

Motivation

Ziel des Vorhabens ENCOVER ist es, ein residuales Methanpotential in Biogas-Gärresten durch optimierte Konversion insbesondere der Intermediate und eine dafür ausgelegte Prozesssteuerung zu minimieren. Im Rahmen des Teilvorhabens „Mikrobiologie“ sollen die Mechanismen der Biokonversion zu CH₄ durch zugesetztes CO₂ durch molekularbiologische Analysen der Versuche im Durchflussbetrieb aufgedeckt werden, um die Prozesse besser zu verstehen und steuern zu können. Dazu müssen simultan qualitativ hochwertige DNA und RNA der Mikrobiome möglichst quantitativ aus Fermenterproben extrahiert werden. Die Nukleinsäuren müssen für Sequenzanalysen und quantitative Realtime-PCR (qPCR) geeignet sein, um einen Vergleich zwischen Gärgemischen mit und ohne CO₂-Begasung bei unterschiedlicher Substratzusammensetzung zu ermöglichen. Das Extraktionsverfahren sollte auch schwerer lysierbare aktive Mikroorganismen erfassen, sehr gute Reproduzierbarkeit aufweisen, einfach handhabbar sein und es ermöglichen, dass bei Lagerung keine Verluste entstehen. Die Analytik sollte hochsensitiv sein, um möglichst die gesamte mikrobielle Diversität zu erfassen.

