

# ***SZAKDOLGOZAT***

László Dömötör Mihály Szakdolgozat

***László Dömötör Mihály***

***2022***

*Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem*  
*Élelmiszertudományi Kar*  
*Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék*

*Lignocellulóz-bontó baktériumok izolálása és  
jellemzése papírhulladékból*

László Dömötör Mihály Szakkolgozat

*László Dömötör Mihály*

*Budapest*

*2022*

## Tartalom

1. BEVEZETÉS.....	1
2. CÉLKITŰZÉS .....	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
3.1    A lignocellulóz-bontás ipari jelentősége.....	4
3.2    A lignocellulóz előfordulása .....	6
3.3    A lignocellulóz felépítése.....	7
3.4    A lignocellulóz enzimatis bontása a természetben .....	9
3.5    Mikrobák izolálása, jellemzése, azonosításuk menete.....	16
3.5.1    Mikrobák izolálása.....	16
3.5.2    Baktériumok jellemzése és azonosítása .....	17
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	21
4.1    Új baktériumtörzsek izolálása.....	21
4.2    Hidrolitikus aktivitás tesztelése .....	22
4.3    Törzsek identifikálása .....	23
4.3.1    DNS izolálás .....	23
4.3.2    Szekvenálás.....	23
5. EREDMÉNYEK.....	25
6. ÖSSZEFOGLALÓ .....	30
Köszönetnyilvánítás.....	31
Felhasznált irodalom:.....	32
Hivatkozások jegyzéke .....	34

# 1. BEVEZETÉS

A Földön lévő biomassza több mint 80%-át a növények adják, ami becslések szerint C mennyiségben 450 gigatonnát jelent<sup>1</sup> (*Bar-on et al, 2018*). Csak Magyarországon az évente újratermelő biomassza mennyisége 105-110 millió tonna (*Réczey Istvánné Csorba K.,2012*)<sup>2</sup>. A növényi sejtek száraz tömegét szinte teljes mértékben a sejtfaluk teszi ki, ami három fő komponensből áll: 40-50% cellulóz, 15-25% hemicellulóz és 20-25% lignin, ill. 5-10%-ban egyéb sejtalkotók<sup>3</sup>. (*Ábel M., 2016*). A három fő komponens egységét hívják lignocellulóznak.

A lignocellulóz a Földön leggyakrabban előforduló polimer, emellett jelentős megújuló szénforrás. Mivel az egész Földön megtalálható, kézenfekvő alapanyag lehet olyan ipari termékek előállításához, mint a bioüzemanyag vagy bioműanyagok, amelyek napjainkban, illetve az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb figyelmet kapnak. A Föld fenntarthatóságáért aggódók rengeteg pénzt és energiát áldoznak a hagyományos, fosszilis forrásból készülő műanyagok kiváltására. Ezek a műanyagok az ötvenes években sokat javítottak ugyan az élelmiszerek csomagolási, tárolási módszerein, ám szemétként a környezetbe kerülve rendkívül károsak, miután nem képesek lebomlani, és már mindenhol jelen vannak<sup>4</sup> (*internet1*) Az Európai Unió pl. külön platformot hozott létre annak érdekében, hogy növelje a bioüzemanyagok felhasználását (Európai Bioüzemanyagok Technológiai Platform) Ma az ilyen termékek gyártásához az egyre dráguló és mennyiségében folyamatosan csökkenő kőolaj-származékokat használják. Az ezt kiváltani képes lignocellulóznak nemcsak mint nyersanyagnak van jelentősége. A természetes lebontó folyamatait tanulmányozva a tudomány új enzimrendszereket tudott átvenni és alkalmazni a technológiában.

Példaként lehet felhozni a **papíripart**, aminek az érdeklődését már a múlt évtizedben felkeltették a cellulitikus enzimek. A papír fehéritéséhez a hagyományos módszer a klóroldatok használata, melynek melléktermékei a toxikus, perzisztens és bioakkumulációra hajlamos szerves klórvegyületek, melyek kezelése költséges és nagyfokú körültekintést igényel. Xilanáz enzim használatával kiválthatóak a klór alapú fehéritési eljárások, ami kevesebb költséggel, kevesebb környezeti ártalommal és jobb minőséggel párosul.<sup>5</sup> (*internet2*)

A **textiliparban** is előszeretettel alkalmaznak celluláz enzimeket a pamutrostok utókezelésére, hogy kiváltsák a vegyszer- és energiaigényes eljárásokat. A cellulázok eltávolítják a rövid rostokat, simává és fényesebbé teszik az anyagot, növelik a nedvszívó képességet, mindezt környezetbarát módon.<sup>6</sup> (*Kuhad et al, 2011*)

A **mezőgazdaság** területén is alkalmaznak xilanázt a takarmányok előkezelésére, valamint cellulázokat mint mosószer adalék.<sup>7</sup> (*Sevella B.,2012*)

Az **élelmiszeriparban** a xilán hidrolízisével állítanak elő xilo-oligoszacharidokat, amiket széles körben használnak többek között prebiotikus, antioxidáns és antikarcinogén hatásaik miatt.<sup>8</sup> (*L. Kaprelyants, 2017*)

Ahhoz, hogy a lignocellulóiban rejlő lehetőségeket a lehető legjobban kihasználjuk, arra van szükség, hogy átfogóan megismerjük a felépítését és lebontó folyamatait, és megtaláljuk a használatukra legalkalmasabb eszközöket. Ezek az eszközök lehetnek a baktériumok és gombák, vagy enzimeik. A fentebb említett területeken már most alkalmaznak hemicelluláz és celluláz enzimeket, más területen még kiforratlan a módszer, de új enzimek és mikroorganizmusok feltárása mindkét esetben olyan újításokhoz vezethet, ami az ipar számára kedvezőbb termelési környezetet kínál, akár olyan módokon is, amire ma még nem is gondolnánk.

Munkám során papírhulladékon élő mikroba közösségből izolált baktériumokat szeretnék jellemezni, tenyésztetőségük, valamint xilán- és cellulózbontó képességük alapján.

## 2. CÉLKITŰZÉS

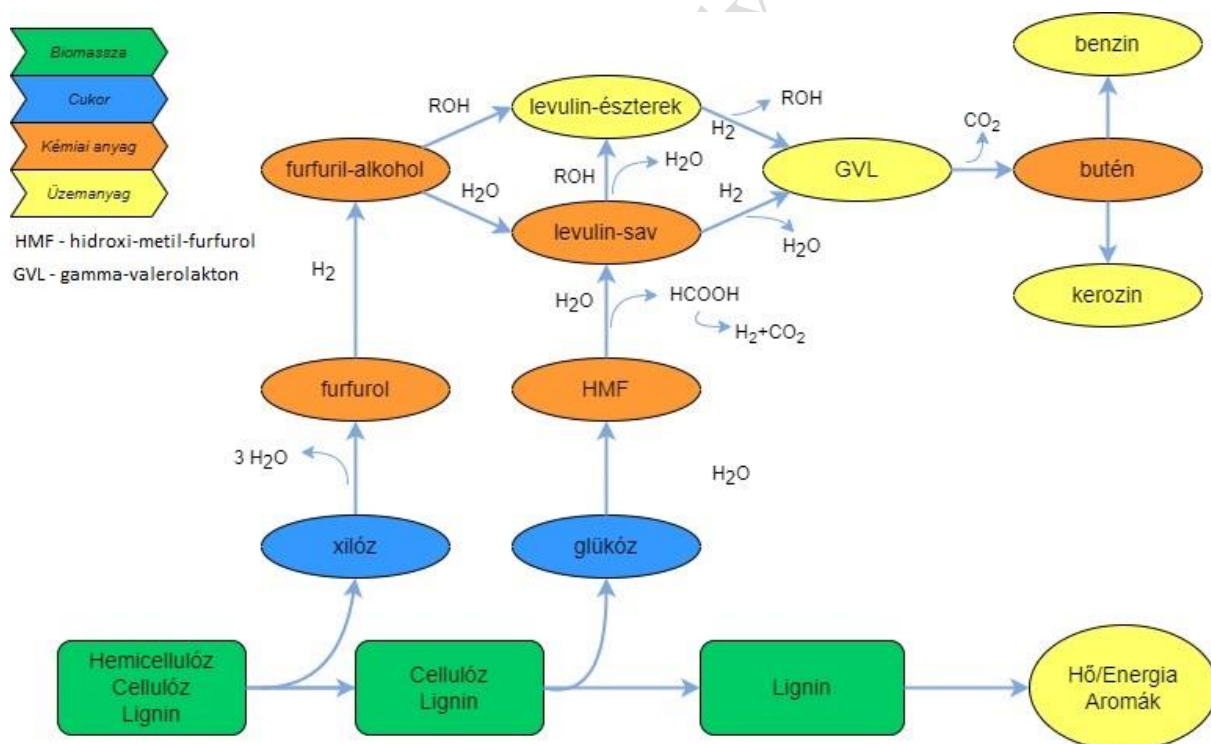
Munkám célkitűzése papírhulladékon élő mikrobaközösség feltárása és telepek izolálása. Lehetőség szerint olyan baktériumokat keresek, amik képesek a poliszacharidok biodegradációjára és folyamataik megértésével hozzájárulhatnak a biotechnológia fejlődéséhez. Az izolált telepek genetikai vizsgálataival új taxonok felfedezésére is lehetőség adódik, amivel bővíthetők a jelenlegi törzsgyűjtemények.

László Dömötör Mihály Szakdolgozat

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 A lignocellulóz-bontás ipari jelentősége

Korábban az ipar számára a hemicellulóz lebontása vagy eltávolítása, csak úgy, mint a ligniné, azért volt fontos, hogy feltárják és hozzáférhetővé tegyék a cellulózt, ami potenciális nyersanyag a bioetanol fermentációhoz. Ilyenkor különböző előkezeléseket végeznek az anyagon, ennek formája lehet fizikai, kémiai vagy biológiai alapú, illetve akár ezek együttes alkalmazása is. A fizikai módszerek általában a nyers rostok aprítását, majd vizes hőkezelését jelentik. Ekkor a lignin és hemicellulóz többsége oldatba kerül, az eljárás hatásfokát növeli, ha lúgos vagy savas katalizátort alkalmazunk. A sav a hemicellulóz, a lúg a lignin oldatba kerülését növeli. A fizikai módszereknek általában magas az energiaköltsége. A kémiai eljárások költséghatékonyabbak, de kevésbé specifikusak, kevésbé kontrollált a termékképződés és több káros melléktermékekkel járhatnak.



1. ábra: Példa a lignocellulóz lebontásával nyerhető termékekre

Mióta felismerték, hogy a lignocellulóz alapú biomassza közel 300 vegyület prekursora lehet<sup>9</sup> (internet) a tudomány máshogy közelíti meg ezt a világszerte bőségesen

előforduló alapanyagot. Míg a hemicellulóz és cellulóz egyidejű feldolgozása, például pirolízis, gyors és egyszerű felhasználást kínál, külön-külön való feldolgozásuk lehetőséget ad arra, hogy specifikusan, egyéni tulajdonságukat figyelembe véve hasznosítsuk őket. A hemicellulóz monoszacharidjait használni energiatermelésre vagy tovább alakítani más vegyületté míg a cellulóz fizikai és kémiai tulajdonságait szem előtt tartva azt a papíriparban alkalmazni, hatékonyabb megoldásnak tűnik.

