon, fémek és savak illetve lúgok reakciója során keletkezhet, ez azonban ipari méretekben megvalósíthatatlan (Boetius, H., 2006). Jelenleg az ipari előállítása legfőképpen fosszilis energiaforrásokból történik, így a hidrogén csak másodlagos energiahordozó és sajnos rengeteg fosszilis energiaforrást használnak fel az előállításához (1.3.1.1. ábra).



1.3.1.1. ábra: Hidrogéntermelés napjainkban (Halász J., 2007)

A fenntartható fejlődés érdekében hosszú távú megoldást jelenthetne a Nap kimeríthetetlen energiájának hatékonyabb hasznosítása hidrogéntermelő mikrobákkal, zöld algákkal. Ezen organizmusok képesek a fényenergia által a II. fotokémiai rendszerükben generált elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszportláncon keresztül speciális enzimmolekulák, a hidrogenázok felé irányítani és ezek segítségével hidrogént előállítani.

1.4. A Biohidrogén előállítása

A biológiai úton előállított hidrogén jelentősége abban rejlik, hogy az előállításához megújuló energiaforrást használhatunk, ami alapján egy sokkal kedvezőbb, a fenntartható fejlődés feltételeinek is megfelelő energiaellátást dolgozhatunk ki. Számos olyan mikroorganizmus létezik, melyeknek anyagcsere és energiatermelő folyamataikban a hidrogén fontos szerepet játszik. Hidrogénfelvevő és/vagy termelő képességekkel rendelkeznek, ezáltal lehetőségünk nyílik alkalmazni őket a biohidrogén előállítási folyamataiban. A hidrogéngáz termelése biológiai úton direkt és indirekt biofotolízissel, sötét illetve fotofermentációval, illetve ezek kombinációival történhet, de minden esetben a katalizáló enzimektől függ.

1.4.1. Hidrogenázok

A biológiai hidrogéntermelést egyaránt katalizálhatja a nitrogenáz és a hidrogenáz enzim is. A nitrogenáz alapvetően a nitrogén ammóniává történő redukálásáért felel és főleg baktériumokban fordul elő. Az enzim főként a környezeti hatások változásánál előnyös a mikrobák számára és fotoheterotróf körülmények között képes melléktermékként hidrogént is előállítani. Azonban ez a folyamat sokkal energiaigényesebb, mint a hidrogenáz enzimekkel működő anyagcsereút, ezért a kutatásokban nem célszerű ezekkel az enzimekkel foglalkozni.

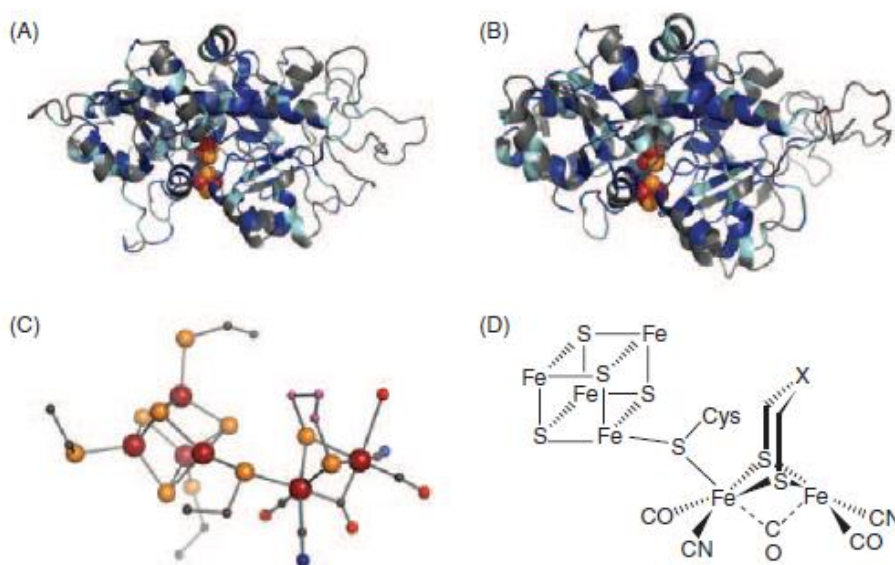
Sokkal jobb eredmények érhetők el a hidrogenáz enzimekkel, melyek széles körben elterjedtek a mikroorganizmusok között és működésük során a hidrogén reverzibilis oxidációját katalizálják: $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.

Az enzim két típusa ismert, a [NiFe]- és a [Fe]-hidrogenáz, attól függően, hogy milyen fémeket tartalmaznak az aktív centrumokban.

Érdekes, hogy az eukarióta zöld algák [Fe]-hidrogenázt használnak, míg a prokarióta cianobaktériumokban csak a [NiFe]-hidrogenáz fordul elő. Utóbbi a hidrogén felvételét,

míg a zöld algákban előforduló enzim a hidrogén gáz fejlődését katalizálja. Az aktív centrumukhoz, a vas atomokhoz a biológiailag újszerű szén-monoxid [CO] és cianid [CN] ligandumok tudnak kötődni, mégpedig mindkét két-magvú aktív centrumnál.

A [Fe]-hidrogenázok gyakran két izoformában – HYDA1 és HYDA2 – fordulnak elő. Szintézisük a citoszolban található riboszómákon történik, majd a kloroplaszt sztrómájába transzlokálódnak, ahol az aktivitásuk is megnyilvánul.



1.4.1.1. ábra: A *Chlamydomonas* fajokban található [Fe]-hidrogenázak struktúrája. A rész: HYDA1-es izoforma, B rész: HYDA2-es izoforma, C rész: A H-klaszter aktív centrumának labda-pálcika modellje: pirossal a vas atomok, narancssárgával a kén atomok, feketével a szén atomok, kékkel a nitrogén atomok és halványpirossal az oxigén atomok vannak jelölve. D rész: a H-klaszter sematikus ábrája. [forrás: Stern, D. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook Volume 2.: Organellar and metabolic processes, Academic Press, USA., 221.o.]

Az enzim katalitikus centrumát H-klaszternek nevezzük (az 1.4.1.1-es ábra A és B részén narancssárga-piros jelöléssel látható) és egy vas-kén [4Fe-4S] csoportot tartalmaz, amihez 4 cisztein aminosav kötődése mellett egy cisztein-tiolát is kapcsolódik hídkötéssel. Így egy egyedi binukleáris vas [2Fe] centrum alakul ki, ahová az elektrontranszport közvetlenül a ferredoxin molekulák segítségével történik. Feltehetően az odaérkező elektronok duplán redukálják a két vasból álló centrum távolabbi atomját, s ezt a redukált formát a szén-monoxid [CO] és a cianid [CN] ligandumok képesek stabilizálni (Ghirardi, M. 2007; Stern, D. 2009).

Ezek a ligandumok a binukleáris vascentrum mindkét vas atomjához képesek kapcsolódni. Az enzim nyugalmi állapotában egy harmadik szén-monoxid ligandum is kapcsolódik, mely mindkét vas atommal képes hídkötést kialakítani. Az egyedi nem fehérje típusú

ditiolát vegyület a ditiolmetil-amin avagy ditiolpropán (Nicolet és mtsai., 2001) szintén képes a két vasatom aktív oldalához kötődni.

A hidrogenáz enzimek a fotoszintézis egyik fő termékének, az oxigénnek a jelenlétében erősen gátoltak. Ebből kifolyólag az elterjedt direkt fotoszintézis helyett célszerű más anyagcsereutak használatával működő mikrobákat alkalmaznunk, ugyanis így kiküszöbölhetővé válhat a hidrogenáz enzimgátlás problémája.

Alkalmas mikrobának bizonyul számos baktériumfaj, melyek az indirekt fotoszintézist, fotofermentációt vagy a sötét fermentációt alkalmazzák anyagcseréjük során. Rajtuk kívül az egyszerű eukarióta élőlények, mint a zöld algák is nagyszerű lehetőségekkel kecsegtetnek, ugyanis számos fototróf víz-oxidáló algafaj képes a fotoszintetikus elektrontranszportláncból alacsony potenciálú elektronokat hidrogénné redukálni. Közülük az egyik legtöbbet kutatott és legjobban leírt algafaj a *Chlamydomonas*.

1.4.2. Alga alapú biohidrogén termelés

Az alga alapú hidrogéntermeléshez rendszerint édesvízi algafajokat használhatunk, de a tengeri fajokkal is megvalósítható a termelés, melyek energiaforrásként a napenergia szolgál. Jelenleg a leginkább használt fajok a *Chlamydomonas reinhardtii*, a *Scenedesmus obliquus* és a *Chlorella fusca* (Zhang W. és Chen Z., 2007; Guan Y. F. és mtsai., 2004; Ran C. Q. és mtsai., 2006). Az alga alapú hidrogéntermelés leginkább használt modellorganizmusa a *Chlamydomonas reinhardtii*. A 10 µm-es sejtek könnyen felismerhetőek a mozgásukhoz és szexuális életciklusukhoz használt két flagellumukról.

