

11
102
1004

Leibniz
Universität
Hannover

Dynamik des Intermediärmetabolismus
während der anaeroben Fermentation (MODISTO)

LUH Projekt Teil 3

Mikrobiologie des anaeroben Intermediärmetabolismus

Ziele

Aufgabenbereiche des Projektteils 3:

- Bestimmung von **Produkten, Intermediaten** und **Inhibitoren** der Biogasproduktion durch **Flüssig- und Gaschromatographie**
- Identifikation
 - **aktiver Mikroorganismen und metabolischer Prozesse** durch Verfolgen der Verwertung ^{13}C markierter Substrate mittels **Sequenzierung der schweren RNA** und **LC-MS**
 - **Wasserstoff-verwertender** Organismen basierend auf bekannten/ modifizierten Sequenzen durch **qPCR**
- **Isolierung** und Charakterisierung von **primären Gärern, Syntrophen** und **Methanogenen**

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

- Auftrennung von **Zucker**, **organischen Säuren** und **Alkohole**
- mittels **Applichrom ABOA SugarSep**
- Messung der **Absorption** bei 205 nm (DAD) und **Brechungsindex** (RID)
- **Standards** mit Retentionszeiten (RT); 0,4 ml/min, 80°C, 4 mM H₃PO₄:

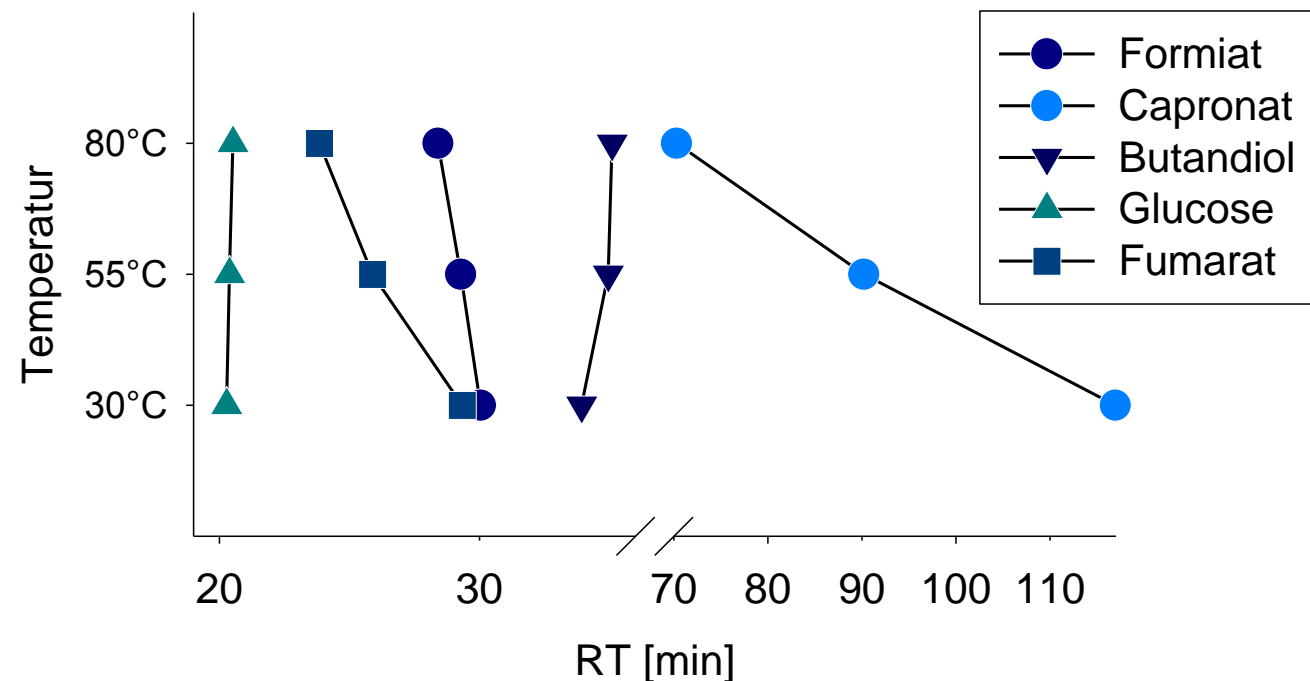
Verbindung	Cellobiose	Glucuronat	Glucose	Succinat	Fumarat	Lactat	Acetat	Formiat
RT [min]	17,975	19,763	20,515	23,083	23,841	25,018	26,237	28,4