A hemicellulóz kémiai eltávolításának gyakori módszere a híg savas előkezelés, amivel magas xilóz hozam érhető el. Hátránya viszont, hogy a savas környezetben a xilóz tovább hidrolizálódhat furfurollá, valamint huminok is képződhetnek. Savkatalizált hidrolízissel a cellulóz is bontható, bár ebben az esetben a hemicellulóznál magasabb koncentráció szükséges. Egy másik eljárás során a cellulózt magas hőmérsékleten kezelik híg savval, ami során a cellulózt átalakítják levulin savvá és hangyasavvá, kihagyva az intermedier glükózt és hidroximetil-furfurolt (HMF)<sup>10</sup> (S. G. Wettstein, D.M. Alonso, E. Gürbüz, J. A. Dumesic, 2012). A hemicellulózok lebontásából nyerhető monoszacharidok közül az egyik legnagyobb jelentőségű a xilóz, ami a xilitol és etanol gyártás alapanyaga is, azonban fermentációja egyelőre nehezebben kivitelezhető, mint a cellulóz bontásából származó glükóz fermentációja. A furfurol egy másik xilóz átalakításával előállítható vegyület, amit olajfinomításban, gyógyszeriparban, műanyagiparban és agrokémiai iparban használnak, xilóz alapú gyártása azonban még limitált hatékonyságú<sup>11</sup>. (P. Bajpai, 2014)

A lignocellulóz sokrétű, összetett nyersanyag, de a kutatása nem csak alapanyag mivolta miatt volt érdekes az ipar számára. Ahogy a lebontásában részt vevő enzimeket jellemezték, úgy épültek be sorra a mai iparágak alkalmazásába.

Az élelmiszeriparban, és a sütőiparban egyre elterjedtebb a lakkázok és xilanázok alkalmazása (más enzimek, például lipáz és amilázok mellett) a gyümölcslevek és tészták állagának javítására.

Az állati takarmányok enzimes előkezelésével javítható azok emészthetősége és tápértéke, ezzel emelve az állatok életminőségét és még az ellátás költségeit is csökkentheti. A monogasztrikus (egygyomrú) állatok (pl.: baromfi, sertés, ló, nyúl) nehezebben emésztik meg a magas cellulóz és hemicellulóz tartalmú takarmányt. A xilanáz és  $\beta$ -glükánáz lebontja a nehezen emészthető növényi részeket, így az állatok jobban tudják hasznosítani.



A papíriparban talán a legjellemzőbb a hemicellulázok és ligninbontó enzimek alkalmazása. A hemicelluláz és lignin lebontásával növelik a pépértékét mint alapanyag, a lakkáz enzimes fehérités pedig csökkenti, akár ki is válthatja a klórvegyületek használatát, redukálva a keletkező szennyvíz károsanyag tartalmát.

A textilipar nagy mennyiségű festéket alkalmaz a textileken, illetve vegyszert azok szintelenítésére. Az ezekkel a folyamatokkal járó szennyvíz kezelésére a jelenlegi eljárások nem nyújtanak hatékony és gazdaságos megoldást. Lakkáz enzimekkel a gyakran egészségre és környezetre is káros festékmaradékok ártalmatlaníthatóak, emellett a textil fehéritésére is alternatívát nyújtanak. A mosószerekben lévő enzimek lehasítják a sérült pamutszálakat és javítják a textil színét. Az egyik ilyen típusú enzim csoport a cellulázok<sup>12</sup>. (Couto et al, 2006), (Singh et al, 2016)

Lakkázokat sikeresen alkalmaztak a toxikus policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) lebontására bioremediációs céllal, de folynak kutatások kozmetikai céllal való használatukra, illetve a nanobiotechnológiában is mint bioszenzorok detektora<sup>13</sup> (S.R. Couto, J.L. Toca Herrera, 2006).

### 3.2 A lignocellulóz előfordulása

Minden növény sejtfala lignocellulózból áll, ami azt jelenti, hogy ahol növényi biomassa található, ott lignocellulóz is van. De nem kell az erdőkig menni, hogy növényi biomasszát találjunk. Magyarországon évente nagyjából 30 millió tonna mezőgazdasági hulladék (például kukoricaszár, fanyesedék, szalma), illetve 980 000 tonna papírhulladék keletkezik, ami mind hasznosítható a lignocellulózt feldolgozóipar számára<sup>14</sup> (internet). Lignocellulóz tartalmukat az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat:  
Lignocellulóz tartalmú nyersanyagok (forrás: Dr. Csernus O. 2021, MATE)

Nyersanyagok	Cellulóz (%)	Hemicellulóz (%)	Lignin (%)
<b>Fa apríték</b>	<b>40-50</b>	20-30	20-25
<b>Papíripari pulpok</b> „szulfitos” „fehérített”	<b>55-60</b> <b>80-85</b>	25-30 10-15	15-20 < 1
<b>Mezőgazdasági melléktermékek</b> kukorica szalma bagasz	<b>40-45</b> <b>25-30</b> <b>30-35</b>	35-40 25-30 30-35	15-20 15-20 20-25
<b>Kommunális hulladék</b>	<b>30-35</b>	20-25	< 5
<b>Tőzeg</b>	<b>15-20</b>	20-25	10-15

### 3.3 A lignocellulóz felépítése

A lignocellulóz egy kémiaiilag és mikrobiológiailag is ellenálló, fizikai megterheléssel szemben is stabil vegyület. Ellenállósága a szerkezetében, alkotóinak összetettségében és komplex összekapcsolódásukban rejlik, ami alapvetően megnehezíti az enzimek hozzáférését. A lignocellulóz három fő komponensből áll, amiknek aránya növényenként változó, de általánosságban a sejtfalak 40-50% cellulózból, 20-40% hemicellulózból és 20-30% ligninből állnak.

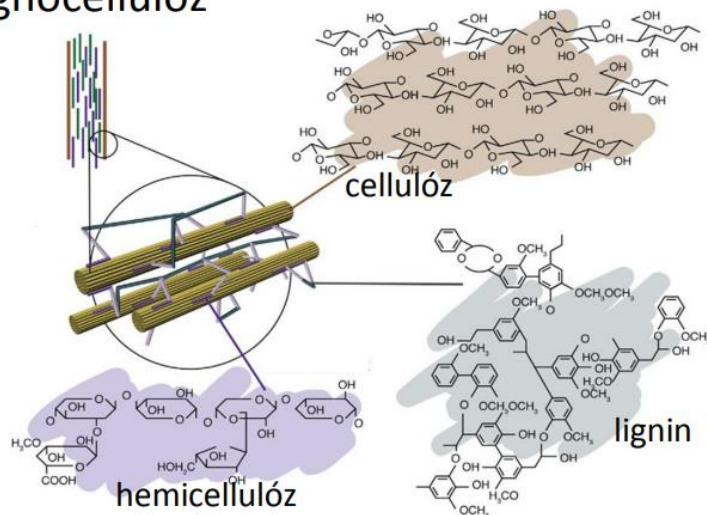
A cellulóz D-glükóz egységekből  $\beta$ -1-4 kötésekkel alkotott lineáris polimer, legkisebb szerkezeti egysége a két glükóz által alkotott cellobióz. A cellulózláncok hidrogén kötésekkel kapcsolódnak össze, mikrofibrillumokat alkotva, amiben 36 molekula fut együtt. A mikrofibrillumok kristályszerkezete egy kémiaiilag stabil, vízdoldhatatlan makromolekulát hoz létre. A magas glükóz tartalma, Földön való előfordulása és mennyisége kiválóan alkalmassá teszi etanol fermentációs alapanyagként<sup>15</sup>. (Ábel M, 2016.)

A hemicellulózok cukor monomerekből, pentózokból és hexózokból álló térhálós heteropolimerek. Pentózok között a xilóz és arabinóz, hexózok között a glükóz és mannóz a

legjelentősebb, de glükuronsav és galakturonsav is részt vesz a felépítésükben. A cellulózzal szemben szerkezetük térhálós, sok oldalláncuknak köszönhetően reaktívabb vegyületek. Elnevezésük az őket felépítő fő cukor molekuláról származik. A hemicellulózok közé tartozik a xilán, mannán, glukán, arabinán és galaktán. A természetben a hemicellulóz ritkán áll csak egyfajta monomerből. Jellemzően összetett szerkezetek, amelyek egynél több polimertől állnak, ezek leggyakrabban glükuronoxilánok, arabinoglükuronoxilánok, glükomannánok, arabinogalaktánok és galaktoglükomannánok. Hidrogén híd kötésekkel kapcsolódik a cellulózhoz, így stabilizálva a sejtfal vázát. A leggyakoribb hemicellulóz a xilán, aminek vázát D-xilóz monomerek teszik ki<sup>16</sup>. (P.Bajpai, 2014) (Megyeri G, 2019)

A lignin szintén térhálós polimer, aminek feladata, hogy növelje a sejt szilárdságát és hidrofób tulajdonságának köszönhetően megakadályozza a víz adszorpcióját a sejtbe. Szerkezetét tekintve polifenolos polimer, összetétele még azonos növények között is eltérhet, de alapvetően három alkotóeleme van: parakumaril-alkoholok, koniferil-alkoholok és szinapil-alkoholok.

## lignocellulóz



2. ábra A lignocellulóz felépítése<sup>1</sup>

forrás: [http://wwwold.bayzoltan.hu/files/uploaded/Cz%C3%A9g%C3%A9ny-Zsuzsanna\\_termikus\\_modszerek.pdf](http://wwwold.bayzoltan.hu/files/uploaded/Cz%C3%A9g%C3%A9ny-Zsuzsanna_termikus_modszerek.pdf)

### 3.4 A lignocellulóz enzimátikus bontása a természetben

#### 3.4.1 Lignocellulóz-bontó mikroorganizmusok

A növényi biomassza lebontását a természetben baktériumok és gombák végzik, trópusi területeken fontos szerepük van a természetnek, akik cellulitikus mikroorganizmusokkal élnek szimbiózisban. A kérődzők bélrendszerében szintén található nagyszámú cellulózbontó mikroba, főleg baktérium. Cellulitikus organizmusok bárhol előfordulhatnak, ahol nagyobb mennyiségű növényi biomassza található. Ilyenkor legtöbbször vegyes populációkban vannak jelen más, cellulózbontó aktivitással nem rendelkező fajokkal. Ilyen környezetben a cellulóz teljesen lebomlik széndioxidra és vízre aerob, széndioxidra, metánra és vízre anaerob környezetben<sup>17</sup> (P.Béguin, J-P. Aubert, 1993). A folyamatban résztvevő mikroorganizmusok jellemző képviselői a különböző konídiumos gombák, amelyek a magas lignin tartalmú fákat is képesek hasznosítani, enzimszintjük megismerésével már régóta foglalkozik a tudomány. A gombák mellett rengeteg cellulitikus baktériumot is azonosítottak, legismertebb képviselőjük közé tartoznak a *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Thermomonospora* és a *Microbispora* nemzetség tagjai. Kevés ismert mikroorganizmus van, ami a cellulóz teljes lebontásához szükséges enzimszinttel rendelkezik, ugyanakkor sok fajt találni, ami részleges celluláz rendszerrel bír<sup>18</sup>. (P.Béguin, J-P. Aubert, 1993) Ebből valószínűsíthető, hogy ezek a baktériumok közösséget alkotva, fajoként vagy törzsenként külön-külön a saját enzimükkel vesznek részt a cellulóz lebontásában.