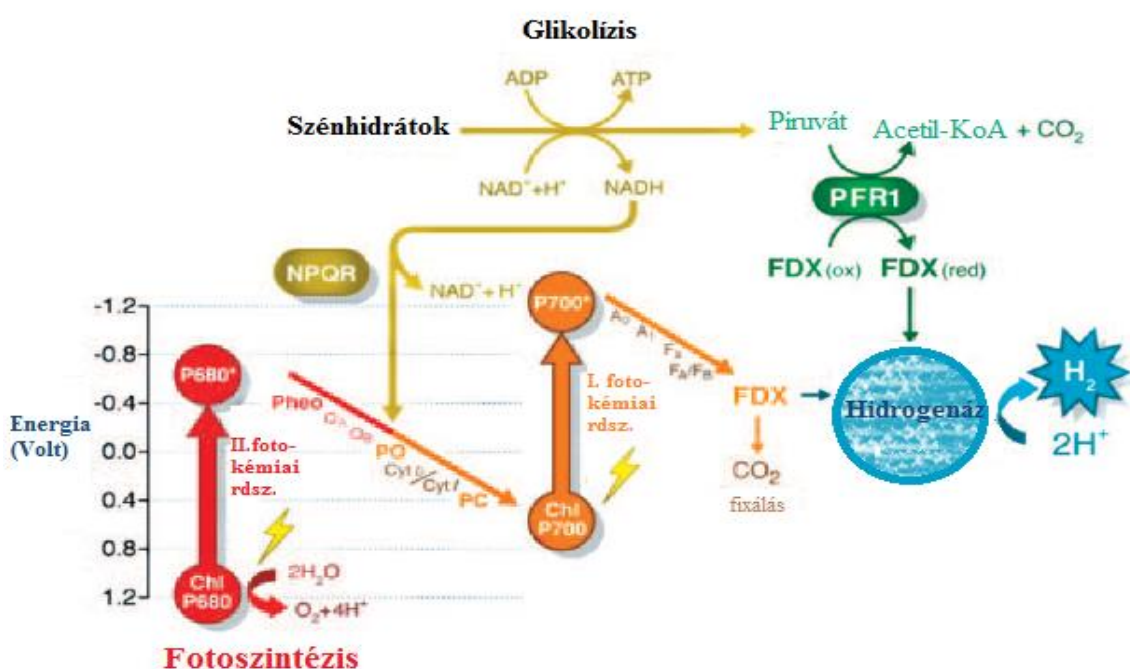


1.4.2.1. ábra: *Chlamydomonas reinhardtii* mikroszkópos képe (forrás: http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/C_reinhardtii.html)

A szexuális reprodukció lehetőséget ad különböző mutánsok létrehozása által történő genetikai vizsgálatokhoz. Lehetőség van különféle toleráns mutánsok kifejlesztésére, melyekkel hatékonyabb termelés valósulhat meg. Például a magasabb

hőmérsékletet jobban tűrő fajtával lehetőség nyílna az alga sivatagi termelésére, ezáltal nem kellene a különböző mezőgazdaságilag termesztett növényekkel és ipari létesítményekkel a megvalósításhoz szükséges területekért versengenie (Ugwu és mtsai., 2008).

A *Chlamydomonas reinhardtii* hidrogéntermelő képességét először Hans Gaffron és munkatársai írták le a harmincas évek végén (Gaffron és mtsai., 1939). A hidrogéntermelés a *Chlamydomonas* törzzsel három különböző módon valósulhat meg, két fotoszintetikus illetve egy sötét fermentációs úton.



1.4.2.2. ábra: A hidrogén termelés lehetséges útvonalai [forrás: Stern, D. (2009): The Chlamydomonas Sourcebook Volume 2.: Organellar and metabolic processes, Academic Press, USA., 219.o.]

- Direkt fotolízis: Hasonló folyamat, mint a növények, az algák illetve bizonyos cianobaktériumok (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Calothrix* és *Gloeocapsa*) (Pinto F. A. L., 2002) által is végzett fotoszintézis, ugyanis első lépésként napenergia felhasználásával vízbontás megy végbe.

A vízbontást a PSII katalizálja ennek során oxigén és hidrogén keletkezik és ezek mellett elektronok szabadulnak fel.

A negatív töltéssel rendelkező elektronok innen a PSI-re (I. fotokémiai rendszerre) jutnak, majd a fotoszintetikus elektrontranszportláncon redukálják a ferredoxin molekulákat,

amelyek a hidrogenáz enzimekhez szállítják a felvett elektronokat. A hidrogenáz enzimben az érkező elektronok két protont redukálnak, ezáltal H₂ gáz keletkezik.



Azonban a hidrogenáz enzimek már nagyon kis mennyiségű oxigénre is érzékenyek és jelenlétükben nem működnek, ezért ez a folyamat általános körülmények között nem, csak anaerob környezetben képes lejátszódni. A reakció elméletben maximális hatásfokkal alakítja át a fényenergiát hidrogénné, de mivel aerob környezetben az oxigén irreverzibilisen inaktiválja a [Fe]-hidrogenáz enzimeket, amint a sejtek oxigéntermelésbe kezdenek és az oxigénszint eléri a küszöbértéket a hidrogén termelése azonnal leáll. A direkt biofotolízis így csak a keletkező hidrogén és oxigén folyamatos elvezetésével fotobioreaktorokban valósulhat meg (Burgess, S. és mtsai., 2011; Demirbas, A. és mtsai., 2010).

- Indirekt fotolízis: Az indirekt fotolízis folyamatában a hidrogén és oxigén termelése elkülönül, nem egy időben zajlik. Először a fényindukált CO₂ fixálás (12H₂O + 6CO₂ + fényenergia → C₆H₁₂O₆ + 6O₂) során a sejt a számára szükséges anyagokat állítja elő, többek között glükózt, ami később hidrogéntermelésre fordítható. A glükózból történő H₂ előállításához szintén fényenergiára és vízre van szükség: C₆H₁₂O₆ + 12H₂O + fényenergia → 12H₂ + 6CO₂ (S. Manish és Rangan Banerjee, 2007).

- Sötét fermentáció: A harmadik lehetőség a fermentatív útvonal, mely fény nélkül a szénhidrátlebontással (C₆H₁₂O₆ + 12H₂O → 2CH₃COOH + 4H₂ + 2CO₂) van összekapcsolva. A folyamathoz egyszerű szénhidrát szubsztrátok szükségesek, mint a glükóz, szukróz, cellulóz és egyéb szénhidrátok, melyek könnyen és nem túl drágán elérhetőek. Az algákban zajló sötét fermentáció hasonlóan működhet, mint ahogy az anaerob baktériumoknál (Saint A. és mtsai., 2001) vagy mint a mitokondriummal nem rendelkező eukarióta fajokban zajló fermentációs folyamatok során (Dyall és mtsai., 2004). Az alga sejtek keményítő tartalékai a fotoszintetikus aktivitás során autofermentáción mehetnek keresztül, mely következtében nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) és piruvát keletkezik. Mindkét molekula képes az oxidációjuk során elektront biztosítani a hidrogén keletkezéséhez. A kloroplasztiszba jutó piruvát felhasználásával a ferredoxin oxidoreduktáz képes sötétben és fényben is redukálni a kloroplasztisz sztrómájában található ferredoxint, ami így már képes elektronokat biztosítani a hidrogenáz enzimnek. A folyamat közben CO₂ és acetilkoenzimA keletkezik. A NADH oxidációját a tilakoid membránhoz kötött II.-es típusú NADH-dehidrogenáz enzim végzi. A leadott elektronokat

a plasztokinonra vezeti, ahonnan a fotoszintetikus elektrontranszportláncon keresztül a ferredoxin molekulára jutnak és redukálják azt, innen pedig a hidrogenáz enzimekre juthatnak az elektronok (Shuangxiu Wu és mtsai., 2012). Számos mezofil, termofil és fakultatív termofil baktérium is használható a folyamathoz, azonban a prokarióták [Ni-Fe]-hidrogenáza kevésbé hatékony, mint a jellemzően eukarióták által használt [Fe]-hidrogenáz.

A hidrogén a vízből napenergia felhasználásával könnyen kinyerhető, a folyamat energiaátalakítási hatékonysága a 80%-ot is meghaladhatja (Ley A. C. és Mauzerall D. C., 1982; Greenbaum E., 1988). Ennek ellenére a gyakorlatban ez a hatékonyság rendkívül alacsony (1.4.2.1. táblázat).

Mikroorganizmus	Fényillumináció $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	Arány (ml/l/h)	Hatásfok (%)
<i>C. reinhardtii</i> ¹¹	110	2,5	0,125
<i>C. reinhardtii</i> ¹²	100	2,8-2,9	-
<i>C. reinhardtii</i> ¹³	-	2,5	-

1.4.2.1. táblázat: Hidrogéntermelés energetikai hatékonysága algákban (Uttam Sen, 2008).

Az algasejtek genetikai tendenciája szerint a fotoszintetikus rendszerükben egyre több a foton elnyelésére képes fényelnyelő klorofill-antenna. Magas fényintenzitásnál ez a rendszer mégsem képes a rendelkezésre álló fotonok jórésztét felhasználni, így azokat hő vagy fluoreszcencia formájában kibocsátja. Ezzel magyarázható az alacsony energiaátalakítási hatékonyság, bár a folyamat még így is rengeteg előnnyel rendelkezik (Uttam Sen, 2008).

A sötét fermentáció jól alkalmazható különböző fermentorokban is, a legtöbbet használt fermentorok közé tartoznak a folyamatos keverő reaktorok és az „unflow anaerob sludge blanket” reaktorok.

Az így keletkező H_2 koncentrációja azonban csak 40-60 v/v % körül mozog, ami kevés ahhoz, hogy a megtermelt gázt tisztítás nélkül használhassák. Azonban számos mechanikai, kémiai vagy akár membránszűrős tisztítási folyamat áll rendelkezésünkre a gáz hasznosítható formába hozatalához.

1.4.3. A hidrogéntermelés megvalósításának eszközei, a fotobioreaktorok

A fotobioreaktorokat csoportosíthatjuk zárt és nyitott kiépítésük alapján. Olcsóbb nyitott berendezéseket már korábban is használtak alga biomassza termelésére és

különböző fajta zöldalgákat, például *Chlorella* és *Dunaliella* fajokat pigmentek, asztaxantin és β -karotin termelésére (Akkerman és mtsai., 2002). A nyitott rendszerek ugyan egyszerűbb felépítésűek és olcsóbbak, de ezekkel a tulajdonságokkal számos hátrány is társul. Nehezen kontrollálhatóak a folyamatok paraméterei, például: a hőmérséklet, az anyagtranszport, a gázcsere, ugyanis a keletkező gázok egy része szabadon eltávozhat, ezért jelentős veszteséggel is számolni kell (Carvalho és mtsai., 2006).

