

ENCOVER: energetische Nutzung von CO₂ zur Verringerung des Restmethanpotenzials – Mikrobiologie

MATHIAS WEIGOLDT, MICHAEL LEBUHN, FELIX MÜLLER, KONRAD KOCH, DANIELA POLAG

1 Einleitung

Ziel des Verbundvorhabens ENCOVER ist es, ein residuales Methanpotenzial in Biogasgärresten durch eine optimierte Konversion der Intermediate und eine dafür ausgelegte Prozesssteuerung zu minimieren. Im Rahmen des Teilvorhabens „Mikrobiologie“ sollen die Mechanismen der Bio-konversion von Kohlenstoffdioxid (CO₂) zu Methan (CH₄) durch molekularbiologische Analysen aufgedeckt werden. Um Gärgemische im Durchflussbetrieb mit und ohne CO₂-Begasung bei unterschiedlicher Substratzusammensetzung zu vergleichen und eine tiefe Nachweisgrenze zu realisieren, ist es essentiell, simultan qualitativ hochwertige DNA und RNA der Mikrobiome möglichst quantitativ aus Fermenterproben zu extrahieren. Die Nukleinsäuren müssen für Sequenzierungen und real-time quantitative PCR (qPCR) geeignet sein. Das Extraktionsverfahren sollte auch schwerer lysierbare aktive Mikroorganismen erfassen, eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufweisen sowie einfach handhabbar sein; nicht zuletzt sollten Lagerverluste minimiert werden.

2 Material und Methoden

Probenvorbereitung: Gärgemisch aus Fermenter 1 und 2 → 3 x waschen mit 0,85% steriler KCl, zentrifugieren

Zellaufschluss: Bead Beating mit DNA/RNA Shield, Bead Beating mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung + H₂O

Reinigung des Nukleinsäure-Rohextrakts: Chloroformwäsche, Ethanol-fällung

DNA/RNA Extraktion und Reinigung: ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit

Qualitative und quantitative Analyse der DNA/RNA-Extrakte: Nanophotometrische und Qubit-basierte Analyse von DNA- und RNA-Proben

Molekularbiologische Analyse der DNA- und RNA-Extrakte: spezifische Biomarker (RT)qPCR-Assays (*rrs*, Bakterien; *mcrA*, methanogene Archaea), Transkript/Gen(T/G)-Verhältnisse, metabolischer Quotient (MQ)

Next-Generation-Sequenzierung und Bioinformatik-Routinen: Analyse der Mikrobiomzusammensetzung, Identifizierung von Bioindikatoren, Konstruktion ggf. neuer spezifischer molekularer Biomarker für (RT)qPCR Assays

3 Ergebnisse

Mit einer vorgeschalteten Chloroformwäsche und Ethanol-fällung bei der Extraktion und Reinigung von Nucleinsäuren aus Gär gemischen konnten sehr reine RNA- und DNA-Extrakte mit höheren Ausbeuten als mit der Standardmethode (F1_A (Leuhn et al. 2016 in Abb. 1)) gewonnen werden, wie die bei der modifizierten Methode deutlich geringeren Differenzen zwischen kalkulierter Kopienzahl/g Gär gemisch und tatsächlicher Ausbeute (in 200 µL Extrakt) zeigen. Aufgrund der geringen Standardabweichung der technischen Replikate und der sensitiveren Analytik konnten auch geringere Unterschiede als bislang zwischen den Bakterien und den methanogenen Archaea in den beiden Fermentern identifiziert werden.

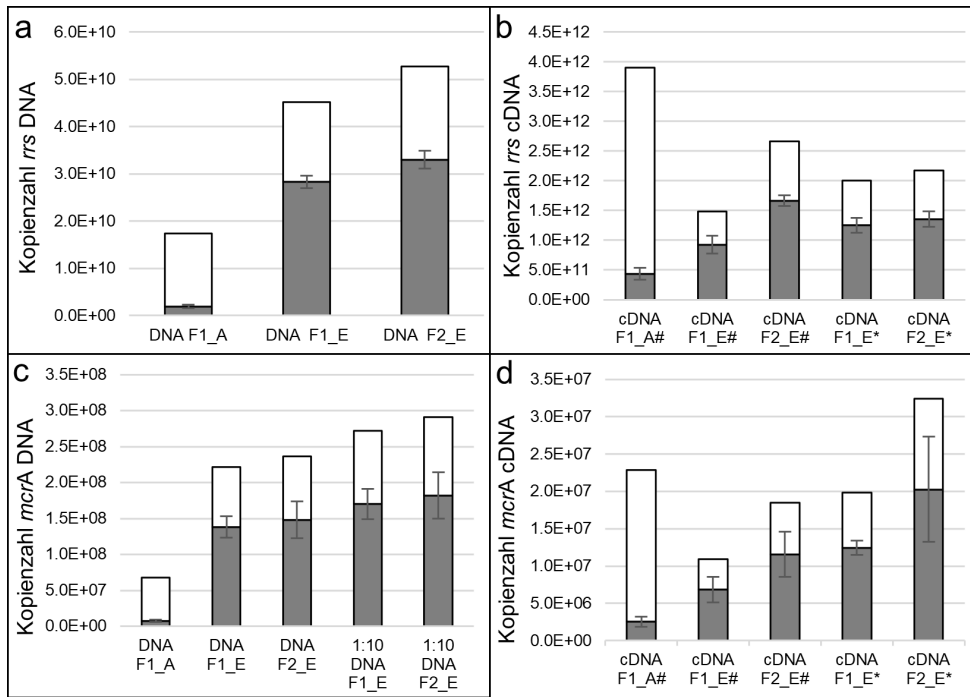


Abb.1: Vergleich der *rrs*-DNA (a), -cDNA (b) sowie *mcrA*-DNA (c) und -cDNA-Kopienzahl (d) aus Gär gemischen von zwei Fermentern (F1, F2) mit jeweils 3 technischen Replikaten mit Standardextraktionsmethode A (Leuhn et al. 2016) und modifizierter Methode E. Tatsächliche Ausbeute in 200 µL Extrakt (graue Balken) und kalkulierte Kopienzahl/g Gär gemisch (gesamter Balken). 1:10 verdünnte (*) und unverdünnte (#) (1:10 PCR-Verdünnung) DNase-verdaute RNA-Extrakte für die cDNA-Synthese. (© Weigoldt)

Literatur

Lebuhn, M. et al. (2016): DNA and RNA extraction and quantitative real-time PCR-based assays for biogas biocenoses in an interlaboratory comparison. *Bioengineering* 3(1), 7, doi: 10.3390/bioengineering3010007

Förderhinweis

Dieses Projekt (FKZ 2220NR137C) wird gefördert vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.