Az **aerob lebontás** helyszíne többnyire a talajfelszín, ahol a biomassza felhalmozódik. Egy alaposan áttanulmányozott lignocellulóz-bontó környezet a komposzt. A komposztok kezdeti fázisában mezofil mikrobák kezdik a lebontást, majd a hőmérséklet emelkedésével a termofil baktériumok fokozatosan átveszik a főszerepet, a lignocellulóz-bontás jelentős része ebben a fázisban történik. A komposztok és általában a talajfelszín baktérium populációja igen változatos és gazdag, de a fajok közötti kölcsönhatások pontos megértése még ad feladatot a tudomány számára, mert a részt vevő mikrobáknak csak nagyon kis hányada tenyészthető és tanulmányozható<sup>19</sup>. (D.B.Wilson, 2011) A legtöbb aerob lignocellulóz-bontó mikroorganizmus a sejtfalon kívülre választja ki az enzimjét, mert a vízoldhatatlan cellulózt nem tudják a sejtmembránon keresztül a sejten belülre transzportálni<sup>20</sup>. (D.B.Wilson, 2008) Valószínű, hogy a közösség szintű lignocellulóz-bontás ezeknek az extracelluláris, szabad enzimeknek köszönhetően jön létre. Ez a tudás

megkönnyíti az azonosításukat, mivel nem kell sejtfeltárást végeznünk, hogy teszteljük az enzim aktivitásukat. Az ilyen extracelluláris cellulázoknak több típusa ismert, a cellulóz lebontására mindegyik különböző cellulázt választ ki, különlegességük, hogy mindegyik saját szénhidrát-kötő modullal rendelkezik (CBM). (Wilson,2008)

**Anaerob lebontás** többnyire növényevők bélrendszerében, trágyában, szennyvíztelepeken történik. Jellemző cellulóz- és xilánbontó baktérium az anaerob *Fibrobacter succinogenes*, illetve a *Ruminococcus* nemzetség tagjai<sup>21</sup>. (P.Béguin,J-P.Aubert, 1993) Anaerob környezetben a glükóz hasznosításából lényegesen kevesebb energia származik, mint aerob környezetben. Míg az utóbbi esetben egy mol glükóz lebontásából 38 ATP szintetizálódik, anaerob úton csupán 2-3 ATP nyerhető. Hogy ezt az energetikai hátrányt leküzdjék, a baktériumok kifejlesztettek egy különleges eszközt: a cellulozómát. A cellulozóma egy igen jól szervezett, magas hatásfokú sejt felszíni enzimrendszer. Hatékonysága abban rejlik, hogy számos enzimet képes egyszerre egy helyen alkalmazni, jelentősen felgyorsítva a lebontási folyamatokat. Az első cellulozómát a termofil *Acetivibrio thermocellus* (korábban *Clostridium thermocellum*) baktériumban fedezték fel, és későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy enzim komplexe 63 különböző enzimet tartalmaz, köztük cellulázokat és hemicellulázokat. Minden cellulozómával rendelkező baktérium cellulozóma rendszere megegyezik abban, hogy rendkívül sok, különböző enzimet foglal magába. Hogy miért van szükség ennyi enzim együttes használatára? Erre a szubsztrát, vagyis a növényi sejt fal komplexitása és változatos összetettsége lehet a válasz, hiszen mind a lignin, mind a hemicellulóz is többféle alkotóból tevődhet össze, lebontásukhoz hasonló diverzitással és sokszínűséggel rendelkező enzimrendszerek szükségesek<sup>22</sup>.(internet, internet)

Az erdők ökoszisztémájában és a tápanyagok körforgásában fontos szerepet játszanak a szaprofita gombák, amik extracelluláris enzimek széles választékát képesek előállítani, hogy még a magas lignin tartalmú, keményebb fákat is alkotóira bontsák és hasznosítsák. Hogy a lignocellulóz fizikai és kémiai védelmét leküzdjék, a gombák kétféle enzimrendszert használnak: intra- és extracellulárisat. Az extracelluláris enzimeket tovább bonthatjuk a hidrolázokra - amik a poliszacharidok lebontását végzik -, illetve a lignin- és fenolgyűrűk oxidatív lebontásáért felelős enzimekre. A lignocellulóz-bontó gombákat összefoglaló néven fakorhasztó vagy xilofág gombáknak hívják. A xilofág gombáknak három típusát kategorizálták, mindegyik külön lebontó stratégiával dolgozik.

Az egyik típus az úgynevezett „soft-rot” gombák, jellemzően a tömlősgombák törzsébe tartoznak, azon belül az *Aspergillus* és *Neurospora* nemzetségbe. Lakkáz és

peroxidáz enzimekkel módosítják a lignin szerkezetét, a fák puhulását és elsötétedését okozva. A másik két csoporthoz képest keveset tudni lignocellulóz-bontó folyamataikról.

A „brown-rot” elnevezésű gombák a bazídiumos gombák törzsébe tartoznak, elnevezésük onnan fakad, hogy gyümölcsök és fák barnás színű rothadását okozzák. A cellulózt és hemicellulózt is jó hatékonysággal bontják, a lignint ellenben nem képesek hasznosítani, minimálisan tudják csak módosítani.

A xilofág gombák harmadik csoportját az úgynevezett „white-rot” gombák alkotják, ezek rendelkeznek a leghatékonyabb enzimekkel a három típus közül. A cellulózt, hemicellulózt és a lignint is képesek lebontani, ligninolitikus enzimeikkel a lignin teljes mineralizációját elvégzik<sup>23</sup> (internet).

(<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.164>, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15487947/> )

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6999254/>)

### 3.4.2 A lignocellulóz-bontás enzimejei

#### Ligninmódosító enzimek

A lignin enzimatis lebontása eltér a lignocellulóz többi alkotójától, mert hidrolitikusan nem támadható, változatos kötésekkel rendelkezik. A lebontását végző enzimekről elmondható, hogy extracellulárisan termelődő, oxidatív reakciókat katalizáló nem specifikus fehérjék. Az egyik csoportjuk a peroxidázok, amik hidrogén-peroxid és egyéb mediátor közreműködésével oxidálják a lignint. A lignin peroxidáz (LiP) magas redox-potenciállal és alacsony pH optimummal bír, erős oxidáló szer, ami a lignin nem fenolos egységeinek bontásában vesz részt veratryl alkohol mint mediátor jelenlétében. A mangán peroxidázok (MnP) a fenolos és nem fenolos egységek oxidálásában is részt vesznek, mediátorként  $Mn^{2+}$  ionokat használva. A peroxidázok harmadik típusa a hibrid peroxidáz (VP), ami a LiP és MnP katalitikus aktivitásával is rendelkezik.

A lignin biodegradációját végző enzimek másik csoportja a polifenol oxidázok közé tartozó, réz tartalmú lakkázok. A molekuláris oxigént négy elektronos redukcióval vízzé redukálják miközben számos fenolos és nem fenolos csoport oxidálását elvégzik. A lakkázokat gombákban és baktériumokban is találtak már, a növényekben a lignin szintézisében vesznek részt.

A ligninbontó organizmusok legismertebb képviselői a gombák, de több baktérium fajnál is találtak lakkáz (*Bacillus subtilis*, *Thermus thermophilus*, *Streptomyces* nemzetség) és peroxidáz (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* nemzetség) aktivitást.

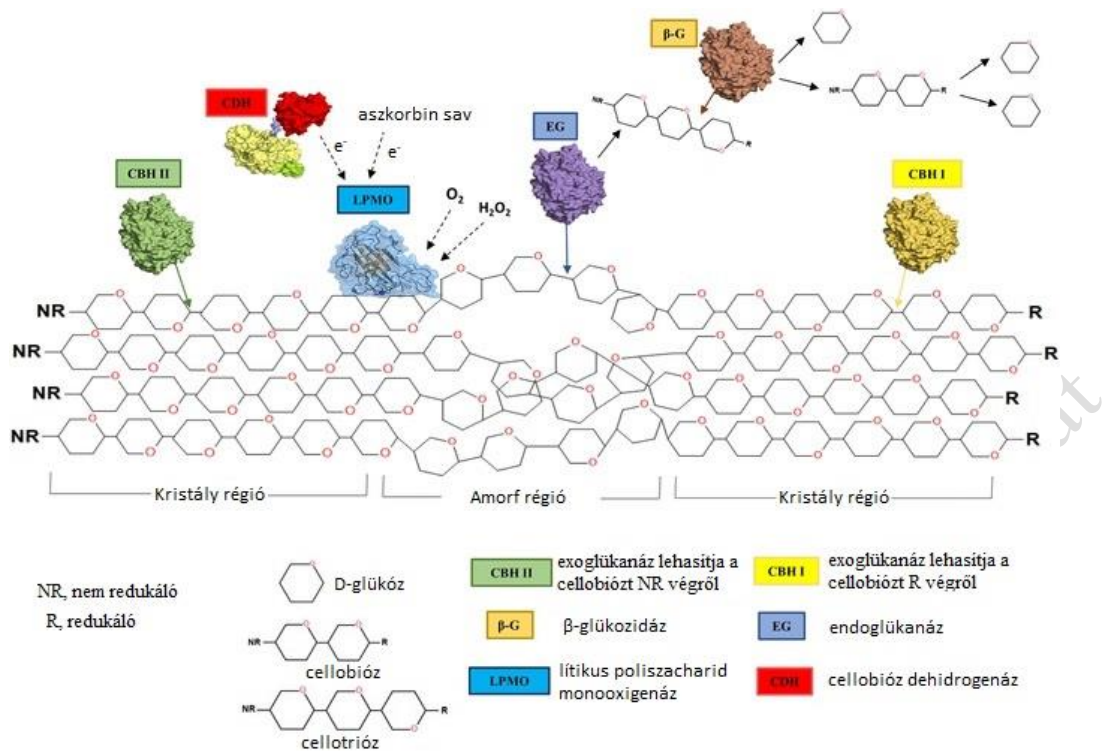
#### Hidrolázok

A hidrolázok az enzimek harmadik csoportja, egyszeres kötéseket hasítását végzik víz jelenlétében. Jellemzően a C-O, C-N, O-P és C-C közti kötéseket hidrolizálják. Mivel a cellulóz és a hemicellulózok gerincét cukor molekulák alkotják, a lignocellulóz lebontásában leginkább a glikozid hidrolázok vesznek részt.

A glikozid hidrolázok vagy glikozidázok a glikozidos kötéseket hasítják szénhidrátok között vagy egy szénhidrát és nem szénhidrát származék között. Az enzim csoportnak több mint 100 családját definiálták, osztályozásuk aminosav szekvencia alapján történik. A reakciók mechanizmusa alapján beszélhetünk invertáló és megtartó glikozidázról, attól függően, megváltoztatja-e a reakció a szénhidrát atomkonfigurációját<sup>24</sup>.*(internet)* A glikozidázok közé tartoznak többek között a cellulázok és hemicellulázok.

A cellulázok a cellulóz  $\beta$ -1, 4-glikozidos kötését hidrolizálják, glükózt, két glükózból álló cellobiózt és cello-oligoszacharidokat előállítva. Három típusát különböztetjük meg: endoglükanázok, exoglükanázok és  $\beta$ -glükozidázok. ahogy azt a 2. ábra is mutatja.

Az endoglükanáz a cellulóz kristály szerkezetének amorf régióját támadja, a glükózok közti  $\beta$ -1,4-glikozidos kötés hasításával. Ezután az exoglükanázok az endoglükanáz által létrehozott redukáló és nem redukáló végekről hasítanak le cellobióz részeket. A felszabadított dimereket ezután a  $\beta$ -glükozidáz lebontja két glükózra. A cellulóz teljes lebontásához a három enzim együttes működése szükséges.



3. ábra: Cellulóz enzimatis lebontása (Andlar et al, 2018)

A hemicellulózok kémilag sokszínű és heterogén biopolimerek, ezért nem meglepő, ha a hemicellulázok hasonló divezitással rendelkeznek. A hemicellulózt alkotó fő heteropolimerek a xilán, mannán, galaktán és arabinán, valamint D-xilóz, D-mannóz, D-galaktóz és L-arabinóz. Mivel a kísérletem fókuszpontja a xilán és cellulóz bontáson van, az alábbi értekezés a xilánra koncentrálódik. A xilán struktúrájának gerincét leginkább az öt szénatomos D-xilóz monomerek adják, lebontásában számos hidrolitikus enzim vesz részt: beta-xilozidáz, beta-1,4-endoxilanáz, acetyl-xilán-észteráz, arabináz, alfa-glükuronidáz, ferulinsav-észteráz és p-kumársav-észteráz. Ezen enzimek együttműködése végzi a xilán lebontását külön álló cukor egységekké.

Az endo-1,4-beta-xilánázok a legfontosabb xilán-bontó enzimek. Ezek az enzimek hasítják a glikozidos kötéseket a xilán gerincében, csökkentve annak polimerizációs fokát. A hidrolízis leggyakoribb termékei a beta-D-xilopiranozil oligomerek de ezek mono-, di- és triszacharidjai is megjelenhetnek. Végtermékek alapján két típusba sorolhatjuk az endoxilanázokat: elágazó és nem-elágazó. Különbség, hogy az elágazó típus képes az arabinoxilán elágazásokat támadni, felszabadítva ezzel arabinózt, a nem-elágazó pedig nem képes erre.

beta-xilozidázokat baktériumok és gombák enzim készletében is kimutattak már, feladatuk a xilooligoszacharidok és a xilobióz hidrolízise xilózzá. Aktivitásuk a xilobióz felé a



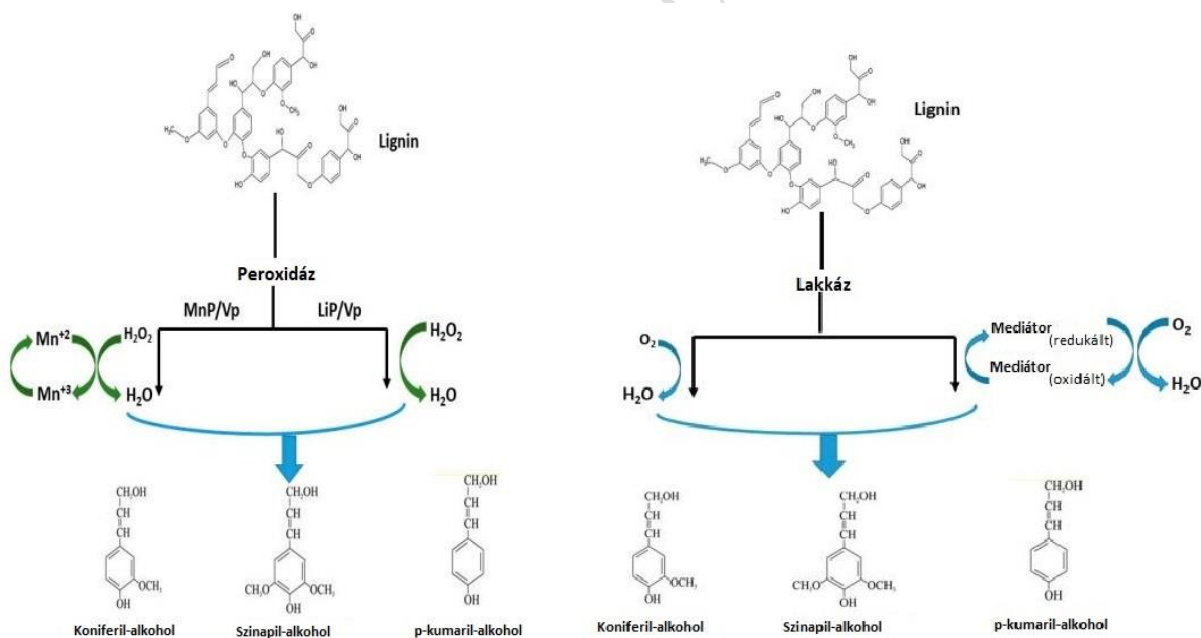
legnagyobb, a xilooligoszacharidoknál aktivitásuk a lánchossz növekedésével csökken, illetve xilóz jelenléte termékátlást okoz.

A xilán acetilcsoportjai sztérikus gátlással csökkenthetik az endoxilázok hozzáférését a polimer gerincéhez, megakadályozva annak hasítását. Éppen ezért a hemicellulóz bontásnak fontos résztvevői az acetyl-xilán észterázok, amik eltávolítják az acetilcsoportot az acetyl-xilán  $\beta$ -D-xilopiranozil származékokról.

Az arabinázok szubsztrátjai az arabinánok, arabinoxilánok és arabinogalaktánok, ahonnan hidrolizálják ezek  $\alpha$ -L-arabinofuranozil-csoportját. Exo és endo típusuk is ismert, bár a legtöbb vizsgált enzim közülük exo-aktivással rendelkezik.

Az  $\alpha$ -glükuronidázok a xilóz és D-glükuronik sav vagy metil-éter csoportja közti  $\alpha$ -1,2-glikozidos kötés hidrolízisét végzik. A ferulinsav-észteráz az arabinóz és ferulik-sav közti, míg a p-kumársav-észteráz az arabinóz és p-kumársav közti észter kötést hasítják.<sup>25</sup>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC699254/> (Chukwuma, 2020)



4. ábra Peroxidáz (bal) és lakkáz (jobb) lignin bontása (Chukwuma, 2020)

### 3.4.3 Lignocellulóz-bontó enzimrendszerek

Bár a celluloszómák kivételes hatékonyságról tesznek tanúbizonyságot, a természetben mégis nagyon ritka, hogy egy mikroorganizmus egyedül rendelkezzen a lignocellulóz teljes lebontásához szükséges enzimkészlettel. Még az *A. termocellus* sem

képes a hemicellulázok egyik tipikus alkotó elemének, a pentózok hasznosítására. Egy 2022-es kutatásban Na Wang és társai a termofil *Thermoclostridium stercorarium* és az *A. termocellus* cellulitikus enzim rendszerét vizsgálták. A *T. stercorarium* tenyésztető volt xilán, glükóz, xilóz, arabinóz, fruktóz, galaktóz, mannóz és ribóz alapú táptalajon is, az *A. termocellus* viszont nem. A két törzs közös tenyésztetének vizsgálata során a két mikroba között szinergens kölcsönhatást fedeztek fel, ami gyorsabb cellulóz hidrolízist és jobb cellulóz-etanol konverziót eredményezett, mint mikor egyenként vizsgálták őket. Az enzimek közti szinergens kölcsönhatásnak több változatát is megfigyelték. Egy exoglukanáz a láncvégek hidrolízisét gyorsabban végezte, ha vele párhuzamosan működött egy endoglukanáz, ami biztosította a szabad láncvégeket. Ilyesfajta együttműködést láthatunk cellulózbontó és hemicellulózbontó enzimek között is, ahol a hemicellulázok lebontásával vagy átalakításával a cellulitikus enzimek hozzáférhetnek a cellulózhoz. Egy másik típusú kooperációra lehet jó példa, mikor a  $\beta$ -glikozidáz az exoglukanázok által felszabadított cellobióz lebontásával meggátolja annak felhalmozódását, csökkentve a termékgátlás következtében fellépő inhibíciót, ezzel tulajdonképpen stabilizálja az exoglukanázok aktivitását<sup>26</sup>. (Na Wang et al, 2022); (<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.164>.)

A hemicellulázok együttes működése szükséges ahhoz, hogy a hemicellulózt teljes egészében monoszacharidjaira és cukorsavjaira bontsák. A xilán hidrolízise közben, az enzimek közti szinergizmusra jó példa a xilán láncbontó és funkciós csoportjait lehasító enzimek működése. Az acetil-xilán-észteráz és az endoxilanázok együttműködése az acetilált xilán lebontás hatékonyságát növelte. Az acetil-xilán-észteráz lehasítja a xilán acetil csoportját, ami így hozzá férhetővé válik az endoxilanáz számára. Ezzel egyidőben, az endoxilanáz rövidebb polimer láncokat állít elő, ami az észterázok aktivitását növeli<sup>27</sup>. (Pratima Bajpai, 2014)

## 3.5 Mikrobák izolálása, jellemzése, azonosításuk menete

### 3.5.1 Mikrobák izolálása

1932-ben Razumov volt talán az első, aki édesvízi mikrobák tanulmányozása közben azt tapasztalta, hogy a baktériumok közvetlen mikroszkópos vizsgálata és lemezes telepszámlálás eredménye között jelentős különbség mutatkozik meg<sup>28</sup>. (Staley, Konopka, 1985) Erre a jelenségre kezdtek el úgy hivatkozni, hogy „The great plate count anomaly”, miszerint a mikroorganizmusok alig 1%-a tenyésztethető laboratóriumi körülmények között. Ennek a jelenségnek a legvalószínűbb oka, hogy a lemezes tenyészetek nem imitálják megfelelő szinten a környezeti viszonyokat (például hőmérséklet, pH, tápanyagok koncentrációja). De más tényezőknek is fontos szerepe lehet egy mikroba reprodukciós hajlandóságában, például, hogy bizonyos fajok csak közösségekben vagy egy szintrof partner jelenlétében képesek szaporodni<sup>29</sup>. (Borsodi et al, 2013)

A hagyományos tenyésztés általánosan elfogadott módszere, hogy a mintából, ahonnan a mikrobát izolálni szeretnénk, egy hígítási sort készítünk, majd annak tagjait külön Petri csészékben, a célnak megfelelő táptalajra szélesztjük. Ezzel a módszerrel meghatározható a telepképző egység (TKE, [egység/ml] vagy [egység/g]). A lemezekről ezután kiválaszthatunk telepeket, amiket esetleg további szélesztéssel külön is izolálni szeretnénk. Ha alacsony mikroba számra számítunk, alkalmazhatunk dúsítást. Ekkor a mintát egy előre megtervezett táplevesbe oltjuk, majd inkubáljuk, ezután készítünk hígítási sort és szélesztést. Ebben az esetben nem számolhatunk csíraszámot, mivel a tápleveses inkubálással már technikailag szelektáltuk a baktériumokat. Várhatóan alacsony vagy bizonytalan telepszám esetén érdemes minél hosszabb inkubációs idővel tervezni, hogy a lassú növekedésű mikrobák is megjelenhessenek. Alacsony tápanyag koncentrációjú közegből izolált minták esetén alkalmazható a pur-habos módszer. A mintát poliuretán-hab kockákhoz (PUF) rögzítik, majd ezeket a kockákat fedik be az agaros táptalajjal. Inkubáció után a kockákat homogenizálják és hígítják, mielőtt táptalajra szélesztnék.