A modern fotobioreaktoroknak biztosítani kell a megfelelő környezetet az adott folyamatok és reakciók lezajlásához. Az alga alapú hidrogéntermelés esetében ez a megfelelő fénymegvilágítást, a fény eljuttatását jelenti a lehető legtöbb sejthez. Emellett fontos a felszín és a folyadékrész térfogatának aránya is. Mérhetőnek és kontrollálhatónak kell lennie a hőmérsékletnek, pH-nak, szervessav-összetételnek, a puffer-kapacitásnak a különböző tápanyagok és reakciót segítő összetevők mennyiségének és minőségének. Fontos a közeg megfelelő áramoltatása, keverése, hogy ne alakulhassanak ki eltérő összetételű fázisok, ezáltal a termelés mindenhol megfelelő hatékonysággal történhessen (Borowitzka, 1999; Posten, 2009; Tsygankov, 2001).

1.4.4. Biohidrogén termeltetési módszerek

Laboratóriumi körülmények között a hidrogéntermelés egyik leginkább kutatott módszere a kénmegvonás, ami azon alapszik, hogy kén hiányában a sejt a Calvin ciklusban működő Rubisco enzimet kezdi el lebontani, mely során elektrontöbblet keletkezik. Ez a sejt számára a szabadgyökök keletkezése miatt rendkívül káros, ezért a felhalmozódott elektronokat kénytelen egy alternatív anyagcsereúton elvezetni, mely végeredményeként hidrogéngáz keletkezik. Továbbá kénmentes körülmények között a sejtek nem képesek a fotoszintézishez szükséges D1 fehérjét sem felépíteni, így az oxigéntermelés fokozatosan csökken, majd leáll. A sejtlegzés azonban továbbra is működik, mely során elegendő mennyiségű oxigént használnak fel a sejtek, így a [Fe]-hidrogenáz enzimek aktiválódni tudnak. Azonban ilyen körülmények között más anyagcsere folyamatokhoz szükséges fehérjék sem tudnak felépülni, így a sejtek fenntartása érdekében bizonyos idő elteltével újra kén kell bevinnünk a rendszerbe. Ekkor újra a normál fotoszintetikus működés indul be.

Ebben a módszerben a hidrogéntermelés tehát szakaszosan (a kénmegvonásos és regenerációs fázis váltakoztatásával) történik. A módszer hátránya, hogy a sejtek csak 3-4 ciklust bírnak elviselni, mert a kénmegvonás végső soron csökkent ferredoxin oxidációt, a

fotoszintetikus komplex degradációját és toxikus metabolitok akkumulálását eredményezi (Melis, 2007; Terauchi és mtsai., 2009; Matthew és mtsai. 2009). A folyamat kétfázisú rendszerként működik, vagyis először fel kell növeszteni az algasejteket, majd ezután kénmentes közegbe kell őket áthelyezni. Ebből kifolyólag több tápoldatcserélés is szükséges, mely költségessé és technikailag bonyolulttá teszi a folyamatot. Mindezek következtében nagy mennyiségű, hidrogéntermelésre már nem használható biomassza keletkezik, aminek további felhasználása illetve szállítása nagyüzemi használatban problémát okozna.

A hidrogéntermelés másik ismert módszere a sötét fermentáció folyamata, melyben az aktív sejtlégzés mellett fény hiányában nincs oxigéntermelés, ezáltal a hidrogenáz enzimek aktiválódhatnak. A folyamat során keményítő lebontás történik melyből formát, acetát és etanol keletkezik, melléktermékként pedig hidrogén és széndioxid szabadul fel. A módszer hátránya, hogy a keletkező melléktermékek gátolják a termelést, így a kénmegvonás módszeréhez képest alacsonyabb hatékonysággal bír. Emellett a működtetéshez szintén kétfázisú rendszer kiépítése szükséges, mely megnehezíti és költségesebbé teszi az üzemi felhasználását.

A nyereséges biohidrogéntermelés érdekében a továbbiakban számos, a fény korlátozásával és az oxigénszint csökkentésével kapcsolatos kísérleteket végeztek. Vizsgálatokat folytattak az I. fotokémiai rendszer elektronáramlásának gátlására és a sejtlégzés folyamatainak felderítésére (Kruse és mtsai. 2005).

A fotoszintetikus folyamat korlátozására a fény ciklikus megvonása mellett genetikailag módosított algákat is létrehoztak, melyek fénybegyűjtési képességeit korlátozták (Polle és mtsai. 2003), vagy a hidrogenáz enzimek oxigénérzékenységét növelték (King és mtsai. 2006) a módosítások által.

Kawaguchi és munkatársai 2001-ben egy fotoszintézisre és hidrogéntermelésre képes *Rhodobium marinum* és *Lactobacillus amylovorus* baktériumtörzseket keverték alga biomasszához. Utóbbit azért, hogy az alga szénhidrátjait laktáttá alakítsa, ami elektrondonor szerepet tölt be a *Rhodobium marinum* hidrogéntermelési folyamataiban.

Melis és Melnicki 2006-ban *Rhodospirillum rubrum* hidrogéntermelő baktérium és fotoszintetikus hidrogéntermelő alga kevert kultúráját vetették megfigyelések alá.

Ugyanebben az évben Kim és munkatársai a *Chlamydomonas reinhardtii* algatörzset vizsgálták *Clostridium butyricum* és *Rhodobacter sphaeroides* KD131 jelenlétében. A vizsgálatok során anaerob és fotoszintetikus fermentáció során is fejlődött biohidrogén. A

megfigyelések alapján, arra következtettek, hogy a bakteriális partner segít az oxigén felhasználásában, ezáltal lehetőséget adva a hidrogenáz enzimeknek az aktiválódáshoz.

Fokozott hidrogéntermelődést figyeltek meg *Bradyrhizobium japonicum* törzsszel kevert vegyes, alga-baktérium kultúrákban is (Shuangxiu és mtsai. 2012). A *Bradyrhizobium* természetes körülmények között a szójabab szimbiontája. A növény gyökerén nodulusokat, gyökérgümőket hoz létre, melyek magas leghemoglobint tartalmaznak. A leghemoglobin oxigénaffinitása rendkívül magas, ezáltal a gümőkben alacsony oxigénkoncentráció van jelen, ami előnyös a baktérium nitrogenáz enzimeinek működéséhez. A nitrogenáz enzim révén a baktérium nitrifikációs működést folytat, mely végtermékeként nitrát és nirit keletkezik, mely értékes nitrogénforrás a gazdanövény számára, melyeket ebben a formában fel is tud venni. A növény pedig szerves tápanyagokat biztosít a baktériumsejteknek. További fokozott hidrogéntermelést és oxigénfogyasztás tudtak elérni, transzgenikus *Chlamydomonas* algákkal, melyekbe a szójabab lb apoproteinjét kódoló lba génjét ültették, mely a sejtek kloroplasztisaiban fejeződött ki (Wu és mtsai., 2010).

A bakteriális partnerrel kevert vegyes kultúrák ígéretes eredményeket hoznak. A módszer előnye, hogy természetes úton segíti az oxigén mennyiségének csökkentését, ezáltal az élő sejtek nem károsodnak. Jelen dolgozat is ezt a területet kutatja a zöld alga alapú biohidrogén termelésben elért fejlődésekre összpontosítva. A kutatások során elért eredmények talán rávilágíthatnak egy újszerű, gazdaságos energiatermelés lehetőségére, mely az ipar számára is kedvező lehetőségeket nyújthat.

2. Célkitűzés

Az aktuális energiaigények kielégítése és a fenntartható fejlődés érdekében egy jól működő, hosszú távú energiaellátási megoldásra van szükségünk. Ennek eleget tehet a hidrogén, mint energiahordozó, biológiai úton történő előállítása. A mikroalgákkal fotobiológiai hidrogéntermelés érhető el, amelyhez legnagyobb mennyiségben vízre és fényenergiára van szükség, ezáltal lehetővé teszi a Nap kimeríthetetlen energiájának hatékony hasznosítását és a környezetszennyezés visszaszorítását.

Ezen organizmusok képesek a fényenergia által a II. fotokémiai rendszerükben generált elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszportláncon keresztül speciális enzimmolekulák, a hidrogenázok felé irányítani és ezek segítségével anaerob körülmények között hidrogént előállítani. A kutatásaink során ecetsav felhasználás mellett vizsgáltuk egy alga-baktérium konzorcium hidrogéntermelését.

A téma keretében szeretnék bemutatni egy olyan kísérletsorozatot, ami napjaink aktuális problémájára keres megoldási lehetőségeket, melyek kutatásánál elengedhetetlen szempont a magas produktivitás, a hosszantartó alkalmazhatóság és egyúttal a környezetmegóvó szerep.

A kísérlet céljait az áttekinthetőség kedvéért az alábbi pontokba foglaltam:

1. Alga törzsgyűjteményből a biomassa előállításra és hidrogéntermelésre képes algatörzsek kiválasztása.
2. Az alga természetes bakteriális partnereinek izolálása és molekuláris biológia módszerekkel történő azonosítása.
3. Tiszta és kevert (alga és baktérium törzsek) kultúrák szaporítása, fenntartása.
4. Hidrogénhozam és az oxigénszint változásának detektálása a természetes és mesterséges alga-baktérium kultúrákban.
5. Oldott oxigénkoncentráció mérése a különböző tiszta és kevert kultúrákban.
6. Az ecetsav koncentráció változásának vizsgálata a hidrogéntermelés, az oxigénszint változása és a biomassa növekedése és metabolizmusa szempontjából.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Tiszta és kevert kultúrák növesztése

A kultúrákhoz szükséges algatörzseket a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdasági- és Élelmiszer-tudományi Karának kollekcijából válogattuk ki. A mosonmagyaróvári alga-kultúra kollekciónak 588 fajtát tartalmaz, így a harmadik legnagyobb talaj alga-kultúra kollekciónal rendelkezik Európában. A kiválasztott 549-es *Chlamydomonas* sp. törzset és a mellette detektált három baktérium törzset (*Rhodococcus*, *Brevundimonas*, *Leifsonia*) ampicillin, gentamicin, kanamicin, neomicin, clarithromicin, streptomycin, rifampicin, tetraciklin, nalidixic sav, spectinomycin antibiotikumokat tartalmazó TAP (tris-acetát-foszfát) és TP tápoldatos lemezekben teszteltük. A munkánk során rifampicint használtunk TP lemezen az alga törzs tisztán tartásához. A TP tápoldat egy módosított TAP tápoldat, amelyben az ecetsavat sósavval (hidrogénkloriddal) helyettesítettük. A tápoldatokat agarral szilárdítottuk és ezután szélesztettük a lemezekre a különböző algatörzseket, melyeket fénykabinban $50 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ megvilágítás mellett 25°C -on inkubáltuk.

3.1.1. ábra: 549-es *Chlamydomonas* sp. törzs TAP táptalajon.



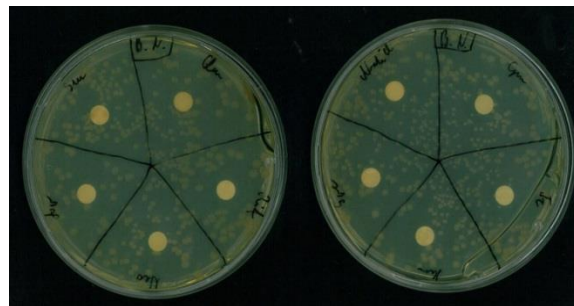
3.1.2. ábra: 549-es *Chlamydomonas* sp. törzs TP táptalajon.



3.1.3. ábra: *Rhodococcus* sp. TAP táptalajon



3.1.4. ábra: *Leifsonia* sp. TAP táptalajon



3.1.5. ábra: *Brevundimonas* sp. TAP táptalajon

A hidrogéntermelésre használandó frissen felnövesztett algákat ezután folyékony TAP törzsoldatba oltottuk át. Az alga törzsoldatot ezután 40 mL-es Hypo-Vial üvegekbe osztottuk el. Az egyes üvegek 35 mL térfogatú oldatmennyiségeket tartalmaztak, melyek optikai denzitása $OD_{750} = 0,7$ -es értékű volt.

A baktérium törzseket 1,5 %-os agarral szilárdított, Luria–Bertani Medium (LB) táptalajra szélesztve szaporítottuk 30 °C-on sötétben. A *Rhodococcus* törzsnél 2 napon belül megjelentek az első kolóniák, míg a *Brevundimonas* és *Leifsonia* törzseknél ehhez 3 nap inkubációra volt szükség. A kevert kultúrákhoz használt baktérium törzseket az agarral szilárdított LB lemezekről folyékony TAP (tris-acetát-foszfát) tápoldatba vittük át. A baktérium törzsoldatot ezután 40 mL-es Hypo-Vial üvegekbe osztottuk el, az egyes üvegek itt is 35 mL térfogatú oldatot tartalmaztak, melyek optikai denzitásai $OD_{600}=0,5$ -ös értékűek voltak.

Az alga-baktérium kultúrákat szintén 40 mL-es Hypo-Vial üvegekbe osztottuk el. Az egyes üvegek ugyanúgy 35 mL térfogatú oldatmennyiségeket tartalmaztak, melyeket szintén optikai denzitásuk alapján mértünk össze, ezek az értékek az előzőekben leírt oldatok értékeivel azonosak voltak. Az üvegeket butil gumi és alumínium-kupakok segítségével légmentesen zártuk. Minden kísérlethez három párhuzamos mintát készítettünk.

TAP tápoldat összetevői		
1 liter desztillált vízhez:	Alkotói	Koncentráció (g/L)
1. TAP sóoldatból 25 mL	NH_4Cl	15,00
	$MgSO_4 \times 7H_2O$	4,00
	$CaCl_2 \times 2H_2O$	2,00
2. Foszfát oldatból 0,375 mL	K_2HPO_4	28,80
	KH_2PO_4	14,40
3. Hutner's trace elements oldatból 1 mL		
250 mL desztillált vízben oldott	$Na_2EDTA \times 2H_2O$	50,00
200 mL desztillált vízben oldott	H_3BO_3	11,40

100 mL desztillált vízben oldott	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	22,00
50 mL desztillált vízben oldott	MnCl ₂ x 4H ₂ O	5,06
50 mL desztillált vízben oldott	CaCl ₂ x 6H ₂ O	1,61
50 mL desztillált vízben oldott	CuSO ₄ *5H ₂ O	1,57
50 mL desztillált vízben oldott	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	1,10
50 mL desztillált vízben oldott	FeSO ₄ x 7H ₂ O	4,99
4. Tris Base		2,42
5. Jégecet [1ml L ⁻¹]		
6. Szilárd táptalaj esetén:	Agar	15,00

3.1.1. táblázat: TAP tápoldat összetevői

TP minimál tápoldat összetevői		
1 liter desztillált vízhez:	Alkotói	Koncentráció (g/L)
1. TAP sóoldatból 25 mL	NH ₄ Cl	15,00
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	4,00
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,00
2. Foszfát oldatból 0,375 mL	K ₂ HPO ₄	28,80
	KH ₂ PO ₄	14,40
3. Hutner nyomelem oldatból 1 mL		
250 mL desztillált vízben oldott	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	50,00
200 mL desztillált vízben oldott	H ₃ BO ₃	11,40
100 mL desztillált vízben oldott	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	22,00
50 mL desztillált vízben oldott	MnCl ₂ x 4H ₂ O	5,06
50 mL desztillált vízben oldott	CaCl ₂ x 6H ₂ O	1,61
50 mL desztillált vízben oldott	CuSO ₄ x 5H ₂ O	1,57
50 mL desztillált vízben oldott	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	1,10
50 mL desztillált vízben oldott	FeSO ₄ x 7H ₂ O	4,99
4. Tris Base		2,42
5. Sósav (HCl)	pH 7,3 eléréséig	
6. Szilárd táptalaj esetén:	Agar	15,00

3.1.2. táblázat: TP minimál tápoldat összetevői

LB (Luria Broth) tápoldat összetevői		
1 liter desztillált vízhez:	Alkotó	Koncentráció (g/L)
Tryptone		10,00
Élesztő kivonat		5,00
Nátrium-klorid	NaCl	5,00

3.1.3. táblázat: LB (Luria Broth) tápoldat összetevői

TAP és TP tápoldat elkészítése:

A TAP sóoldatot és a foszfát oldatot a hozzávalókból a leírt arányoknak megfelelően összemérve elkészítjük. Ugyanígy a nyomelem oldatot is elkészítjük, majd a kapott elegy pH-ját kálím-hidroxiddal 7-es értékre állítjuk, az így keletkezett barna csapadékot tartalmazó oldatot hűtőben tároljuk, szűrve alkalmazzuk.

Következő lépésben desztillált vízben 2,42 g Tris Base-t feloldunk, majd az oldatokat hozzámérve fehér csapadékot kapunk. Ezt kuktában sterilezzük, majd pH-ját sósavval 7,3-ra állítjuk. Szükség esetén agar hozzáadásával szilárdítjuk a táptalajt.

3.2. Természetes baktérium fertőzés vizsgálata

A kultúráinkban fellelhető különböző baktériumok genomi DNS-ét hagyományos módszerrel izoláltuk, majd a kinyert DNS-t a 16S rDNS szekvenciák összehasonlításán alapuló PCR technikával azonosítottuk. Az amplifikációhoz az univerzális 16S rDNS specifikus primereket használtunk (f27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' és r1492 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). A PCR termékeket agaróz gélből izoláltuk, majd kapilláris Sanger szekvenálással meghatároztuk a 16S rDNS fragmentek pontos szekvenciáját. A 16S rDNS szekvenciák eredetének meghatározásához BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) homológ szekvencia keresőt alkalmaztunk.

3.3. Alga és baktérium sejtszám meghatározás

A pontos alga sejtszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg. A kultúrák egységnyi élő bakteriális sejtszámát (CFU) pedig az LB lemezekről vett minták különböző mértékben való felhígítását követően határoztuk meg.

3.4. Gázkromatográfiás analízis

A minták légterében lévő hidrogén és oxigén mennyiségét Agilent 7890A típusú gázkromatográfval mértük. A gázkromatográf hővezetési detektorral és HP-Molesieve típusú kapillárisal rendelkezik. A gázkromatográfot „splitless” módban működtettük és 50 µL térfogatú gázmintát használtunk az egyes mérések során. Vivőgázként argont használtunk. Az injektor és a TCD detektor hőmérséklete 160 °C és 150 °C volt, a

kemence pedig 60 °C-on működött. A kolonna nyomása 47,618 psi, az áramlási sebessége pedig 12 mL / perc volt Linde HQ.

A pontos gáz mennyiségének meghatározásához hidrogén és oxigén kalibrációs görbéket használtunk. A tiszta hidrogéngáz sorozatos hígítását egy 25 mL térfogatú üvegben végeztük el és azonos térfogatokat injektáltunk a gázkromatográfba. A mért mennyiségekhez használt gázkromatográf egységeket a következő képlettel alakítottuk át térfogati mennyiséggé: $x = y / 239,13$ (x: a tiszta hidrogén térfogata μL -ben, y: a gázkromatográf által mért egység). A mért értékeket egy liter térfogatú alga kultúrához viszonyítva a következő képlet alapján számoltuk át: $x = y / 239,13 \times 2857$. Az oxigén esetében a környezet oxigéntartalmához viszonyítottunk. A mért oxigén mennyiségét osztva a környezet általános oxigénmennyiségének GC egységével és szorozva az általános oxigénmennyiséggel.

3.5. Oldott oxigén koncentráció mérése

A kultúrák folyadék fázisának oxigén koncentrációját száloptikás oxigén mérővel detektáltuk 25 °C-on (Precision Sensing GmbH, Fibox 3 Minisensor Oxygen Meter). Hagyományos kétpontos kalibrációt végeztünk a kultúrák folyadék részében található oldott oxigén (1 g Na_2SO_3 100g vízben) és a légtérben található oxigén mennyiségére.

3.6. Az ecetsav analitikai mérése

Az ecetsav méréséhez nagy nyomású folyadék kromatográfot (HPLC-t) használtunk. Az eszköz Gynkotec M 480 pumpával, egy TOSOH 6040 UV detektorral (210 nm), egy 20 ml-es hurokkal rendelkező Rheodyne 8125 adagolóval és egy Aminex HPX-87H oszloppal (300 mm x 7,8 mm; 5 mm) rendelkezik (BioRad Co., USA). A mérésekhez 0,005 M H_2SO_4 mobilis fázist alkalmaztunk, melynek áramlási sebessége 600 μL / perc, 60 °C-os hőmérséklet mellett. A beinjektált minták egyenkénti térfogata 20 μL volt. Az ecetsav kvantitatív analizálásához (Sigma-Aldrich Co) 5-pontos kalibrációt használtunk. A vizsgálat során minden mintához három párhuzamos mérést végeztünk.

4. Kutatómunkám eredményei

4.1. A megfelelő törzsek kiválasztása

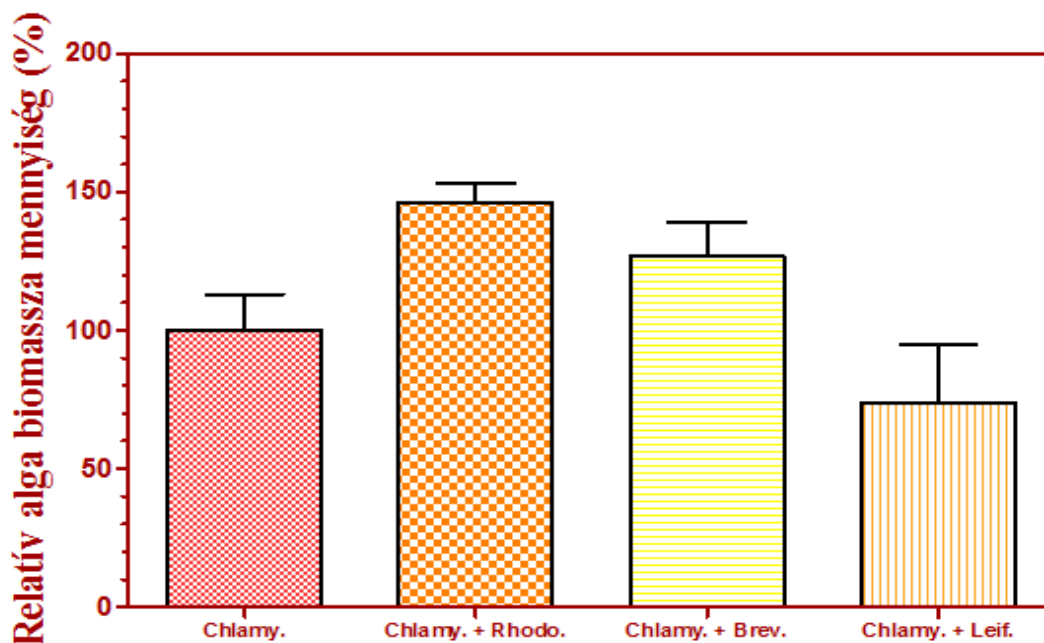
Első lépésként az alga törzsgyűjteményből biomassza termelő képesség alapján kiválasztottunk egy hidrogéntermelésre képes törzset. A fent említett szempont alapján a *Chlamydomonas* fajon belül az 549-es törzset találtuk a legalkalmasabbnak a további vizsgálatainkhoz. Ugyan nem az 549-es algatörzs volt képes a legnagyobb mennyiségű hidrogén termelésére, de ez a törzs volt az, amely bakteriális partner nélkül nem termelt hidrogént. Ebből kifolyólag ideálisnak tűnt annak vizsgálatára, hogy milyen kapcsolat van a baktériumok és az algák metabolizmusa között a hidrogéntermelés tekintetében. Valamint annak megfigyelésére, hogy mely előnyök vagy hátrányok származhatnak az együttélésből. A további vizsgálatok során sikerült a kultúrában természetes (szimbionta) baktérium partnereket is azonosítanunk, a többségük a következő törzsekbe tartoznak:

- *Rhodococcus* sp.
- *Brevundimonas* sp.
- *Leifsonia* sp.

Az algát minimál táptalajon rifampicin mellett többszörös átoltás után sikerült kitisztítanunk. A bakteriális partnereket LB táptalajon többszörös átoltás után szétválasztottuk, majd monokultúráként tartottuk fenn. Megvizsgáltuk az azonosított bakteriális partnerek hatását a biomassza növekedésére nézve.

A 4.1.1.-es ábrán jól látható, hogy a *Brevundimonas* és a *Rhodococcus* fajokkal több biomassza produkciót sikerült elérni, mint a tiszta algakultúrával. A legnagyobb biomassza termelő képessége a *Rhodococcus* sp.-vel kevert kultúrának volt, a termelt mennyiség 46%-kal nőtt. Ebből feltételeztük, hogy a kölcsönös együttélés szempontjából ez a baktériumtörzs a legelőnyösebb az *Chlamydomonas* algafaj számára. A *Brevundimonas* faj jelenlétében 26%-os növekedés zajlott, ami szintén eredményesnek mondható.

Létezik kivétel is, a jobb szélső oszlopon látható *Leifsonia* baktériumtörzzsel kevert kultúrában az alga biomassza termelés 27%-kal csökkent, tehát ez a baktérium nem elősegítette az alga sejtszám növekedését, hanem valószínűleg konkurens fajként viselkedett.



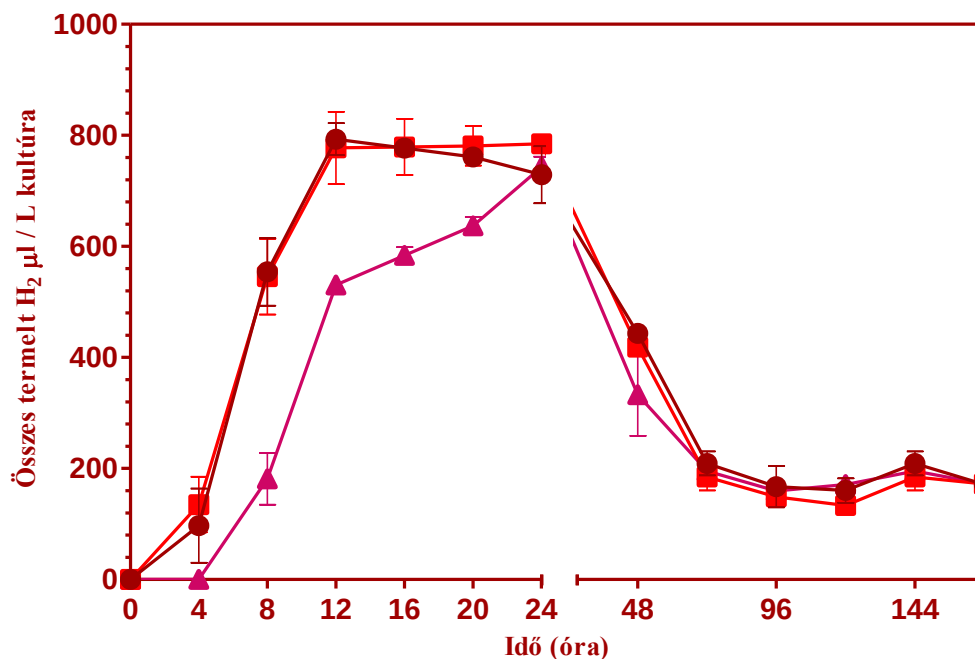
4.1.1. ábra: A *Chlamydomonas* sp. természetes bakteriális fertőzéseinek hatása az alga biotassza növekedésre és a hidrogéntermelésre.

Balról jobbra haladva a tiszta *Chlamydomonas* sp. 549, a kevert: *Chlamydomonas* sp. 549 - *Rhodococcus* sp, - *Brevundimonas* sp. és - *Leifsonia* sp. kultúrák alga biotassza növekedésének az összehasonlítása hemocytométer használatával.

4.2. Alga-baktérium keverékek hidrogéntermelése

4.2.1. Három természetes bakteriális partner hatása az alga hidrogéntermelésére

A következő kísérletsorozatban egyenként vizsgáltuk meg a detektált baktérium törzsek hidrogéntermelésre gyakorolt hatását vegyes alga-baktérium kultúrákban. A *Chlamydomonas* sp. 549 és *Rhodococcus*, *Brevundimonas* illetve *Leifsonia* bakteriális partnerekkel kevert kultúrák oxigén és hidrogén szintjét mértük. A legjobb hidrogéntermelést a *Rhodococcus* sp. és a *Brevundimonas* sp. természetes bakteriális törzsek hozzáadásával figyeltük meg (4.2.1.1. ábra).



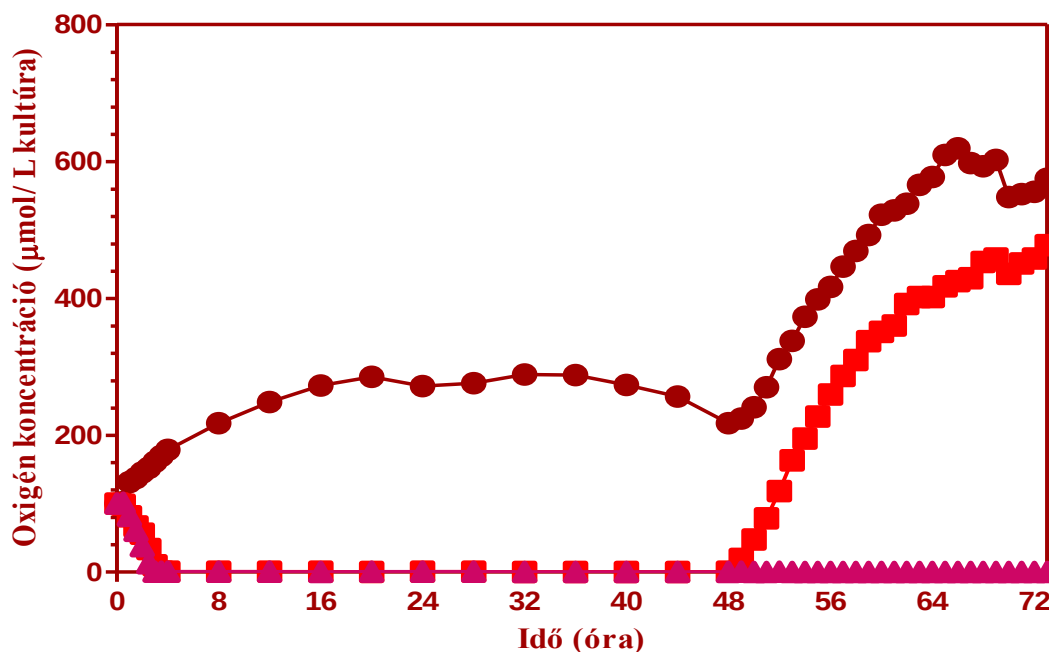
4.2.1.1. ábra: Kevert *Chlamydomonas* sp. 549 - *Rhodococcus* sp. (kör), *Chlamydomonas* sp. 549 - *Brevundimonas* sp. (négyyszög) és *Chlamydomonas* sp. 549 - *Leifsonia* sp. (háromszög) kultúrák hidrogén termelésének összehasonlítása.

A hidrogéntermelés az első 24 órában fokozatosan nőtt, azonban egy nap elteltével hidrogéngátlás lépett fel és a termelés abbamaradt. A gátlást a felhalmozódott hidrogénmennyiség okozza, ugyanis a légtérben levő hidrogén parciális nyomása olyan magas szintet ér el, ami következtében a további hidrogén képződése szükségszerűen fokozatosan lelassul, majd leáll. Továbbá egy nap elteltével az algasejtek elkezdik felhasználni a jelen lévő hidrogént, valószínűleg a metabolizmusuk megváltozása miatt. A maximumtermelést a *Rhodococcus* törzsszel kevert kultúra esetében az első 12 óra elteltével sikerült elérni, ekkor 793,153 $\mu\text{L} / \text{L}$ mennyiségű hidrogént tudtunk kimutatni. A továbbiakban pedig egy lassú, fokozatos csökkenést figyelhattunk meg. A *Brevundimonas* törzsszel kevert kultúrában szintén az első 12 óra után ért el magas értéket a termelés. Ennél a mintánál a következő 12 órában is egyenletesen megmaradt a 780 $\mu\text{L} / \text{L}$ mennyiség körüli folyamatos termelés és csak ezután kezdett csökkenni a produktum. A *Leifsonia* baktérium törzsszel kevert kultúra csak egy nap után ért el az előzőekhez hasonló 780 $\mu\text{L} / \text{L}$ értékű maximum hidrogéntermelési szintet és itt a csökkenés is hamarabb bekövetkezett. Az eddigiek alapján feltételezhetjük, hogy a legjobb baktériumpartner a *Rhodococcus* törzs, amellet, hogy ezzel a fajjal értük el az egyik legjobb hidrogéntermelést, a tenyésztése is könnyű és gyors, már egy nap alatt képesek felnőni a sejtek a lemezeken.

4.2.2. Oldott oxigén koncentráció mérése

A fényen tartott tiszta baktérium és kevert alga-baktérium kultúrák folyadékrészében az oxigén koncentráció az inkubáció kezdete után rögtön csökkenni kezdett. Már 3,5-4 óra alatt lecsökkent eléggé ahhoz, hogy a [Fe]-hidrogenázok működőképesse váljanak. A tiszta *Rhodococcus* sp. kultúrában $0,58 \mu\text{mol} / \text{L}$, míg a kevert alga-baktérium kultúrában $0,51 \mu\text{mol} / \text{L}$ oxigénkoncentrációt mértünk.

A tiszta alga kultúrában az első két nap folyamán átlagosan $208,8 \mu\text{mol} / \text{L}$ oxigénmennyiség folyamatosan jelen volt. 49 óra elteltével a tiszta alga és kevert alga-baktérium kultúrákban ez az oxigénszint intenzív növekedésbe kezdett, amit feltehetőleg az ecetsav fogyása magyarázhat. Az ecetsav szénforrásként való felhasználása során a sejtszétválás felgyorsult, a mitokondrium energiafelhasználása megnőtt, ezért több oxigént használt el a sejt, felgyorsult a sejtlégzés. Viszont az ecetsav felhasználása után a sejtek intenzív oxigéntermelésbe kezdtek. Az így kialakult magas oxigénszint a további hidrogéngáz fejlődését már nem tette lehetővé, mivel az oxigén a hidrogenáz enzimek elsődleges inhibítora. A gyors oxigén termelés után a tiszta alga kultúra oxigén szintje $619,4 \mu\text{mol} / \text{L}$ -es maximum értéken stagnált a kevert kultúrához hasonlóan. A tiszta baktérium kultúra oxigén szintje a vizsgálat során végig alacsony maradt.

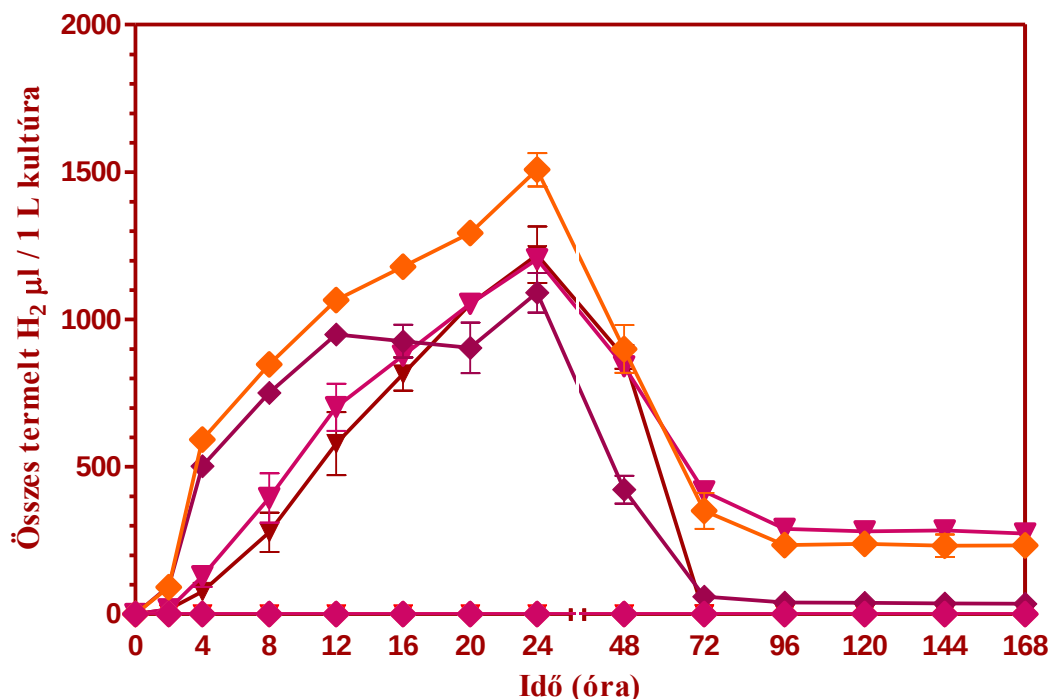


4.2.2.1. ábra: A tiszta *Chlamydomonas* sp. (kör), *Rhodococcus* sp. (háromszög) és a kevert *Chlamydomonas* sp. - *Rhodococcus* sp. (négyyszög) kultúrák oldott oxigén koncentrációjának a változása.

4.2.3. A hidrogéntermelő konzorciális partner meghatározása vad és hidrogenáz defficiens baktérium törzsek használatával

A továbbiakban megvizsgáltuk a hidrogéntermelést mesterségesen hozzáadott vad típusú *Escherichia coli* és *Ralstonia eutropha* baktérium törzsekkel, amelyeknek hidrogenáz mentes változatait is használtuk a kísérlethez. Hidrogéntermelést kizárólag csak az első 24 órában figyeltünk meg az alga törzseket is tartalmazó kultúrákban, míg a tiszta baktérium kultúrákban nem történt hidrogéntermelés. A legmagasabb hidrogénszintet (1556,40 $\mu\text{L} / \text{L}$) a *Chlamydomonas* sp. 549 - *E. coli* ΔhypF kevert kultúrában mértük. A mutáns *Ralstonia*-val kevert mintákban pedig körülbelül 1220 $\mu\text{L} / \text{L}$ mennyiségű maximális termelést tudtunk kimutatni. Egy nap elteltével a fokozott hidrogéntermelés az összes kultúrában megállt és egy folyamatos csökkenés váltotta fel. Körülbelül 72 óra elteltéig tapasztalhattuk az intenzív csökkenést, majd ezt követően körülbelül még egy napon át egy lassabb csökkenő fázist figyelhattunk meg, amit a hidrogén mennyiségének stagnálása követett. A mutáns *Ralstonia* baktériumtörzsszel kevert algakultúra 289,4 $\mu\text{L} / \text{L}$ érték körül, a mutáns *E. coli* baktériummal kevert vegyes kultúra pedig 234,7 $\mu\text{L} / \text{L}$ érték körül állandósult egészen a mérés végéig (168 óra).

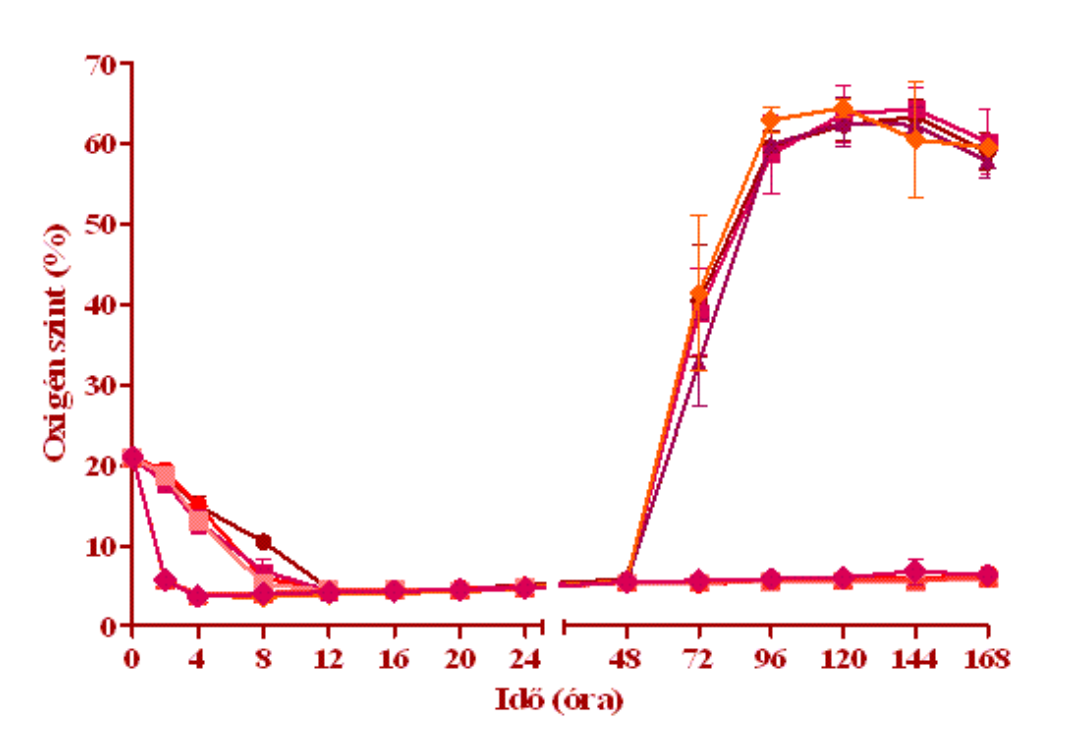
Összességében a mutáns törzsek algával kevert kultúrái nem termeltek kevesebb hidrogént, mint a vad típusú bakteriális törzseké, sőt a maximumtermelést egy hidrogenáz defficiens mutáns törzsszel érték el. A tiszta bakteriális mintáknál nem tapasztaltunk hidrogénfejlődést. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a hidrogéntermelésért az alga törzsek felelősek. A további alátámasztó kísérletekhez a mutáns *E. coli* törzset használtuk, mert ennek a hozzáadásával volt a legmagasabb az összes termelt hidrogén mennyisége (1556,40 $\mu\text{L} / \text{L}$).



4.2.3.1. ábra: Hidrogéntermelés *Chlamydomonas* sp. 549-el mesterségesen hozzáadott vad és hidrogenáz nélküli mutáns bakteriális törzsekkel. Tiszta *Ralstonia eutropha* (piros háromszög) és *Escherichia coli* (világos lila rombusz), illetve kevert *Chlamydomonas* sp. 549 - *Ralstonia eutropha* (vad: barna fordított háromszög; mutáns: rózsaszín fordított háromszög) és - *Escherichia coli* (vad: sötétlila rombusz; mutáns: narancssárga rombusz) kultúrák voltak mérve.

A mutáns baktériumtörzsekkel további kísérleteket is végeztünk az oxigénszint változására összpontosítva. Az első 24 órában a kultúrák oxigénszintje elért egy 4 % körüli szintet majd stagnálni kezdett. Ezt a szintet a leggyorsabban (8 óra alatt) a tiszta *Escherichia coli* baktérium kultúra érte el, leglassabban pedig a vad típusú *Ralstonia* H16-os baktérium törzsszel kevert vegyes kultúra. 48 óra elteltével, a baktérium törzsekkel kevert kultúrákban hirtelen intenzív oxigénszint emelkedés jelentkezett.

A legmagasabb szintet a *Chlamydomonas* sp. 549 algatörzs mutáns *E. coli* $\Delta hypF$ baktérium törzsszel kevert kultúrája érte el (64 %) a 120. órában.



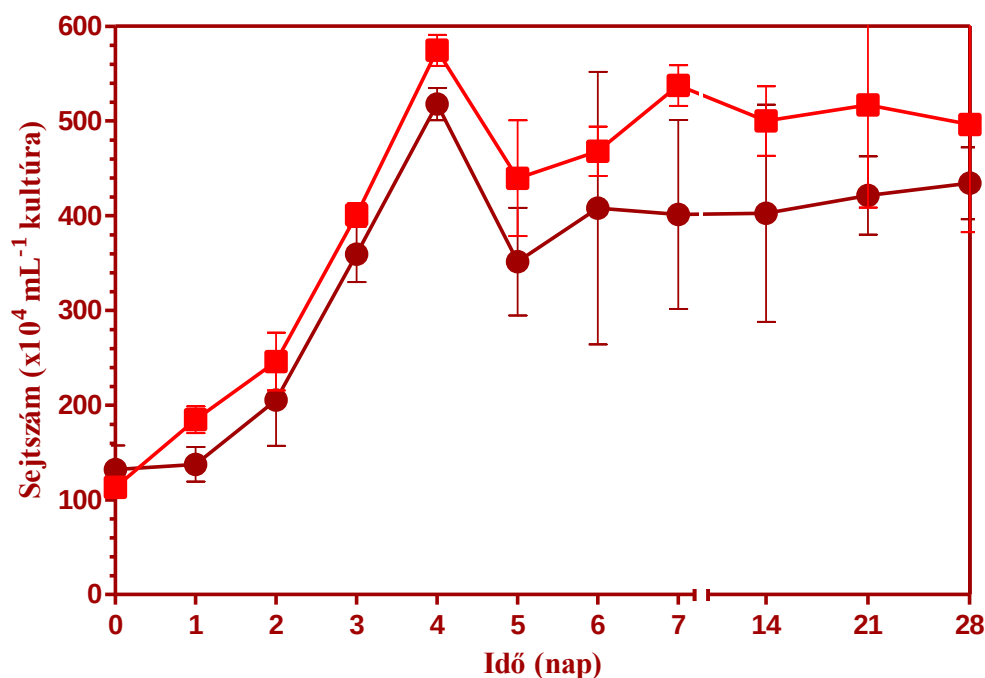
4.2.3.2. ábra: Oxigénmennyiség mérése *Chlamydomonas* sp. 549-el mesterségesen hozzáadott vad (zárt jelek) és oxigén mutáns (nyitott jelek) bakteriális törzsekkel. Tiszta *Ralstonia eutropha* (piros háromszög) és *Escherichia coli* (világos lila rombusz), illetve kevert *Chlamydomonas* sp. 549 - *Ralstonia eutropha* (vad: barna fordított háromszög; mutáns: rózsaszín fordított háromszög) és - *Escherichia coli* (vad: sötétlila rombusz; mutáns: narancssárga rombusz) kultúrákat mértünk.

4.3.1. Alga sejtszám vizsgálat tiszta és kevert kultúrákban

A mérés alatt már egy nap után sejtszámbeli különbség jelent meg a két kultúra között, ami a mérés végéig (28 nap) megmaradt. Korábbi eredményeink alapján feltételezzük, hogy a tiszta és kevert alga – baktérium kultúrák első napon megfigyelt sejtszám különbségeinek egyik meghatározó faktora lehet a *Rhodococcus* sp. jelenléte az alga mellett (4.1.1. ábra). Mindkét kultúra esetén az intenzív sejtszám növekedés 4 napig tartott (4.3.1.1. ábra). A kultúrához adott ecetsav körülbelül két nap után fogyott el a tápoldatból (4.4.1. ábra), ezt követően az alga sejtszámok még két napig nőttek mindkét kultúrában.

Feltételezéseink szerint ez a hosszantartó sejtszám növekedés az ecetsav felvétele során elraktározott tartaléktápanyagok felhasználásával függhet össze. A növekedési fázis után a sejtszámok a fennmaradó, körülbelül egy hónapon keresztül, stagnálást mutattak. Az 1 nap után jelentkező sejtszám-különbség valószínűleg azért nem emelkedik tovább, mert mint ahogy a következőkben a 4.3.2.1. ábrán látható, a bakteriális partner élő sejtszáma 1 nap elteltével intenzív csökkenésnek indul. A kevesebb baktérium sejt már nem fejt ki

olyan mértékű további pozitív hatást, mely a sejtszám-különbség növekedésében is megmutatkozna.



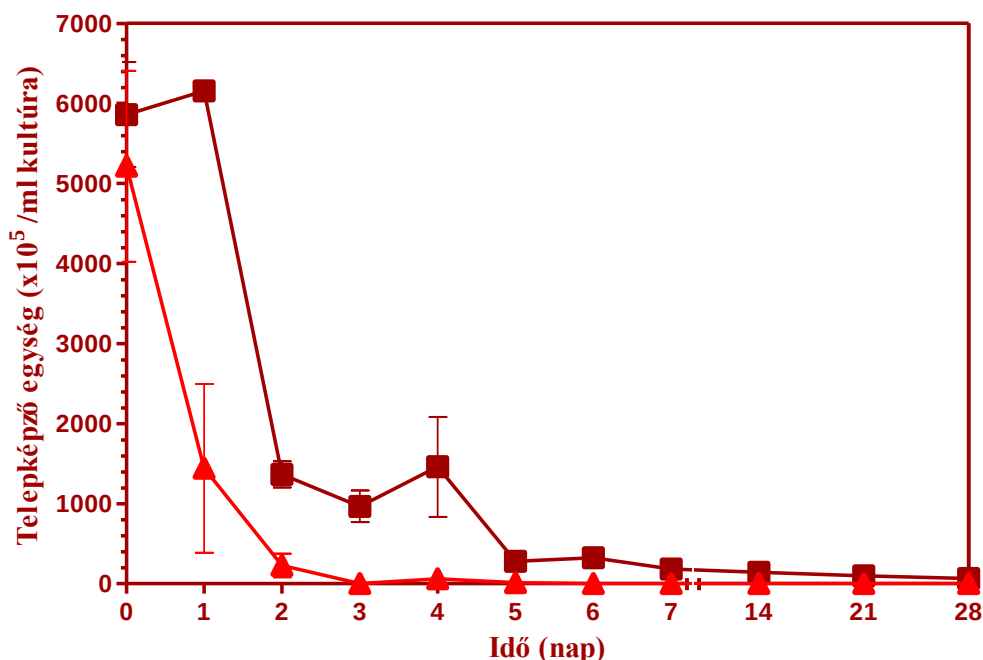
4.3.1.1. ábra: A tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 (kör) és *Chlamydomonas* sp. 549 – *Rhodococcus* sp. (négyyszög) kultúrák sejtszám változásának vizsgálata hemocytométerrel.

4.3.2. Bakteriális sejtszám vizsgálat tiszta és kevert kultúrákban

A 4.3.2.1. ábrán megfigyelhető, hogy a tiszta baktériumkultúra esetében már egy nap elteltével hirtelen csökkenés mutatkozik a sejtszám tekintetében, 5216×10^5 sejt / mL értékről $1442,6 \times 10^5$ sejt / mL értékre csökken. Ezzel ellentétben a kevert kultúra esetében 476×10^5 sejt / mL növekedés figyelhető meg.

Egy nap elteltével azonban a kevert kultúránknál is csökkenés következett be. Feltételezzük, hogy ez a hidrogéngátlás miatt az algában megváltozott anyagcsere folyamatoknak köszönhető. A harmadik és a negyedik nap között még gyenge sejtszám-növekedést figyeltünk meg, azonban ez nem volt számottevő. Ezt a változást valószínűleg az alga sejtek által elraktározott, még az ecetsav felhasználásából származó tartaléktápanyagok rendelkezésre állása okozza. Feltételezéseink szerint ezek jelenlétében az alga sejtek még képesek a bakteriális partner számára értékes tápanyagforrásokat termelni. Az ötödik nap elteltével állandósuló lassú csökkenést tapasztaltunk a mérés végéig (28 nap).

Összességében az ábra is jól szemlélteti, hogy ugyan mindkét kultúrán sejtszámbeli fogyatkozást figyeltünk meg, észrevehető azonban, hogy a vegyes kultúrában ez lassabban következett be. Míg a tiszta *Rhodococcus* minta már a hatodik napon eléri a 0 értéket, a vegyes kultúra egy milliliterjében még a 28. napon is 6600000 sejt számlálható.

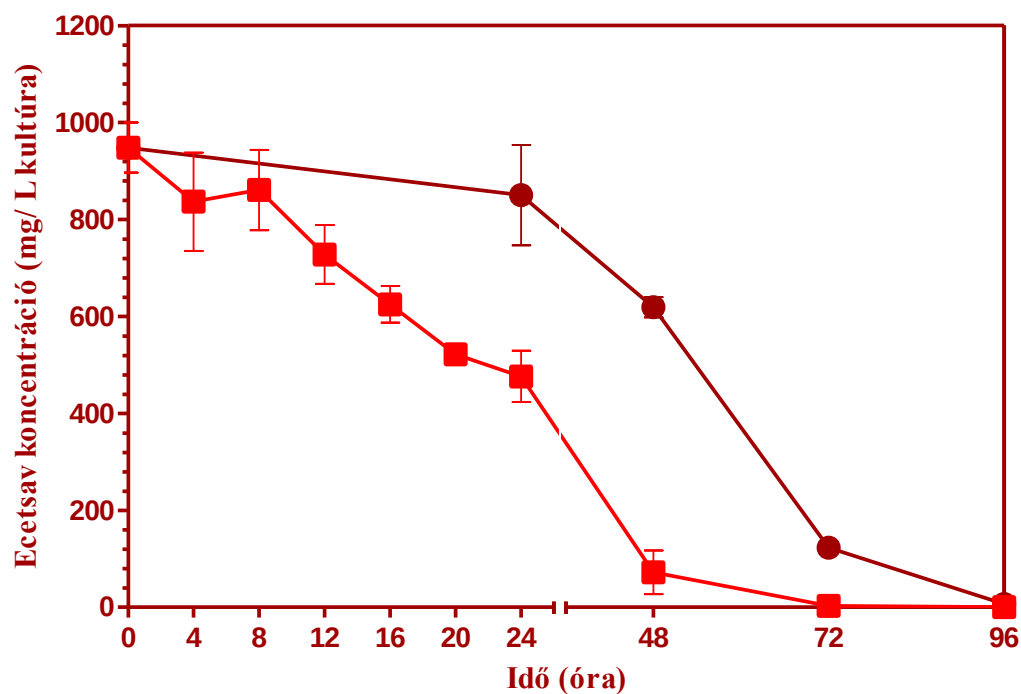


4.3.2.1. ábra: Fény jelenlétében TAP tápoldatban növesztett *Rhodococcus* sp. baktérium kultúra (háromszög) és *Chlamydomonas* sp. 549 + *Rhodococcus* sp. kevert alga - baktérium kultúra sejtszám változásainak vizsgálata.

4.4. Ecetsav hatásának vizsgálata

Az alábbi kísérletben az ecetsav fogyását vizsgáltuk meg tiszta *Chlamydomonas* 549-es algatörzsben és *E. coli* $\Delta hypF$ baktériummal kevert vegyes kultúrákban. Egy nap elteltével a tiszta *Chlamydomonas* tartalmú minta ecetsav koncentrációja keveset csökkent, 948,3 mg / L értékről 850,3 mg / L értékre. Ezzel szemben az *E. coli* $\Delta hypF$ baktérium törzsszel kevert vegyes kultúrában 4,8-szor nagyobb csökkenést láhattunk. Ennél a mintánál az ecetsav koncentráció 948,3 mg / L mennyiségről 476,3 mg / L mennyiségig csökkent. A második nap elteltével ugyanezen mintában az ecetsav mennyisége már 100 mg / L érték alá csökkent, a harmadik napra pedig szinte elérte a 2 mg / L-t. Ezzel ellentétben a tiszta algakultúrában sokkal lassabb csökkenést figyeltünk meg, még a 2. nap elteltével is 100 mg / L fölött maradt az ecetsav mennyisége (122,6 mg / L) és a teljes elfogyásához körülbelül 96 órára volt szükség.

A mérések alapján arra következtethetünk, hogy a kevert kultúrában az első nap alatt lezajló sejtszám növekedés fokozhatja a tápanyagigényt, ezáltal az ecetsav gyors felhasználását.



4.4.1. ábra: Fényen inkubált tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 (kör) és kevert *Chlamydomonas* sp.549 - *Rhodococcus* sp. (négyyszög) kultúrák ecetsav koncentrációinak változása.

5. Összefoglalás

Kutatási munkánk során igyekeztünk egy olyan biohidrogéntermelési módszert kifejleszteni, mely a jelenleg erre a célra használt módszerek hátrányait orvosolni képes. Ezáltal a későbbiekben akár a mindennapi és az ipari energiafelhasználásban is hatékonyan, hosszú távon és környezetkímélően hasznosítható lehet.

Első lépésben kiválasztottunk egy megfelelő hidrogéntermelési és biomasszaképzési tulajdonságokkal rendelkező zöldalga fajtát, a *Chlamydomonas* sp. 549 törzset.

A kísérletek során természetes bakteriális partnereket (*Rhodococcus* sp., *Brevundimonas* sp., *Leifsonia* sp.) tudtunk izolálni és azonosítani a választott algatörzs mellől, melyek hatását vizsgáltuk a hidrogénhozamra és a biomassa képzésére. Legalkalmasabbnak a *Rhodococcus* sp. baktériumtörzset találtuk, ugyanis ennek jelenlétében tudtuk a legjobb hidrogéntermelést és a legnagyobb termelt biomassa mennyiséget kimutatni. A továbbiakban a *Rhodococcus* baktériumtörzsszel vizsgáltuk a bakteriális partner hatását oxigénszint változása szempontjából, amiből arra következtethetünk, hogy a baktérium oxigén-felhasználása pozitív hatással bír a hidrogenázok aktiválódására és működésére. A kevert kultúrákban sokkal hamarabb és nagyobb mennyiségben csökkent az oxigénszint, ezáltal fokozott hidrogéntermelés vált lehetővé.

A további kísérletekben arra kerestük a választ, hogy melyik partner vesz részt a hidrogéntermelésben. A vizsgálatokhoz mesterségesen hozzáadott vad típusú és hidrogenáz defficiens *Escherichia coli* és *Ralstonia eutropha* baktérium törzseket alkalmaztunk. A legmagasabb hidrogénszintet (1556,40 $\mu\text{L} / \text{L}$) a *Chlamydomonas* sp. 549 - *E. coli* ΔhypF kevert kultúrában mértük. Így az eredmények tükrében sikerült bizonyítanunk, hogy a hidrogén gázfejlődéséért kizárólag az zöldalga faj felel. Továbbá létrehoztuk a hidrogéntermelésre legalkalmasabb konzorciumunkat.

Összefüggést találtunk a bakteriális élő sejtszám változása és a hidrogéngátlás között. A kevert kultúra bakteriális élő sejtszáma enyhe növekedést mutatott, majd csak 1 nap után, a hidrogéngátlás fellépésekor kezdett intenzíven csökkenni. Ezzel ellentétben a tiszta baktérium kultúra sejtszáma azonnal intenzív csökkenésnek indult. Feltételezéseink szerint a fényen inkubált kevert kultúrákban az alga a bakteriális partner számára felhasználható tápanyagforrást állított elő, egészen az egy nap után bekövetkező hidrogén gátlásig.

A következő kísérletekben figyeltük az algasejtek számának változását is. 4 napon át tartó fokozott növekedést tapasztaltunk, ami az ecetsav-hozzáadással is összefüggésben lehet. Bár az ecetsav már a második napon elfogyott a kultúrából feltételezzük, hogy a hosszantartó sejtszám növekedés az ecetsav felvétele során elraktározott tartaléktápanyagok felhasználásával függ össze.

Kapcsolatot tudtunk kimutatni az oldat ecetsav koncentrációja és az oldott oxigén koncentráció változása illetve a bakteriális partner jelenléte és az ecetsav fogyása között is. Feltételezhetően a bakteriális partner jelenléte fokozta az alga anyagcseréjét, ezáltal az ecetsav felhasználás felgyorsul és az oxigén felhasználása is intenzívebbé válik. A kialakuló körülmények egy sokkal hatékonyabb hidrogéntermelést tesznek lehetővé, ami egyik partnerre sem letális, tehát a módszer egy folyamatos működésre képes egyfázisú rendszer kiépítését teszi lehetővé.

Korunk energiahelyzetét tekintve egyre indokoltabbá válik a megújuló energiaforrásokon alapuló lehetőségek kihasználása, ezért úgy gondolom érdemes további kutatásokat folytatni ezen a területen és egy élhetőbb környezetet kialakítására törekednünk.