Verbindung	Propionat	Butandiol	Isobutyrat	Butyrat	Ethanol	Isovaleriat	Valeriat	Butanol
RT [min]	32,33	35,099	36,044	38,3	40,864	43,750	50,157	66,554

Verbindung	Capronsäure
RT [min]	70,302

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

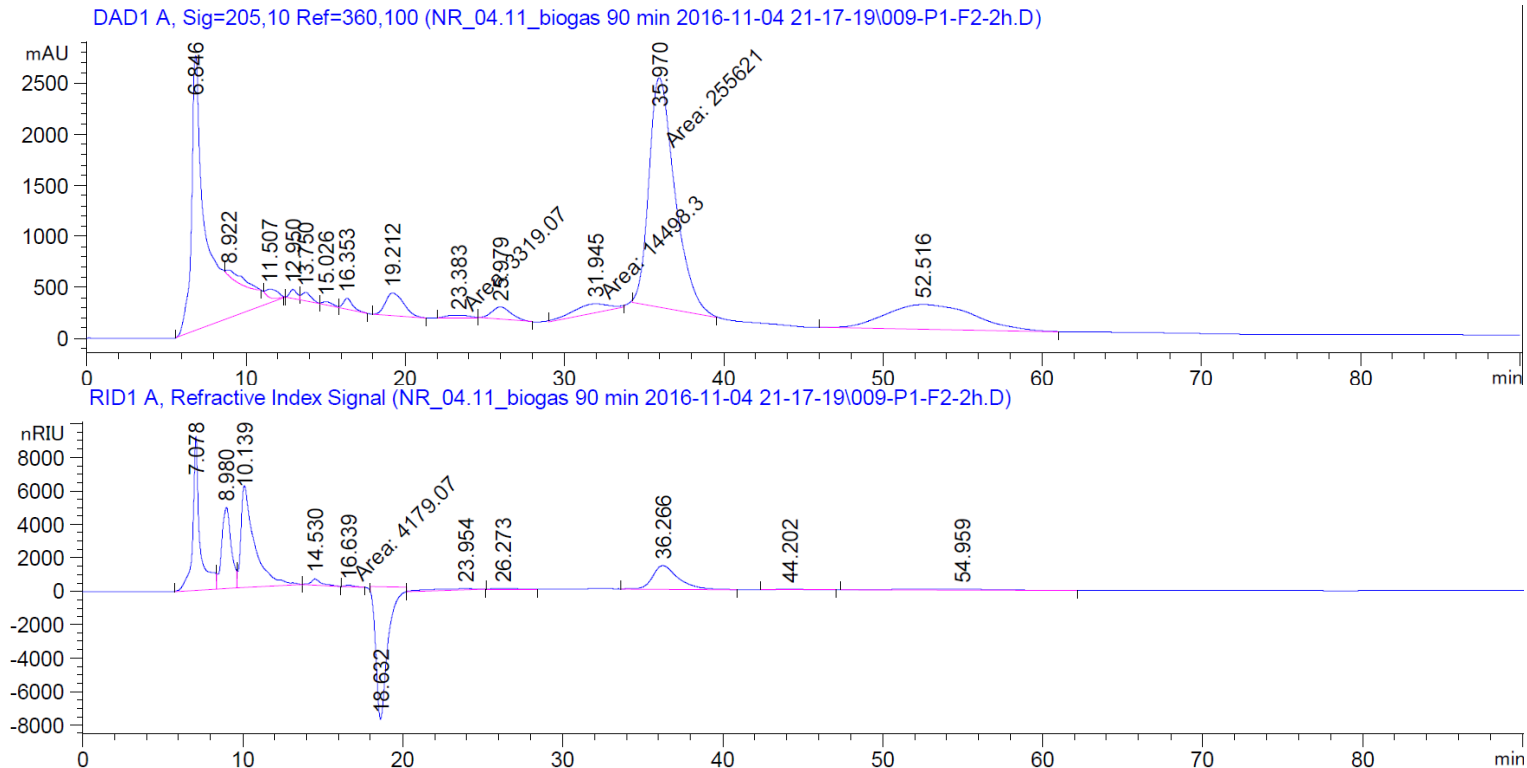
- Auftrennung teilweise ungenügend
- Variation der **Temperatur**