Táptalaj összeállításánál fontos szempont, hogy biztosítsuk a telepek növekedéséhez szükséges makro- és mikroelemeket. A baktériumok számára szükséges makroelemek 98%-át a következők 10 elem teszi ki: C, O, H, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca... Ezekre főleg a szerves anyagok felépítéséhez van szükség, valamint enzimek kofaktoraként. A mikroelemek és

egyéb nyomelemek főleg enzimalkotóként (pl.: Co, Cu, Mo, Zn) vannak jelen, valamint a sejtlégzés segítségét (Fe, Mn) szolgálják<sup>30</sup> (Dr.Tóth Erika, 2020).

A papír összetevői megegyeznek a növényi rostok összetevőivel, azzal a különbséggel, hogy a lignint a fehérités során eltávolítják a papírból, így általánosságban kijelenthetjük, hogy a papírokat cellulóz rostok és hemicellulózok alkotják. Mivel a baktériumok tenyésztését papírhulladékról fogom végezni, olyan táptalajokra lesz szükségem, ami figyelembe veszi az izolátumok korábbi „élőhelyét” és megfelelő alapot nyújt a xilán- és cellulózbontásra képes telepek megjelenéséhez. Az egyik fő szempont a szénforrás kiválasztása, mivel ez az a tulajdonság, amivel szelektálhatjuk a megjelenő telepeket a téma szempontjából fontos mikroorganizmusokra. A karboximetil-cellulóz (CMC) a cellulóz egy karboximetil-étere, amit mesterséges úton állítanak elő, többek között celluláz termelő mikroorganizmusok detektálására. Előnye a natív cellulózzal szemben, hogy vízoldható és kevesebb inkubációs idővel is vizsgálható eredménnyel szolgálhat<sup>31</sup>. (Hankin&Anagnostakis, 1977) A xilán kézenfekvő szénforrásnak tűnik xilanázok vizsgálatára, alacsony koncentráció mellett vízoldható, ebből kifolyólag alkalmazható táptalajok készítéséhez. A kísérletemnél szerettem volna, ha minél több telep közül tudnék választani majd, amiket további szélesztéssel izolálhatok, illetve nem alapvető célom extremofil baktériumok vizsgálata, így közel semleges pH szint lenne a célravezető. Az inkubálási hőmérséklet meghatározásával a termofil és pszichrofil baktériumok szelektálhatóak. Jelentőségük abból fakad, hogy szélsőséges környezetben élő mikroorganizmusoknak általában az enzimmészete is alkalmazkodott a külső tényezőkhöz. Az ipari enzimeknél gyakran előny például, ha magas ( $\geq \sim 50^{\circ}\text{C}$ ) hőmérsékleten van az enzimaktivitás optimuma.

### 3.5.2 Baktériumok jellemzése és azonosítása

Bár Antoni van Leeuwenhoek - az emberiség történelmében elsőként - már az 1670-es években sikeresen lencse végre kapott protozoákat, felfedezésétől még nem kapott szárnyra a mikrobiológia, a baktériumok nagy volumenű tanulmányozása a 19. század végéig váratott magára. Ekkorra a tudósok már sikeresen tenyésztettek mikrobákat agar lemezekre, megkülönböztetésük és jellemzésük tisztán külső markerek, vagyis morfológia alapján történt: alak, méret, szín, mozgás, telep állaga, spóra képzés mivolta. Gram-festést már alkalmaztak, de még csak a telepek jobb láthatósága miatt. Később szelektív és

differenciáló táptalajokat is elkezdtek használni, hogy anyagcsere folyamataik alapján is kategorizálhassák a mikrobákat. Szubsztrát felhasználás tesztelésére a mai napig alkalmaznak olyan 96 lyukú lemezeket, aminél mindegyik más szén és/vagy nitrogén forrást tartalmaz, az eredményeket pedig színreakció jelzi (API teszt)<sup>32</sup> (Jennifer Tsang, 2020, <https://asm.org/Articles/2020/February/Identifying-Bacteria-Through-Look,-Growth,-Stain>)

A morfológia és a biokémiai tesztek, ahogy egyre több fajt különítettek el, egy idő után nem voltak elégségesek, ráadásul a mikroszkópos megfigyelések helytelen eredményhez is vezethettek, mivel a külső jellemzők a táptalaj összetételétől függően és fajon belül is változhatnak. A modern rendszertanban ezért az új taxonok azonosítását a fenotípus, kemotaxonómia és genotaxonómia közös vizsgálatával végzik.

A fenotípus tulajdonságai közé tartozik a telep morfológiája, anyagcsere folyamatai és szubsztrát hasznosítás, enzimreakciók, valamint a növekedéshez szükséges külső tényezők, mint hőmérséklet, pH optimum vagy só koncentráció.

Bár gyakran külön tárgyalják, a fenotípusba tartoznak a kemotaxonómiai tulajdonságok is, aminek vizsgálatok a mikroorganizmus kémiai összetételét tárják fel. Általában a DNS vizsgálatok megerősítésére alkalmazzák, de új taxonok leírásakor elengedhetetlen eszköz. A baktériumok sejtfala peptidoglikánt tartalmaz, aminek egyik fő alkotója a muraminsav. A muraminsavról lelévő oligopeptid láncok aminosav összetétele nemzetség specifikus, taxonómiai fontos információ. A légzési kinonok a légzési elektrontranszportlánc fontos részei, sokféle előfordulásuk jó csoportosítási szempont adnak nem csak a baktériumok, de a gombák jellemzésére is. A citoplazma membrán zsírsav összetételének vizsgálatok a szénláncok hossza, a metilcsoport és kettőskötés helye ad nemzetségre jellemző releváns információt.

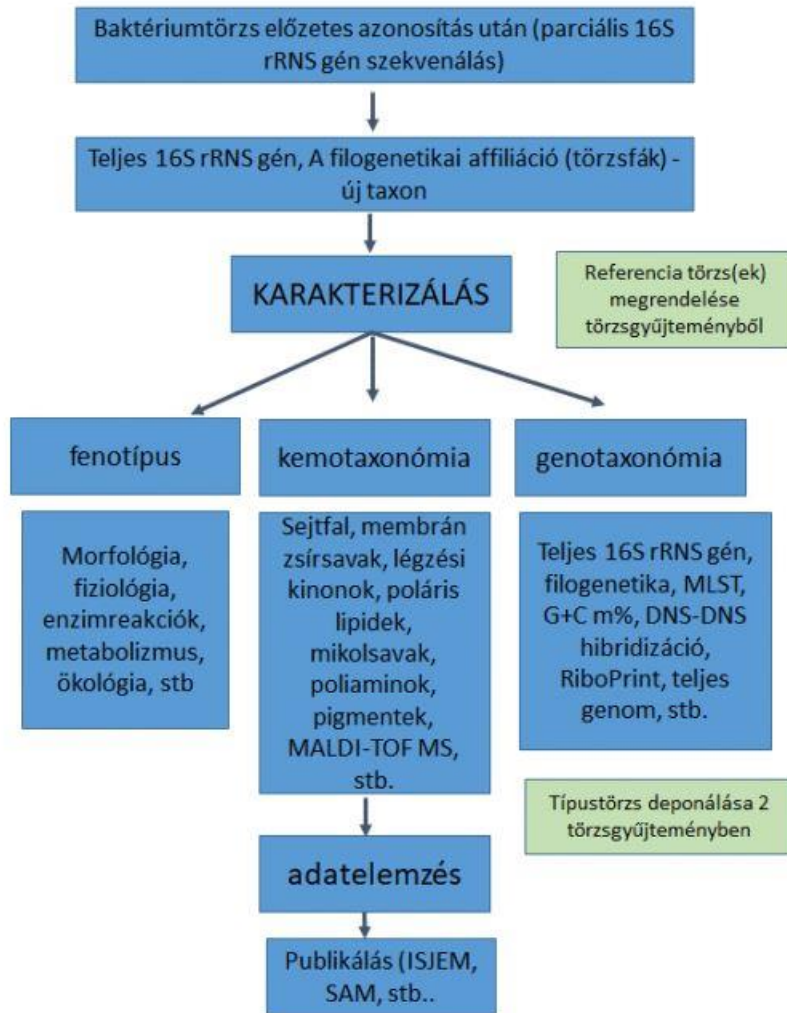
Napjainkban a legmeghatározóbb módszer, amire a taxonómusok támaszkodhatnak, a génszekvenciák elemzése, aminek alapja az izolátumok génjének bázissorrend meghatározása. A módszer története 1977-ig nyúl vissza, mikor Woese és munkatársai a 16S rRNS génnek az elemzésével fogalmazták meg, hogy a prokarióták tovább bonthatóak baktériumokra és archeákra. A következő mérföldkövet a PCR eljárás kidolgozása jelentette (1980-as évek) Az új fajok, törzsek száma ezek után robbanásszerűen nőni kezdett. A 16S rRNS azóta is kiemelt szerepet játszik a taxonómiában, három tulajdonságának köszönhetően:

- szinte minden baktériumban jelen van,

- funkciója idővel nem változott, tehát egy relatív konzervatív régió,
- mérete (1500 bp) megfelelően alkalmazható informatikai célokra<sup>33</sup> (Janda and Abbott, 2007). Itt érdemes lehet megemlíteni, hogy eukarióták esetében a 28S rRNS, gombáknál a 18S rRNS vizsgálata a célravezető.

Hogy egy baktériumot azonosítsunk, a gén szekvenciáját össze kell vetni a nemzetközi adatbázisok adataival, erre számos online elérhető génbank létezik, ahol lehetőség van az aminosav sorrend páronkénti, illetve többszörös szekvencia illesztésre is. A legnagyobb génbankok közé tartozik az amerikai NCBI, a japán DDBJ, és az európai EMBL. Stackebrandt és Goebel 1994-ben 97% feletti egyezésnél húzta meg a határt, ahonnan két fajt azonosnak lehet tekinteni prokarióták esetében. Később Stackebrandt és Ebers 2006-ban egy még magasabb határt (98,7-99%) ajánlott<sup>34</sup> (Chun et al, 2007). Ha 97% feletti egyezés van a vizsgált és egy validált faj 16S rRNS szakaszán, érdemes további vizsgálatokat végezni a kérdéses szekvencián. Az ilyen „határeseteknél” bevett módszer a DNS-DNS hibridizációs (DDH) módszer. A DDH alapelve, hogy két egyedből (például az új törzs és a feltételezett fajának a típus törzséből) származó kétszálú DNS-t denaturálják magas hőmérsékleten, majd okozatosan lehűtve a komplementer szálak újra annellálnak. Minél több egyszálú DNS marad a folyamat végére, annál több az eltérés az egyedek között. A szálak hibridizációját százalékosan adják meg. A DDH-val elért 70%-os vagy nagyobb egyezést általában faji szintű egyezésnek könyvelik el. (Tindall, 2010) Mára már a hibridizációs eljárást szinte teljesen háttérbe szorította a teljes genom szekvenálás, amivel pontosabb páronkénti összehasonlítás végezhető, valamint egyes gének jelenléte vagy hiánya is megállapítható. A hibridizációt manapság már digitálisan végzik.

Releváns információval szolgálhat a DNS guanin + citozin aránya, amit többek között DDH elővizsgálatra használnak. A G+C arány egyezése többé-kevésbé stabil alapot ad azonosság vagy homológia feltételezéséhez, de előfordulnak kivételek, például az obligát intracelluláris paraziták esetében. Megjegyzendő még, hogy előfordulhat 100%-os egyezés két különböző faj között is, hiszen a bázissorrend ettől még teljesen eltérhet.<sup>35</sup> (Tindall, 2010; Dr. Tóth E., 2020)



5. ábra Taxonómiai leírás folyamata (forrás: Dr. Tóth Erika, 2020)

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Új baktériumtörzsek izolálása

A kezdeti minta egy szelektív hulladékgyűjtő telepről származó papírdarab volt. A minta 4°C-on volt tárolva több mint egy évig, mielőtt feldolgoztam volna.

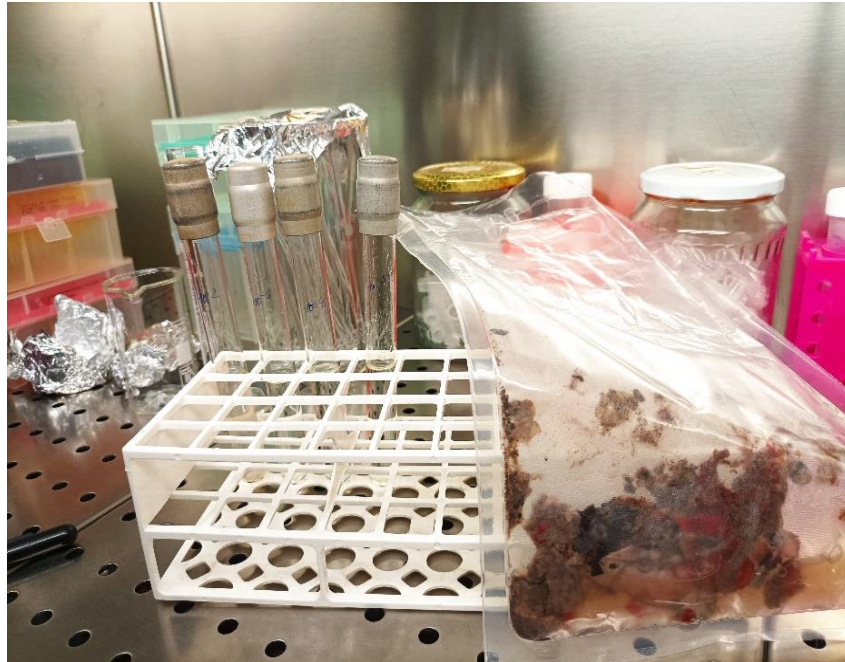
A papírdarabot (2,65g) Stomacher Classic gépbe tettem 23,85g pepton oldattal (9g NaCl; 1 g pepton; 1000 ml desztillált víz). A kapott oldatból decimális hígítási sort készítettem a későbbi szélesztéshez. A táptalajok alapja egy minimál tápoldat volt (0,5 g élesztő kivonat; 0,5 g pepton; 1 g NaNO<sub>3</sub>; 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g NaCl; 0,5 g MgCl<sub>2</sub>; 1000 ml desztillált víz; pH 7,5), szilárdító anyagnak agarózt és gelrite-t, szénforrásnak CMC-t és xilánt használtam. A táptalajokat összetevők alapján rövidítésekkel láttam el: AX (agaróz-xilán), AC (agaróz-cellulóz), GX (gelrite-xilán), GC (gelrite-cellulóz). Mindegyik típusú táptalajhoz 200-200 ml oldatot készítettem, majd autoklávoztam (20 perc; 120°C; 1,1 atm).

Mindegyik táptalaj típusból négy lemezt öntöttem, majd egy napra hűtőbe tettem pihenni, hogy később az esetleg keletkező pára ne mossa le a telepeket. Későbbi táptalaj készítéseknél is követtem ezt a gyakorlatot.

A mintából készült hígítási sor két tagját (10<sup>-4</sup>; 10<sup>-5</sup>) használtam szélesztéshez, 100 µl szuszpenziót oltottam mindegyik lemezre. Mindegyik táptalaj típusból kettőre 10<sup>-4</sup>, kettőre 10<sup>-5</sup> hígítású minta került, majd az azonosoknak egyik felét szobahőmérsékleten (RT), másik felét 15°C-on inkubáltam négy napig.

A 16 lemezről kiválasztottam olyan telepeket, amik kellőképpen elhatárolódtak a szomszédos telepektől, illetve azokat, amik körül már most megfigyelhető volt egy tisztulási zóna. A kiválasztott telepeket ugyanolyan, korábban elkészített táptalajokra oltottam át, amilyeneken az első szélesztést követően nőttek ki.





6. ábra A kezdeti minta feldolgozás után a Stomacher zacskóban. Balra a hígítási sor

A tisztító szélesztést megismételtem, táptalajonként 10-15 telepet izoláltam. A lemezeket sorszámmal láttam el, illetve a később izolált telepeket morfológiai tulajdonságukról elnevezve dokumentáltam. A végső lemezsám 50 volt.

A telepek bankolásához és a későbbi DNS izoláláshoz folyadéktenyészetet készítettem, ehhez lombikonként 20 ml TSB (17 g kazein pepton; 3 g szója pepton; 2,5 g D-glükóz; 5 g NaCl; 2,5 g  $K_2HPO_4$ ; 1000 ml desztillált víz; pH 7,5) táplevest mértem össze. A folyadéktenyészethez kacsával leszedtem a lemezekről az oltási vonal lehetőleg utolsó telepét, figyelve, hogy az azon kívül eső telepeket elkerüljem, majd belekevertem a lombikba. A lombikokat szobahőmérsékleten rázattam egy hétig. A TSB-ben kinőtt folyadékkultúrákból 850  $\mu$ l-t eppendorf csőben, 43%, 850  $\mu$ l glicerol oldattal tároltam  $-80^\circ\text{C}$ -on fagyasztva.

#### 4.2 Hidrolitikus aktivitás tesztelése

Következő lépésként a hidrolízis tesztéhez készítettem táptalajokat xilán és agaróz felhasználásával. A táptalajok közepére átoltottam egyesével a telepeket, és 1 hétig szobahőmérsékleten inkubáltam őket. Ez idő alatt újabb 50 lemezt öntöttem, ezúttal cellulózt és agarózt használva, ezeken megismételtem az átoltást.

A hidrolízis tesztet festéssel végeztem. Az eljárás alapja, hogy a festék a poliszacharidokhoz kötődik, ami így a lemosás után is látható. Amennyiben a mikroba

lebontja a poliszacharidokat maga körül, a festék lemosódik, és megjelenik egy tisztulási zóna. Az egy hetes lemezeken először körberajzoltam a telepeket, mert a festés során lemosódhatnak.

Festéknek 0,3% kongó vörös oldatot használtam. A lemezekre annyi festéket öntöttem, hogy teljesen elfedje a telepeket, majd fél óráig finoman rázattam. Ezalatt NaCl oldatot (1,5 l; 1M) készítettem a lemosáshoz. A festékes rázatás után a lemezeket egyszer átmostam NaCl oldattal, majd újból sóoldatot öntöttem rájuk, és 1 napig rázattam. Ezután eltávolítottam a folyadékot a lemezekről, és megmértem a tisztulási zónák méretét a telep szélétől a zónák határáig. A folyamatot megismételtem a cellulóz agar lemezeken is, és az eredményeket egy táblázatban rögzítettem.

### 4.3 Törzsek identifikálása

#### 4.3.1 DNS izolálás

A folyadéktenyészetekből eppendorf csőbe 1600 µl folyadéktenyészetet pipettáztam mindegyik kultúrából, majd centrifugálás után (140.000 RPM; 1 perc) eltávolítottam a felülúszót, és -4°C-on tároltam a későbbi sejtfeltáráshoz. Azoknak a telepeknek, amik nem nőttek ki TSB folyadékban, újabb táplevest készítettem a táptalajuknak megfelelő alapanyagokból, azzal a változtatással, hogy cellulóz helyett keményítőt használtam.

A -20°C-on, centrifuga csövekben tárolt telepekből DNS izoláló kit segítségével, az ahhoz tartozó leírásnak megfelelően izoláltam a sejtek genomi DNS-ét. Hogy biztos lehessen az izolálás sikerességében, a kinyert termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem (1%-os agaróz gél). Az eredmények, vagyis az UV fény alatt megjelenő sávok erősségétől függően állapítottam meg a PCR mixbe kerülő templát mennyiségét. A PCR mixben a 16S rRNS gén sokszorosításához szükséges primereket használtam (27F és 1492R primerpár). A folyamat időigénye és a minták mennyiségét figyelembe véve, egyszerre 8-12 minta DNS izolálását végeztem. A PCR termékeket újból ellenőriztem gélelektroforézissel, a sikertelen eseteket megismételtem.