Methoden

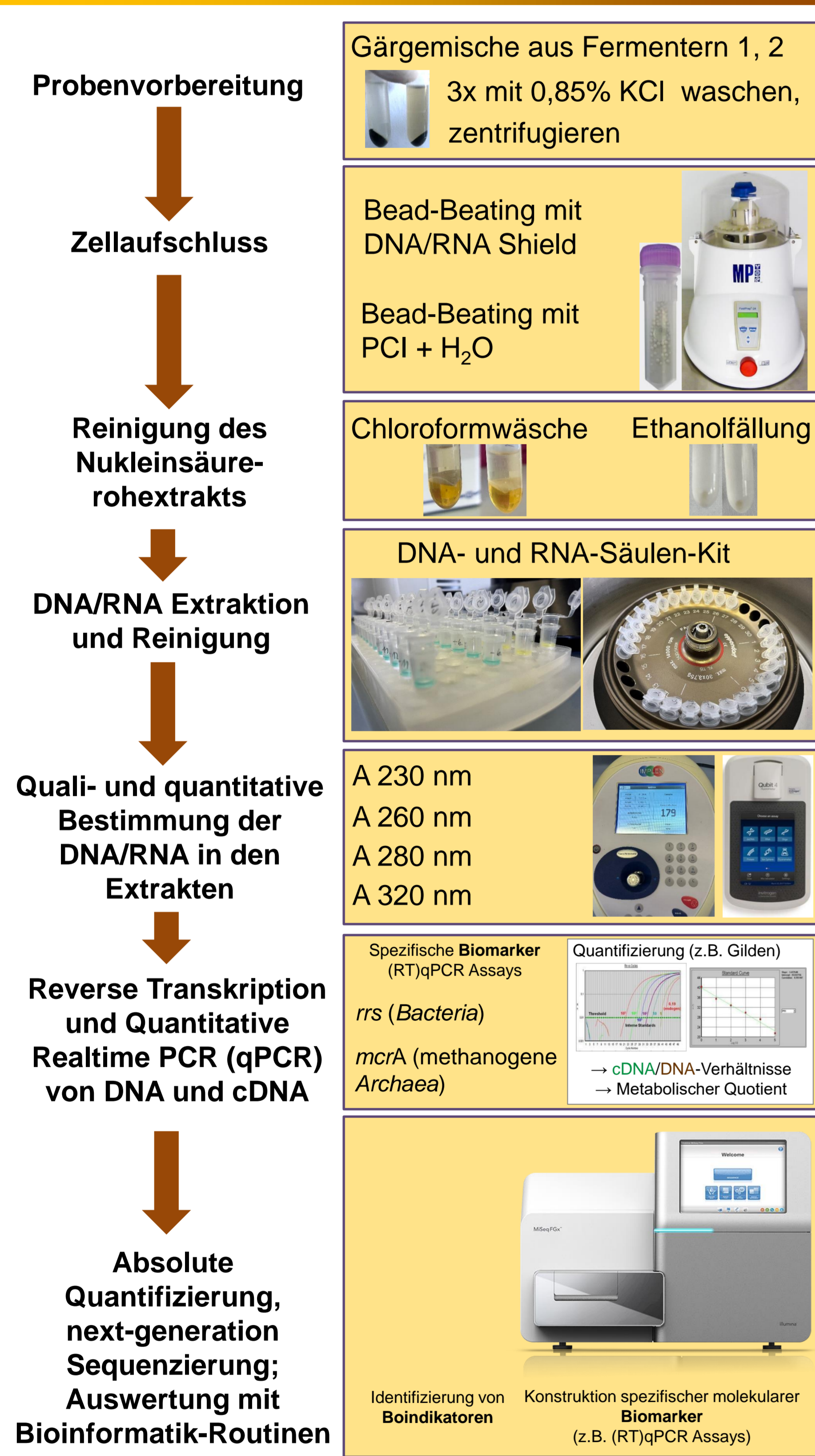


Abbildung 1: Flussschema der entwickelten molekularen mikrobiologischen Methodik

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1: Nanophotometrische und Qubit-basierte Analyse von DNA- und RNA-Proben aus 100 mg Gärgemisch-Pellets aus Fermentern 1, 2 (F1, F2), bearbeitet nach Extraktionsmethode E in Kombination mit dem Zymo Research Kit im Vergleich zur Standardmethode (A) mit Proben aus Fermenter 1 (F1)

Proben-bezeichnung	Qubit (ng/µL)	Nanophotometer (ng/µL)	A260/280	A260/230
RNA F1-1_A	11,5	20,8	1,793	0,867
RNA F1-2_A	11,3	20,4	1,821	1,000
RNA F1-1_E	33,6	92,0	2,000	2,000
RNA F1-2_E	31,2	88,0	2,000	2,000
RNA F1-3_E	32,4	118,0	1,844	1,405
RNA F2-1_E	30,8	122,0	1,968	1,694
RNA F2-2_E	31,2	114,0	2,036	1,583
RNA F2-3_E	33,2	116,0	2,00	1,813
DNA F1-1_A	24,0	34,0	1,838	1,943
DNA F1-2_A	26,3	35,0	1,868	1,919
DNA F1-1_E	143,0	179,0	1,799	2,069
DNA F1-2_E	134,0	174,0	1,799	2,006
DNA F1-3_E	122,0	180,0	1,818	2,034
DNA F2-1_E	114,0	162,0	1,790	1,851
DNA F2-2_E	100,0	162,0	1,804	1,775
DNA F2-3_E	148,0	195,0	1,814	1,970