- Untersuchung verschiedener **Laufmittel** geplant

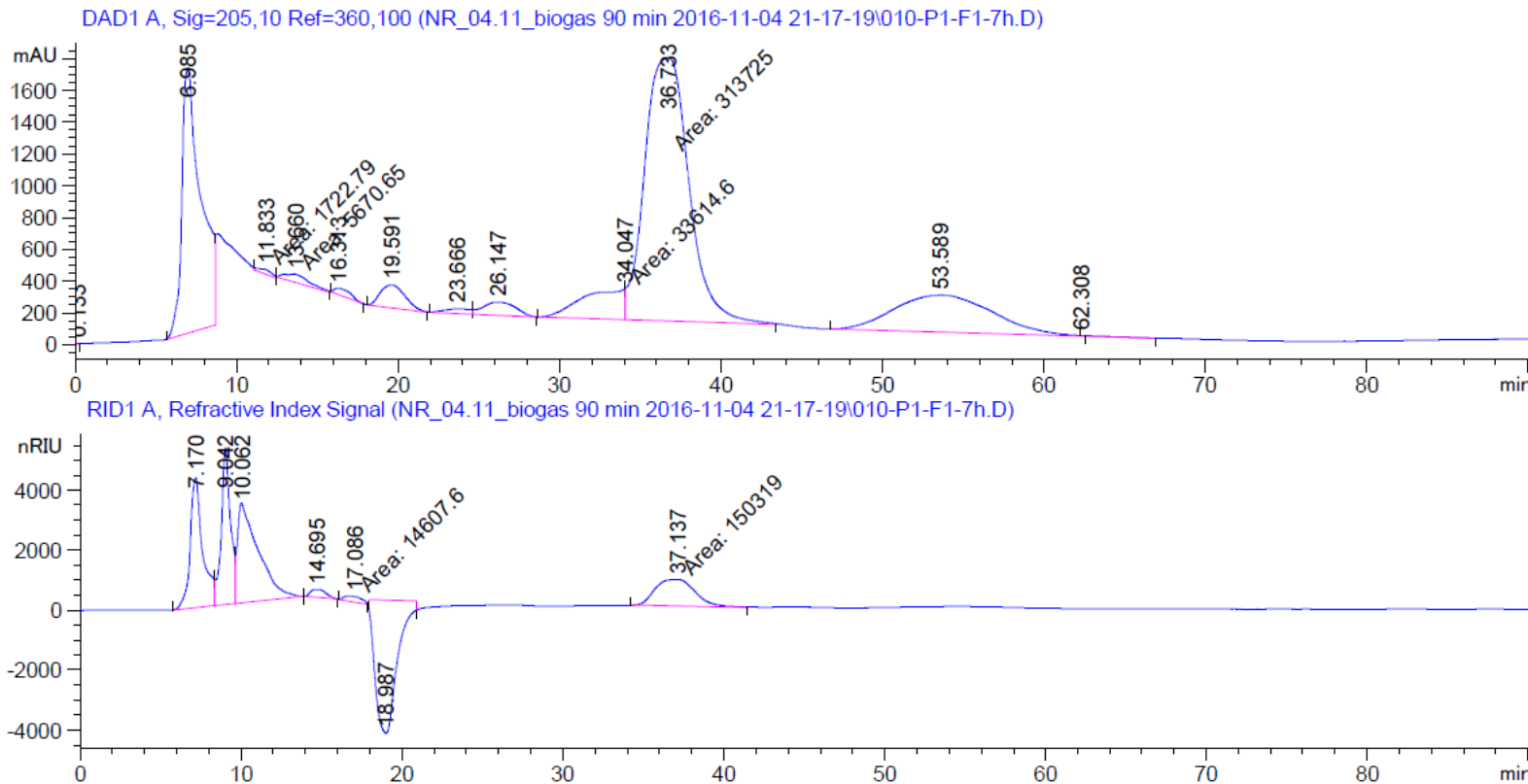
HPLC – High Performance Liquid Chromatography

- Fermenterprobe (0,8 ml/min, 75°C, 4 mM H₃PO₄)
 - Probenvorbereitung: Zentrifugation für 1 h bei 30.000xg; Filtration 0,2 µm
- 2 h nach Fütterung



HPLC – High Performance Liquid Chromatography

- Fermenterprobe (0,8 ml/min, 75°C, 4 mM H₃PO₄)
 - Probenvorbereitung: Zentrifugation für 1 h bei 30.000xg; Filtration 0,2 µm
- 7 h nach Fütterung



Markierungsversuch

13-C Mais kommt bald an

- Bestimmung der **13-C** markierten Intermediate:
 - Reparatur des LC-MS am 20.02.
 - Quantifizierung von Mono- und Dicarbonsäuren, funktionalisierten Monocarbonsäuren und aromatischen Säuren
- **SIP-Experiment** (Fraktionierung der schweren RNA):
 - Untersuchung verschiedene Stabilisierungspuffer:
 - RNAlater (chaotrope Salze)
 - RNA-Stabilisator (Phenol, Mercaptoethanol, SDS, EDTA, pH 5,2)
 - Untersuchung verschiedener Extraktionsmethoden
 - CTAB basierte Phenol – Chloroform Extraktion (nach Griffiths et al., 2000)
 - Kit basierte Extraktion (DNA+RNA+Protein Extraction Kit – roboklon)

Markierungsversuch

- **Probennahme alle 2 Stunden** während Markierungsversuch (für HPLC, LC-MS, RNA-Extraktion, GC-MS)



- **Analyse der ^{13}C markierten Produkte** für jeden Zeitpunkt → Bestimmung der Aktivität der Mikroorganismen



- Auf dieser Basis: **RNA-Extraktion von 3 unterschiedlichen Zeitpunkten, SIP und Sequenzierung** der schweren und leichten Fraktion (Bestimmt durch Dichte der Fraktion, qPCR und DGGE)

DNA/ RNA-Extraktion

- Untersuchung der **Reinheit, Menge und Qualität der Extrakte**
 - Absorption bei **260 nm**, Quotient **260/280** und **260/230**
- Extraktion von 0,5 g Fermenterinhalt:
- $c = 130 - 148 \text{ ng}/\mu\text{l}$ $A_{260/230} = 1,17 \text{ (2,0 - 2,2)}$,
 $A_{260/280} = 1,49 \text{ (1,8/ 2,0)}$
- Quanti-IT **RiboGreen** RNA Assay Kit
 - **Agarosegel** oder Bioanalyzer (16S rRNA und 23S rRNA)
 - **PCR/qPCR**
 - verschiedene Verdünnungsstufen zum Testen der Inhibition der PCR

qPCR NiFe-Hydrogenasen

- **Heterodimer aus mindestens Untereinheiten;** große mit katalytischem NiFe-Zentrum, kleine mit konservierten $[\text{Fe}_x\text{-S}_x]$ -Clustern
- **5 Gruppen**, mehrere Untergruppen:
 - **Gruppe 1:** membrangebundenen Hydrogenasen; **Oxidation H_2**
 - **Gruppe 2a:** **cyanobakterielle** Hydrogenase; **Oxidation H_2**
 - **Gruppe 2b:** **regulatorische** Hydrogenase und Rezeptor von H_2
 - **Gruppe 3a:** Hydrogenase in **Methanogenen**; **Oxidation H_2** zur Reduktion von F_{420}
 - **Gruppe 3b:** v.a. **thermophile Archaea**
 - **Gruppe 3c:** v.a. **Methanogene**; **Oxidation H_2** zur Elektronenbifurkation
 - **Gruppe 3d:** **bidirektionale** Hydrogenase; aerobe Organismen: **Oxidation H_2 zur Reduktion von NAD^+** ; **Cyanobakterien: H_2 Produktion**

qPCR NiFe-Hydrogenasen

Indirekter Nachweis aller NiFe-Hydrogenasen über hypD
wichtiges Protein zur Entwicklung der Hydrogenase,
stark konserviert (Beimgraben *et al.*, 2014)

- **5 Gruppen**, mehrere Untergruppen:

- **Gruppe 4:** membrangebundene Hydrogenasen; **oft bidirektional; zur Energiekonservierung → H₂ Produktion/Oxidation**; oft gekoppelt mit Aufbau/Abbau Ionengradient, wichtig bei **Gärungsprozessen**
- **Gruppe 5:** **Oxidation H₂** bei niedrigen Konzentrationen

→ zu kurze und stark verteilte konservierte Motive für degenerierten, allgemeinen Primer; nicht sinnvoll

→ vor allem Gruppe 4 interessant, vielleicht 3d, 1

- **Primer:**

	paper	gDNA	cDNA
Gruppe 4 allgemein	Schmidt <i>et al.</i> , 2011	x	
Gruppe 4, Gammaproteobakteria	Schmidt <i>et al.</i> , 2011		x
Gruppe 1 Bakterien	Masterarbeit Hilgarth, 2013	x	
Gruppe 1 Archaeaen	Masterarbeit Hilgarth, 2013	x	
Gruppe 3d	Barz <i>et al.</i> , 2010	x	

qPCR NiFe-Hydrogenasen

- Zusätzlich: **16S rRNA Analyse von Bakterien und Archaeen**
- **Normierung:** - **quantitativ:** qPCR mit definiertem template (über Klonierung und Einsatz des geschnittenen Plasmids)
- **qualitativ:** rpoB für mRNA (Dahllöf *et al.*, 2000)

Besprechungsbedarf!

Zentrale DNA Extraktion, RT-PCR und Gegenstrangsynthese?

RT mit T4 Gp 32 Protein (stabilisiert ssDNA)

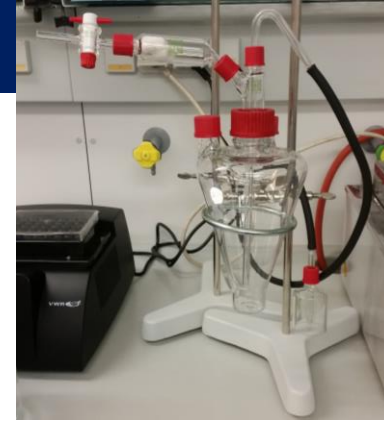
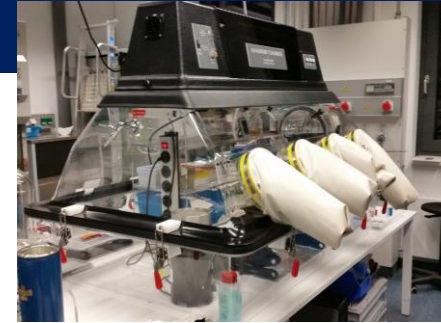
Abgleich der Primer für die 16S rRNA qPCR

Gleiche Methode zur Quantifizierung

Einheitliche Datenauswertung (qPCR – Regression oder Schwellenwert)

Isolierung von primären Fermentern, Syntrophen und Methanogenen

- **Anoxische Bedingungen**
 - Anaerobenbank
 - Kulturgefäß nach Widdel
 - Hungate Technik/ Tiefagar
 - **Anreicherungskulturen und Verdünnungsreihe**
 - **MPN** (most propable number) - **Verdünnungsreihe** ($10^{-1} - 10^{-8}$)
 - **Substrat**
 - primäre Fermenter: Xylan, Pektin, Glucose
 - Syntrophe: Propionsäure, Buttersäure
 - für definierte, ternäre Kulturen Zusatz von *Methanosaeta soenghenii* und *Methanospirillum hungatei*
 - Methanogene: Acetat, $\underbrace{\text{Formiat, H}_2/\text{CO}_2}_{\text{+ Acetat}}$
- immer filtrierter Gärrest als Supplement!



Danke schön!