#### 4.3.2 Szekvenálás

A baktériumok azonosításához a genomi DNS 16S rRNS génjét kellett megszekvenálnom. Az izolált mikrobák közül kiválasztottam 10, a hidrolízis teszten jó

bontási képességet mutató, morfológiailag lehetőleg jól elkülöníthető baktériumot. A kiválasztott baktériumok PCR termékét a szekvenálás előtt meg kellett tisztítani a PCR reagenseitől. A tisztítást Macherey-Nagel: NucleoSpin kittel végeztem, a hozzá tartozó leírásnak megfelelően. A kiválasztott PCR termékek az alábbi jelölésű tenyészetekhez tartoztak: AX5, AX7, AX9, AX10, GC2, GC7, GX6, SN1, HN2, FS

A szekvenálást a MATE Molekuláris Ökológia Tanszék tanszékvezetője Tánicsics András végezte el nekünk baráti szívből. Az eljárást a Sanger módszerrel csinálta. A szekvenálással kapott szekvenciákat az [EZBioCloud<sup>36</sup>](#) adatbázisába töltöttem fel majd itt végeztem az analízist programmal.

László Dömötör Mihály Szakdolgozat

## 5. EREDMÉNYEK

Négy nap elteltével megszámláltam a telepeket mindegyik lemezen, majd ebből kiszámoltam a tényleges telepképző egységet a szélesztett minta hígítási fokával korrigálva. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza:

2. táblázat Telepszámlálás eredménye

GC	RT	15°C
$10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^6$
$10^{-5}$	$1,14 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^6$

GX	RT	15°C
$10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^5$
$10^{-5}$	$5,4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^5$

AC	RT	15°C
$10^{-4}$	$2,25 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^5$
$10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$

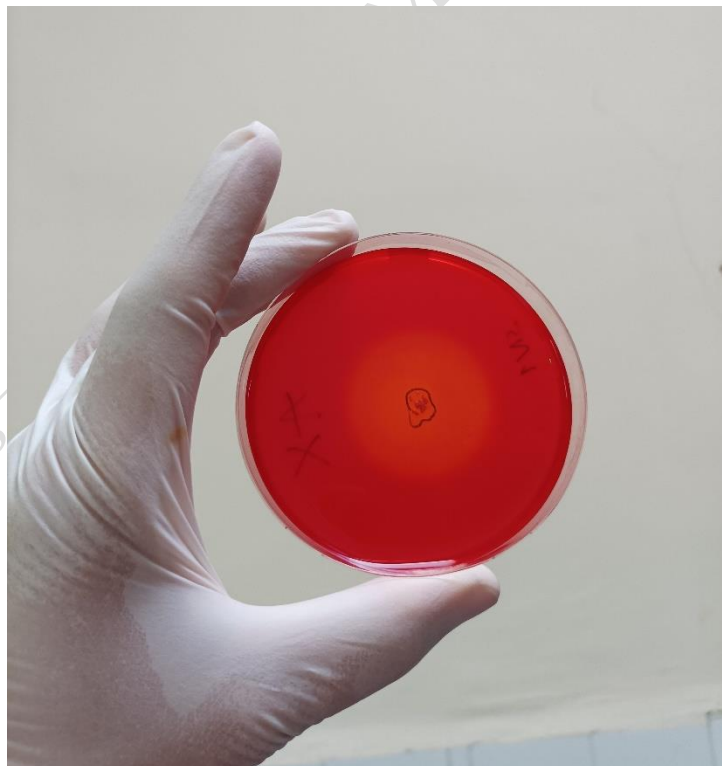
AX	RT	15°C
$10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6$
$10^{-5}$	$5,1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$

Az eredmények az eredeti lemezekon megfigyelt valós telepszámokat tartalmazzák. Szobahőmérsékleten inkubált lemezekon egyértelműen több telep volt megfigyelhető mint 15°C-on. Gelrite tartalmú talajokon több telep képződött 15°C-on mint az agarózos táptalajokon, illetve a CMC szénforrásos talajokon is több telep képződött ezen a hőmérsékleten, mint a xilánon. Talán érdemes itt megemlíteni, hogy a xilános táptalajok tejszerűbbek voltak, így könnyebben észrevehető volt, ha egy telep körül tisztulási zóna alakult ki.

A hidrolízis teszten leginkább az agaróz gélen, xilán szénforrással készített lemezekon nőtt telepek mutattak jó bontási képességet. Az agaróz géllal és CMC-vel készült táptalajokról izolált mikrobák nem mutattak cellulózbontó aktivitást.



7. ábra: AX 8 jelölésű minta az első (bal oldalt) és második (jobb oldalt) tisztító szélesztést követően



8. ábra Jól látható tisztulási zóna a hidrolízis teszt után

A 12, agaróz - xilán alapú táptalajon tenyésztett baktérium közül 8 mutatott xilánáz aktivitást, 5 pedig cellulóz bontó képességet. Az AX 10-es baktérium körül volt megfigyelhető mind közül a legnagyobb tisztulási zóna xilános és cellulózos táptalajon is.

3. táblázat Agaróz - xilán alapú táptalajokról izolált mikrobák tisztulási zónája

	Xilán	Cellulóz
AX 1		
AX 2		
AX 3		
AX 4		
AX 5	15 mm	2 mm
AX 6	7 mm	
AX 6,5	8 mm	
AX 7	14 mm	4 mm
AX 8	15 mm	
AX 9	8 mm	6 mm
AX 10	19 mm	14 mm
AX 11	11 mm	9 mm

A gelrite – xilán alapú táptalajokon kinőtt baktériumok közül csupán 2 tudta a xilánt valóban lebontani, a GX 1 körül egy alig 1 mm sugarú zóna volt látható cellulózos talajon.

4. táblázat Hidrolízis teszt eredménye. Gelrite - xilán alapú táptalajokról izolált mikrobák tisztulási zónája

	Xilán	Cellulóz
GX 1		1 mm
GX 2		
GX 3		
GX 4		
GX 5		
GX 6	8 mm	
GX 7		
GX 8	7 mm	
GX 9		
GX 10		

A gelrite - cellulóz alapú táptalajokon a GC 2-es telep xilán és cellulóz bontást is mutatott, illetve másik két izolátum körül is megfigyelhető volt celluláz aktivitás.

5. táblázat Hidrolízis teszt eredménye. Gelrite - cellulóz alapú táptalajról izolált mikrobák tisztulási zónája

	Xilán	Cellulóz
GC 1		
GC 2	5 mm	6 mm
GC 3		
GC 4		
GC 5		2 mm
GC 6		
GC 7		9 mm
GC 8		
GC 9		
GC 10		
GC 11		

Az utólag izolált telepek eleve azért lettek kiválasztva, mert látszólag az első leoltás után (bár a többihez képest később) már megjelent körülöttük tisztulási zóna. Egy kivétellel mindegyik jó bontó képességet mutatott.

6. táblázat Hidrolízis teszt eredménye. Utólag izolált mikrobák tisztulási zónája

	Xilán	Cellulóz
SN 1	14 mm	9 mm
SN 2	11 mm	7 mm
SN 3	13 mm	10 mm
HN 1	15 mm	11 mm
HN 2	15 mm	9 mm
FS	11 mm	
Piros		

A 9. ábrán látható eredmények többsége elég meggyőző, magas százalékos egyezést mutat az adatbázis bizonyos taxonjaival. A találatok között látni *Streptomyces* illetve *Cellulomonas* nemzetség tagjait, amiket a szakirodalom már korábban is leírt mint cellulóz és xilán bontó mikrobák. Az SN 1 és GC 2 azonosításához további vizsgálatok szükségesek, esetleg hosszabb szekvenciák használata. Az AX 9 az adatbázis egy leírt taxonjával sem sikerült azonosítani, így érdemes további genetikai vizsgálatoknak alávetni, mert lehet még le nem írt fajhoz tartozik.

<input type="checkbox"/>	Tasks	Name	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Top-hit taxonomy	Completeness (%)
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_SN1	Cellulomonas humilata	ATCC 25174	97.85	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetia;Cellulomonadales;Cellulomonadaceae;Cellulomonas	58.5
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_HN2	Cellulomonas humilata	ATCC 25174	99.75	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetia;Cellulomonadales;Cellulomonadaceae;Cellulomonas	55.8
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_GX6	Staphylococcus aureus subsp. aureus	DSM 20231	99.50	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcaceae;Staphylococcus;Staphylococcus aureus	54.1
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_GC7	Streptomyces pratensis	ch24	99.40	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetia;Streptomyetales;Streptomyetaceae;Streptomyces	58.9
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_GC2	Flavobacterium chilense	LMG 26360	97.53	Bacteria;Bacteroidetes;Flavobacteriia;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium	56.5
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_FS	Streptomyces setonii	NRRL ISP-5322	100.00	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetia;Streptomyetales;Streptomyetaceae;Streptomyces	55.4
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_AX10	Microbacterium aurum	KACC 15219	98.76	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetia;Microbacteriales;Microbacteriaceae;Microbacterium	35.2
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_AX9	LMNI_s	Leaf288	97.27	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetia;Microbacteriales;Microbacteriaceae;Microbacterium	54.0
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_AX7	Herbiconiux solani	NBRC 106740	99.09	Bacteria;Actinobacteria;Actinomycetia;Microbacteriales;Microbacteriaceae;Herbiconiux	53.1
<input type="checkbox"/>		ANDRAS_AX5	Sphingomonas faucium	E62-3	98.78	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sphingomonas	57.9

9. ábra: Az azonosítás eredménye



## 6. ÖSSZEFOGLALÓ

A növényi biomassza jelenlegi felhasználása csak töredéke annak, amekkora potenciállal rendelkezik, akár mint energiahordozó, akár mint prekursor alapanyag, pedig hatalmas mennyiségben termelődik évente világszerte. A lignocellulóz lebontásában részt vevő mikrobák és enzimek egyre nagyobb jelentőséget kapnak, ahogy a technológia keresi az iparban alkalmazott kémiai eljárások alternatíváit. A cellulitikus és hemicellulitikus rendszerek résztvevőinek megismerése az első lépések egyike a környezettudatosabb és kíméletesebb módszerek kifejlesztéséhez, amik többsége jelenleg még nem veszi fel a versenyt a most használatban lévő eljárások költséghatékonyságával.

A dolgozatomban papírhulladékról izoláltam baktérium telepeket és hidrolízis teszt során vizsgáltam cellulóz és xilán bontó képességüket, majd a 16S rRNS alapján azonosítottam közülük tíz telepet. Eredményeim remélhetőleg jó alapot nyújtanak majd a lignocellulitikus baktériumok és enzimeik további vizsgálatára.

László Dömötör Mihály

## Köszönetnyilvánítás

Első sorban szeretném megköszönni konzulensemnek, dr. Tóth Ákosnak a szakmai útmutatásait és segítségnyújtását a kísérletek és a dolgozat készítése közben egyaránt, de legfőképpen türelmét, amivel akkor is megtisztelt, mikor nehézségek merültek fel a munka folyamán. Köszönöm sok éves tapasztalaton alapuló tanácsait, amik nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Szeretném továbbá megköszönni a MATE Molekuláris Ökológia Tanszék tanszékvezetőjének, Táncsis Andrásnak, hogy az általunk küldött minták szekvenálását elvégezte, és ezzel segítette a dolgozat létrejöttét. Végző soron köszönöm családomnak az utolsó percig tartó támogatásukat.

László Dömötör Mihály Szakdolgozat

Felhasznált irodalom:

- **Yinon M. Bar-On, Rob Phillips, and Ron Milo**, The biomass distribution of Earth, The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ, and approved April 13, 2018
- **dr.Réczey Istvánné Csorba K.**: Lignocellulózok biofinomítása és konverziója második generációs üzemanyagalkohollá, BME, 2012
- **Ábel M.**: Mezőgazdasági hulladékok hasznosításának és az alkalmazott enzim visszanyerésének lehetőségei, SZTE, 2016
- <https://www.vg.hu/vilaggazdasag/2022/08/dollarmilliardok-omlenek-a-biomuanyag-piacba>
- <https://infinitabiotech.com/pulp-and-paper-enzymes/>
- **Kuhad RC, Gupta R, Singh A.** Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Res. doi: 10.4061/2011/280696. Epub 2011 Sep 7
- **Sevella B.**, Biomérnöki műveletek és folyamatok, 95.old, BME, 2012
- **L. Kaprelyants, O. Zhurlova, T. Shpyrko, L. Pozhitkova**, Xylooligosaccharides from agricultural by-products: characterisation, production and physiological effects, 2017; DOI: <https://doi.org/10.15673/fst.v1i1i3.606>
- <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/downloads/top-value-added-chemicals-biomass-volume-i-results-screening-potential>
- **S. G. Wettstein, D. M. Alonso, E. I. Gürbüz, J. A Dumesic**, A roadmap for conversion of lignocellulosic biomass to chemicals and fuels, Current Opinion in Chemical Engineering, 2012, Pages 218-224, ISSN 2211-3398, <https://doi.org/10.1016/j.coche.2012.04.002>.
- **P. Bajpai, Xylanolytic Enzymes**, Academic Press is an imprint of Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK, 225 Wyman Street, Waltham, MA 02451, USA, 2014,
- **A. Singh**, Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects 2016
- <https://portal.nebih.gov.hu/-/nem-veszelyes-hulladek-hasznositasa-termofoldon>
- **P. Béguin and J-P. Aubert**, The biological degradation of cellulose, 1993, 28-29
- **David B. Wilson**, Microbial diversity of cellulose hydrolysis, Current Opinion in Microbiology, Pages 259-263, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18378599/>

- **D. B. Wilson**, Three Microbial Strategies for Plant Cell Wall Degradation  
Department of Molecular Biology and Genetics, Cornell University, Ithaca, New York, USA, 2008
- **Artzi, L., Bayer, E. & Moraïs, S.** Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat Rev Microbiol* 15, 83–95 (2017).  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.164>,
- **E. A. Bayer, J-P Belaich, Yuval Shoham, Raphael Lamed**, The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides, 2004,  
DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091022
- **Andlar M, Rezić T, Mardetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B.**  
Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci.* 2018 Jun 27;18(11):768-778. doi: 10.1002/elsc.201800039  
[https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_hydrolases](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases))
- **Wang, N.; Yan, Z.; Liu, N.; Zhang, X.; Xu, C.** Synergy of Cellulase Systems between *Acetivibrio thermocellus* and *Thermoclostridium stercorarium* in Consolidated-Bioprocessing for Cellulosic Ethanol. *Microorganisms* 2022,  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030502>
- **Staley JT, Konopka A.** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 1985; doi: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541
- **Borsodi A., Felföldi T., Jáger K., Makk J., Márialigeti K., Romsics Cs., Tóth E., Bánfi R., Pohner Zs., és Vajna B.** Bevezetés a prokarióták világába, ELTE, 2013
- **Dr.Tóth E.,** Új prokarióta taxonok leírása és módszerfejlesztések alkalmazott mikrobiológiai és mikrobiális ökológiai kutatások során, ELTE, 2020
- **J. Tsang,** 2020, <https://asm.org/Articles/2020/February/Identifying-Bacteria-Through-Look,-Growth,-Stain>
- **B. J. Tindall, R. Rosselló-Móra, H.-J. Busse, W. Ludwig, P. Kämpfer:** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes; 2010  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>

## Hivatkozások jegyzéke

- <sup>1</sup> The biomass distribution of Earth, Yinon M. Bar-On, Rob Phillips, and Ron Milo  
Edited by Paul G. Falkowski, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ, and  
approved April 13, 2018
- <sup>2</sup> dr.Réczey Istvánné Csorba Katalin: Lignocellulózok biofinomítása és konverziója második generációs  
üzemanyagalkohollá, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és  
Élelmiszertudományi Tanszék 2012
- <sup>3</sup>Ábel Marieta: Mezőgazdasági hulladékok hasznosításának és az alkalmazott enzim visszanyerésének  
lehetőségei, 2016
- <sup>4</sup> <https://www.vg.hu/vilaggazdasag/2022/08/dollarmilliardok-omlenek-a-biomuanyag-piacba>
- <sup>5</sup> <https://infiniabiotech.com/pulp-and-paper-enzymes/>
- <sup>6</sup> Kuhad RC, Gupta R, Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res.* 2011;  
2011:280696. doi: 10.4061/2011/280696. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21912738; PMCID: PMC3168787
- <sup>7</sup> Sevela Béla, 2012, Biomérnöki műveletek és folyamatok, 95.old
- <sup>8</sup> L. Kaprelyants, O. Zhurlova, T. Shpyrko, L. Pozhitkova, Xylooligosaccharides from agricultural by-  
products: characterisation, production and physiological effects, 2017; <https://doi.org/10.15673/fst.v1i13.606>
- <sup>9</sup> (<https://www.energy.gov/eere/bioenergy/downloads/top-value-added-chemicals-biomass-volume-i-results-screening-potential>)
- <sup>10</sup> Stephanie G Wettstein, David Martin Alonso, Elif I Gürbüz, James A Dumesic, A roadmap for conversion  
of lignocellulosic biomass to chemicals and fuels, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2012, Pages  
218-224, ISSN 2211-3398, <https://doi.org/10.1016/j.coche.2012.04.002>.
- <sup>11</sup>Pratima Bajpai, Xylanolytic Enzymes, 2014
- <sup>12</sup> Susana Rodríguez Couto, José Luis Toca Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases:  
A review, 2006
- Ajay Singh, Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects 2016
- <sup>13</sup>Susana Rodríguez Couto, José Luis Toca Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases:  
A review, 2006
- <sup>14</sup> <https://portal.nebih.gov.hu/-/nem-veszelyes-hulladek-hasznositasa-termofoldon>
- <sup>15</sup> Ábel Marieta: Mezőgazdasági hulladékok hasznosításának és az alkalmazott enzim visszanyerésének  
lehetőségei
- <sup>16</sup> Pratima Bajpai, Xylanolytic Enzymes, 2014, Megyeri Gábor, Lignocellulóz hidrolízise és  
továbbhasznosítása ionos folyadékban enzimek segítségével, 2019
- <sup>17</sup> The biological degradation of cellulose, Pierre Béguin and Jean-Paul Aubert, 1993, 28-29
- <sup>18</sup> The biological degradation of cellulose, Pierre Béguin and Jean-Paul Aubert, 1993, 28-29
- <sup>19</sup> David B. Wilson, Microbial diversity of cellulose hydrolysis, *Current Opinion in Microbiology*, 2011,  
Pages 259-263, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18378599/>
- <sup>20</sup> Three Microbial Strategies for Plant Cell Wall Degradation David B. Wilson Department of Molecular  
Biology and Genetics, Cornell University, Ithaca, New York, USA, 2008
- <sup>21</sup> The biological degradation of cellulose, Pierre Béguin and Jean-Paul Aubert, 1994, 28-29
- <sup>22</sup> Martina Andlar, Tonči Rezić, Nenad Marđetko, Daniel Kracher, Roland Ludwig, Božidar Šantek,  
Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose  
degradation, 2018 (doi: 10.1002/elsc.201800039);  
Edward A Bayer, Jean-Pierre Belaich, Yuval Shoham, Raphael Lamed, The cellulosomes: multienzyme  
machines for degradation of plant cell wall polysaccharides, 2004  
(DOI:10.1146/annurev.micro.57.030502.091022)
- <sup>23</sup> Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B. Lignocellulose degradation: An  
overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci.* 2018 Jun  
27;18(11):768-778. doi: 10.1002/elsc.201800039. PMID: 32624871; PMCID: PMC6999254,

- 
- Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, Lamed R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:521-54. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091022. PMID: 15487947
- <sup>24</sup> [https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_hydrolases](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases))
- <sup>25</sup> Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci.* 2018 Jun 27;18(11):768-778. doi: 10.1002/elsc.201800039. PMID: 32624871; PMCID: PMC6999254,
- <sup>26</sup> Wang, N.; Yan, Z.; Liu, N.; Zhang, X.; Xu, C. Synergy of Cellulase Systems between *Acetivibrio thermocellus* and *Thermoclostridium stercorarium* in Consolidated-Bioprocessing for Cellulosic Ethanol. *Microorganisms* 2022, 10, 502. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030502>;
- Artzi, L., Bayer, E. & Morais, S. Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat Rev Microbiol* 15, 83–95 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.164>
- <sup>27</sup> Pratima Bajpai, *Xylanolytic Enzymes*, 2014
- <sup>28</sup> Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 1985;39:321-46. doi: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541. PMID: 3904603..
- <sup>29</sup> Bevezetés a prokarióták világába, Borsodi Andrea, Felföldi Tamás, Jáger Katalin, Makk Judit, Márialigeti Károly, Romsics Csaba, Tóth Erika, Bánfi Renáta, Pohner Zsuzsanna, és Vajna Balázs, Szerkesztette: Márialigeti Károly, 2013 Eötvös Loránd Tudományegyetem.
- <sup>30</sup> Dr.Tóth Erika, Új prokarióta taxonok leírása és módszerfejlesztések alkalmazott mikrobiológiai és mikrobiális ökológiai kutatások során 2020
- <sup>31</sup> Lester Hankin, Sandra L. Anagnostakis: Solid Media Containing Carboxymethylcellulose to Detect Cx Cellulase Activity of Micro-organisms; 1977; <https://doi.org/10.1099/00221287-98-1-109>
- <sup>32</sup> Jennifer Tsang, 2020, <https://asm.org/Articles/2020/February/Identifying-Bacteria-Through-Look,-Growth,-Stain>
- <sup>33</sup> J. Michael Janda, Sharon L. Abbott: 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls, 2007; doi: [10.1128/JCM.01228-07](https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07)
- <sup>34</sup> Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Oct;57(Pt 10):2259-2261. doi: 10.1099/ijs.0.64915-0. PMID: 17911292.
- <sup>35</sup> B. J. Tindall, R. Rosselló-Móra, H.-J. Busse, W. Ludwig, P. Kämpfer: Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- <sup>36</sup> [EzBioCloud.net | Search about Bacteria or Archaea](https://www.ezbiocloud.net/)