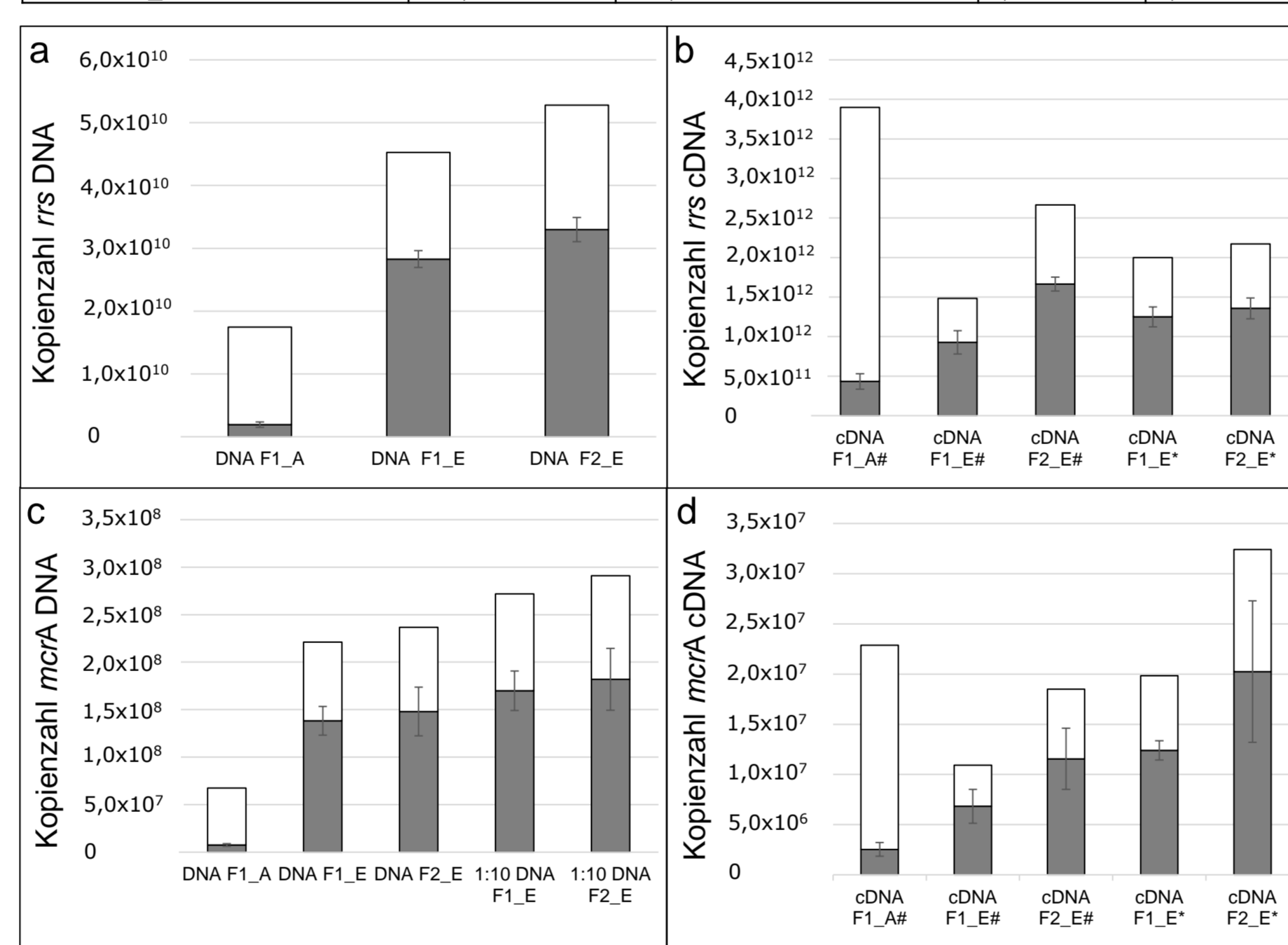


Abbildung 2: Vergleich der *rrs*-DNA (a), -cDNA (b) sowie *mcrA*-DNA (c) und -cDNA-Kopienzahl (d) aus Gärgemischen von zwei Fermentern (F1, F2) mit jeweils 3 technischen Replikaten mit Standard-Extraktionsmethode A [1] und modifizierter Methode E. Tatsächliche Ausbeute in 200 µL Extrakt (graue Balken) und kalkulierte Kopienzahl / g Gärgemisch (gesamter Balken). 1:10 verdünnte (*) und unverdünnte (#) (1:10 PCR-Verdünnung) DNase-verdaute RNA-Extrakte für die cDNA-Synthese

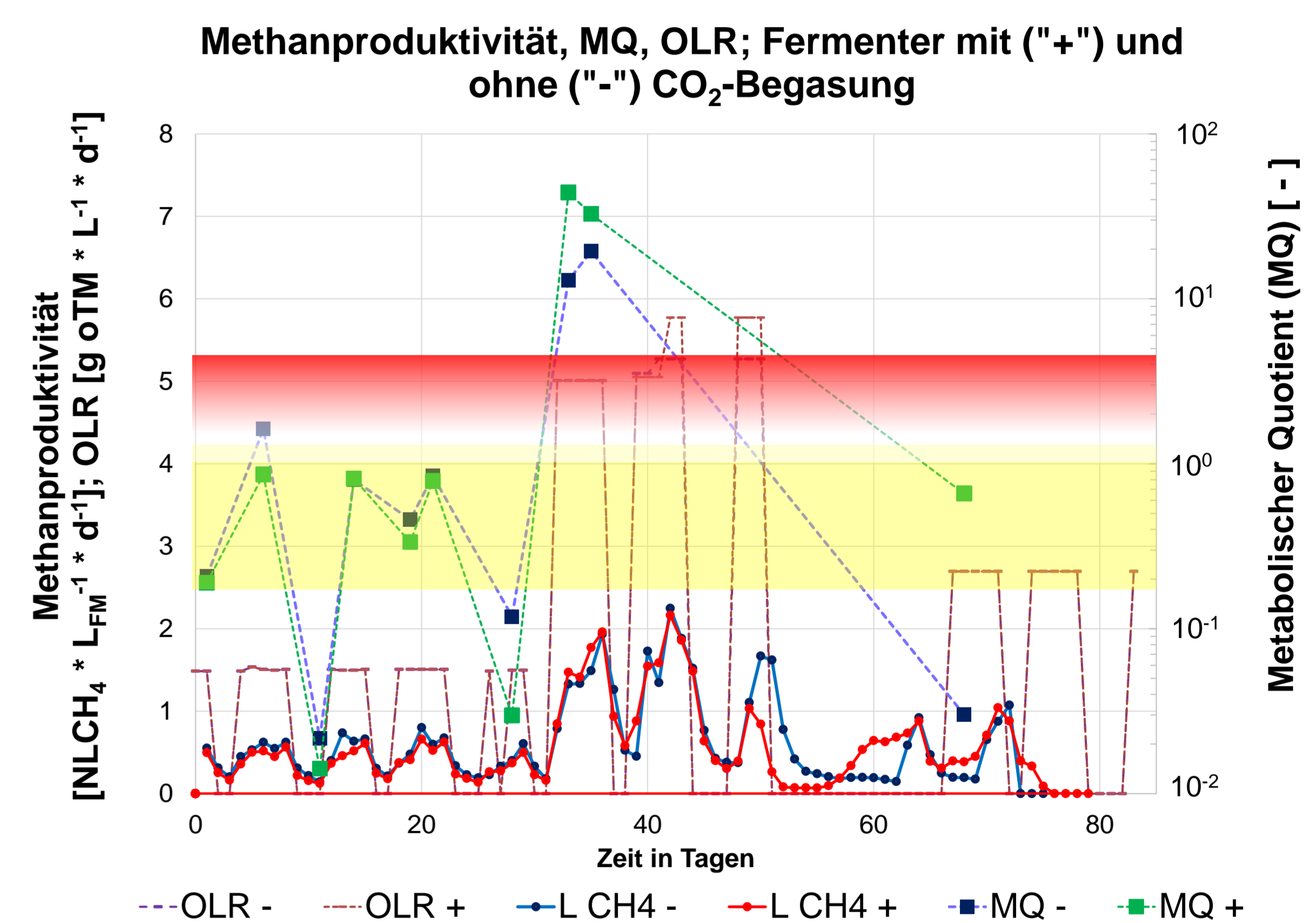


Abbildung 3: Methanproduktivität, MQ und OLR; Fermenter mit („+“), ohne („-“) CO₂-Begasung. MQ: Metabolischer Quotient; OLR: Organische Raumbelastung

Auf Basis der Standardmethode [1] wurden 8 Aufbereitungsvarianten zur Extraktion/Reinigung von Nukleinsäuren aus Gärgemischen getestet. Mit einer zusätzlichen Chloroformwäsche und Ethanol-fällung wurden sehr reine DNA- und RNA-Extrakte mit hohen Ausbeuten gewonnen (Abb. 2). Aufgrund der sensitiveren Analytik war auch die Streuung beim MQ und T/G-Verhältnis [2] vor allem bei geringer Konzentration der Zielorganismen in den Proben kleiner (Abb. 3).

Fazit

Die etablierte Routine zur molekularbiologischen Analyse von Gärgemischen [1] konnte mit geringem Bearbeitungsmehraufwand insbesondere der Sensitivität deutlich verbessert werden. Dadurch wurde es möglich, nun auch äußerst geringe Konzentrationen der Zielorganismen in den Proben, z.B. methanogene Archaeen in versauerten Prozessen, verlässlich zu quantifizieren und zu identifizieren.

Referenzen

- [1] Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., Stolze, Y., Prowe, S., Schwarz, W.H., Schlüter, A., Liebl, W., Klocke, M. (2016). DNA and RNA extraction and quantitative real-time PCR-based assays for biogas biocenoses in an interlaboratory comparison. *Bioengineering*, 3(1), 7
- [2] Lebuhn, M., Munk, B., & Effenberger, M. (2014). Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. *Energy, Sustainability and Society*, 4(1), 1-21

Gefördert durch: