

Bernburg
Dessau
Köthen



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

FB 7 Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik (BWP)

**Molekularbiologische Charakterisierung mikrobieller Populationen in
zweistufigen Biogasanlagen**

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Engineering (B.Eng.)

Franziska Brandt

Mat. Nr.: 4054105

Studiengang: Pharmatechnik

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Christiana Cordes

2. Gutachter: Frau Dipl. oec. troph. Dorit Binder

Datum der Abgabe: 08.07.15

Bibliographische Beschreibung

Brandt, Franziska

Thema der Bachelorarbeit: „Molekularbiologische Charakterisierung mikrobieller Populationen in zweistufigen Biogasanlagen“

2015 / 52 Seiten / 33 Abbildungen / 22 Tabellen / 9 Anlagen

Bernburg: Hochschule Anhalt

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik

Bachelorarbeit

Autorreferat

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden Mikroorganismen zu identifizieren, die in Proben aus der Versäuerungsstufe von zweistufigen Biogasanlagen enthalten sind. Zum Erreichen dieses Ziels werden der Zellaufschluss und die Isolierung der DNA aus der Biomasse optimiert. Des Weiteren wird die Kolonie-Polymerasekettenreaktion durchgeführt.

Die Untersuchung der zu verschiedenen Zeitpunkten gelieferten Proben erfolgt mit folgenden Methoden: Bestimmung der Anzahl aerober (mikroaerophiler) Keime, Zellaufschluss und DNA-Isolierung, Kolonie-Polymerasekettenreaktion mit universellen Bakterienprimern und dem Anlegen einer Klonbibliothek.

Die erzielten Ergebnisse bieten die Grundlage für die molekularbiologische Charakterisierung der mikrobiellen Population in der ersten Stufe von zweistufigen Biogasanlagen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Einleitung und Zielstellung.....	7
2 Theoretische Grundlagen	8
2.1 Biogas und Biogasbildung.....	8
2.1.1 Biogas.....	8
2.1.2 Biogasbildung.....	9
2.2 Mikroorganismen in Biogasanlagen	10
2.2.1 Arten von Mikroorganismen in Biogasanlagen.....	10
2.2.2 Mikroorganismen in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe.....	11
3 Materialien und Methoden	13
3.1 Probenmaterial, Chemikalien, Medien und Lösungen.....	13
3.1.1 Probenmaterial.....	13
3.1.2 Chemikalien	13
3.1.3 Agarmedien und Lösungen.....	14
3.2. Primer, Kits, Materialien und Geräte	15
3.2.1 Primer	15
3.2.2 Kits und Materialien.....	15
3.2.3 Geräte.....	16
3.3 Methoden	18
3.3.1 Lebendzellzahlbestimmung und Masterplatten	18
3.3.2 Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese.....	19
3.3.3 Sequenzvergleich.....	22
3.3.4 Optimierung der DNA-Isolierung	23

3.3.5 DNA-Klonierung und Isolierung des übertragenden Plasmides	24
4 Ergebnisse und Diskussion.....	29
4.1 Ergebnisse	29
4.1.1 Lebendzellzahlbestimmung und Masterplatten	29
4.1.2 Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese.....	32
4.1.3 Sequenzvergleich.....	35
4.1.4 Optimierung der DNA-Isolierung	36
4.1.5 DNA-Klonierung und Isolierung des übertragenden Plasmides	40
4.2 Diskussion.....	43
4.2.1 Lebendzellzahlbestimmung und Masterplatten	43
4.2.2 Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese.....	45
4.2.3 Sequenzvergleich.....	46
4.2.4 Optimierung der DNA-Isolierung	46
4.2.5 DNA-Klonierung und Isolierung des übertragenden Plasmides	47
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	48
Literaturverzeichnis.....	49
Anlagenverzeichnis	51
Eidesstaatliche Erklärung.....	52

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	min	Minuten
Amp	Ampicillin	MO	Mikroorganismen
ATP	Adenosintriphosphat	ng	Nanogramm
ca.	circa	PC	Plate Count
dest.	destilliert	PCR	Polymerasekettenreaktion
d.h.	das heißt	rpm	1/60s = Umdrehungen pro min
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	s	Sekunden
g	Gramm	s.	siehe
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	T	Temperatur
kb	Kilobasenpaare	Tab.	Tabelle
KbE	Kolonien bildende Einheiten	TAE	Tris-Acetat-EDTA
kbp	Kilobasenpaare	UV	Ultraviolettstrahlung
LZZ	Lebendzellzahl	V	Volt
MC	Mac Conkey	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
μ l	Mikroliter	z.B.	zum Beispiel
ml	Milliliter		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Biogasbildung.....	9
Abb. 2 Mikroorganismen in Biogasanlagen	11
Abb. 3 Einteilung der vorkommenden Bakterien in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe	12
Abb. 4 Berechnung der Lebendzellzahl/ml	18
Abb. 5 Beispiel Masterplatte	19
Abb. 6 links Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, rechts Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific.....	22
Abb. 7 Formel zur Berechnung der Masse an PCR-Produkt	25
Abb. 8 Formel zur Berechnung der Transformationseffizienz.....	26
Abb. 9 Selektion der positiven Klone mit Blau-Weiß-Screening, Quelle: Brown, 2011 ..	26
Abb. 10 pGEM [®] -T Vektor, Quelle: Promega.....	27
Abb. 11 Restriktionsenzyme, die den pGEM [®] -T Vektor nicht schneiden, Quelle: Promega	28
Abb. 12 Lebendzellzahlbestimmung 29.01.15 Biogasprobe vom 26.11.14	29
Abb. 13 Lebendzellzahlbestimmung 11.02.15 Biogasprobe vom 10.02.15	30
Abb. 14 Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} auf dem Plate Count Agar, Probe 10.02.15 ..	30
Abb. 15 Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} auf dem Nutrient Agar, Probe 10.02.15	30
Abb. 16 Masterplatten: PC Agar, Nutrient Agar, MC Agar (Kolonien von Nutrient 10^{-2})	31
Abb. 17 Masterplatten: PC Agar, Nutrient Agar, MC Agar (Kolonien von PC 10^{-2}).....	31
Abb. 18 Kolonie-PCR vom 17.02.15 mit Primerkombination 1 (63f/1387r) und Primerkombination 2 (EUB338f/1387r).....	33
Abb. 19 PCR-Produkte ohne und mit RNase-Behandlung 18.02.15	33
Abb. 20 Kolonie-PCR vom 18.02.15 mit Primerkombination 1 (63f/1387r) und Primerkombination 2 (EUB338f/1387r).....	34
Abb. 21 Kolonie-PCR vom 03.03.15 mit Primerkombination 2 (EUB338f/1387r).....	34
Abb. 22 Diagramm der identifizierten Mikroorganismen, Quelle: Frau Dipl. oec. troph. Dorit Binder.....	35
Abb. 23 DNA-Isolierung vom 26.01.15 Variation Puffer/Matrix (Probe 26.11.14)	36
Abb. 24 DNA-Isolierung vom 03.02.15 Variation Puffer/Matrix (Probe 26.11.14)	37
Abb. 25 DNA-Isolierung vom 04.02.15 Variation Schüttelzeit/Matrix (Probe 26.11.14) .	37
Abb. 26 DNA-Isolierung vom 05.02.15 Variation Aufschlusszeit/Matrix (Probe 26.11.14)	38

Abb. 27 DNA-Isolierung vom 11.02.15 Variation Aufschlusszeit (Probe 10.02.15).....	38
Abb. 28 DNA-Isolierung 11.02.15 1.1 bis 4.1 und Durchflüsse 1.2 bis 4.2	39
Abb. 29 DNA-Isolierung vom 16.02.15 Variation Aufschlusszeit (Probe 10.02.15).....	39
Abb. 30 optimierte DNA-Isolierung	40
Abb. 31 PCR mit DNA-Isolierung 09.03.15 mit Primerkombination 1 (63f/1387r) und Primerkombination 2 (EUB338f/1387r).....	41
Abb. 32 Plasmidisolierung pGEM [®] -T Vektor 19.03.15.....	42
Abb. 33 Einzelverdau der Plasmide mit EcoRI 20.03.15	43

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Chemikalien.....	13
Tab. 2 Medien.....	14
Tab. 3 Lösungen.....	15
Tab. 4 universelle Bakterienprimer, Firma Metabion	15
Tab. 5 Kits	15
Tab. 6 Materialien.....	16
Tab. 7 Geräte	16
Tab. 8 PCR-Ansatz für chromosomale DNA und Kolonie-PCR.....	20
Tab. 9 Kolonie-PCR-Programm.....	21
Tab. 10 Empfehlungen zur Probenvorbereitung (Firma SEQLAB)	22
Tab. 11 Reagenzien für den Ligationsansatz, pGEM [®] -T Vektor Systems	25
Tab. 12 Reagenzien für einen Einzelverdau.....	28
Tab. 13 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 17.02.15.....	33
Tab. 14 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 18.02.15.....	33
Tab. 15 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 18.02.15.....	34
Tab. 16 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 03.03.15.....	34
Tab. 17 DNA-Konzentration und Reinheit Proben 11.02.15	39
Tab. 18 DNA-Konzentration und Reinheit der DNA-Isolierungen vom 16.02.15, Probe 10.02.15.....	41
Tab. 19 Beschreibung der PCR vom 09.03.15	41
Tab. 20 DNA-Konzentration und Reinheit der PCR-Produkte	41
Tab. 21 Anzahl der KbE und Verhältnis von blau zu weiß.....	41
Tab. 22 rechts: DNA-Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA.....	42

1 Einleitung und Zielstellung

Das durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. geförderte Forschungsprojekt „AcEta“ (FKZ 22011413) befasst sich mit der bioprozesstechnischen Optimierung zweistufiger landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Im Rahmen des Projektes wird eine molekularbiologische Populationsanalyse zur Charakterisierung von hydrolytischen und acidogenen Mikroorganismen durchgeführt.

Im Gegensatz zu einstufigen Biogasanlagen lässt sich der Prozess bei zweistufigen Anlagen besser optimieren, da Hydrolyse und Acidogenese sowie Acetogenese und Methanogenese in räumlich getrennten Biogasreaktoren nacheinander ablaufen. Bei konventionellen Biogasanlagen verläuft der Prozess in einem Reaktor ab. An dem Prozess der Biogasbildung sind verschiedene Mikroorganismen beteiligt, die unterschiedliche Lebensbedingungen benötigen. Der pH-Wert und die Temperatur sind dabei wesentliche Faktoren. Bei einstufigen Biogasanlagen lässt sich kein Gleichgewicht zwischen Säureproduktion und -verbrauch einstellen (Busch, 2014). Zudem erfolgt ein unvollständiger Abbau des Substrates durch die lange Verweilzeit, Sedimentation oder Aufschwimmen (Busch, 2014).

Da Hydrolyse und Methanisierung in zweistufigen Biogasreaktoren getrennt ablaufen, lassen sich für beide Schritte jeweils unterschiedliche Prozessparameter einstellen (Busch, 2014). Somit können z.B. der pH-Wert und die Temperatur für beide Schritte angepasst werden, sodass die Lebensbedingungen für die Mikroorganismen in Hydrolyse und Methanisierung optimiert werden können. Das Anpassen der Prozessparameter an die einzelnen Schritte kann zur Erhöhung der Ausbeute und Methankonzentration und Verkürzung der Verweilzeit führen (Busch, 2014).

Zielstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der molekularbiologischen Untersuchung der Biomasse aus der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe. Ziel der Arbeit ist es, den Zellaufschluss der Biomasse und die Isolierung der DNA so zu optimieren, dass daraus geeignetes Material für die Durchführung der PCR gewonnen wird. Die PCR wird mit universellen Bakterienprimern durchgeführt und die PCR-Produkte werden für das Erstellen einer Klonbibliothek eingesetzt. In der Kolonie-PCR werden unterschiedliche universelle Bakterienprimer untersucht. Durch die Optimierung der Methoden sollen möglichst viele Arten von Mikroorganismen identifiziert werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biogas und Biogasbildung

2.1.1 Biogas

Die Biomasse ist die Ausgangssubstanz für die Biogasanlage. Bei zweistufigen Biogasanlagen werden vor allem landwirtschaftliche und industrielle Abfälle als Substrat verwendet (Köllmeier, 2013). Landwirtschaftliche Substrate sind z.B. Silomais, Getreideschrot, Grassilage und Gülle (Eder, 2007). Zu den industriellen Abfällen gehören beispielsweise Speiseabfälle und Schlachtabfälle.

Im Zuge des Projektes „AcEta“ werden mehrere zweistufige Biogasanlagen untersucht. Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden aus der offenen Versäuerungsstufe entnommen. Der pH-Wert der frischen Proben beträgt 6,65 bei 19,7°C. Die entnommene Biomasse vom 10.02.15 setzt sich aus Gülle, Stroh, Tierkot und Mais zusammen.

Die Temperatur in der Versäuerungsstufe beträgt ca. 25°C. In den Behälter wurde Eisen-(II)-Chlorid zugeführt, um den pH-Wert abzusenken und zur Entschwefelung der Biomasse. Die Verweilzeit der Biomasse in der Versäuerungsstufe beträgt ca. 5 Tage. Anschließend wird die Biomasse in den geschlossenen Fermenter gepumpt und verweilt dort ca. 28 Tage bei 40°C.

Biogas setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, der Gehalt der einzelnen Bestandteile ist abhängig von der Art des Substrates und dem Typ der Biogasanlage. Im Durchschnitt enthält Biogas 60% Methan, 35% Kohlenstoffdioxid, 1% Stickstoff und 0,3% Sauerstoff (Prüß, 2008). Neben den Hauptbestandteilen enthält Biogas noch in geringen Mengen Wasserstoff, Schwefelwasserstoff und Ammoniak.

Die Biogaserzeugung gewinnt zunehmend an Bedeutung, da die Energie aus nachwachsenden Rohstoffen und organischen Substanzen erzeugt wird und somit erneuerbar ist.

Die Erzeugung von Biogas ist zudem umweltfreundlich, da sich das entstehende Kohlendioxid im natürlichen Kohlenstoffkreislauf bewegt und nicht zu einer Zunahme der Konzentration in der Atmosphäre führt (Eder, 2007). Biogas wird vor allem zur Stromerzeugung eingesetzt, aber auch zum Heizen und zur Warmwasserbereitung (Eder, 2007).

2.1.2 Biogasbildung

Der Prozess der Biogasbildung ist ein natürlicher Vorgang, bei dem komplexe organische Moleküle durch verschiedene Bakterien zersetzt werden. Die Bildung von Methan findet nur im anaeroben Milieu ohne Nutzung von Sauerstoff statt (Eder, 2007). Der Abbau des Substrates erfolgt in vier Schritten und ist in Abb. 1 dargestellt.

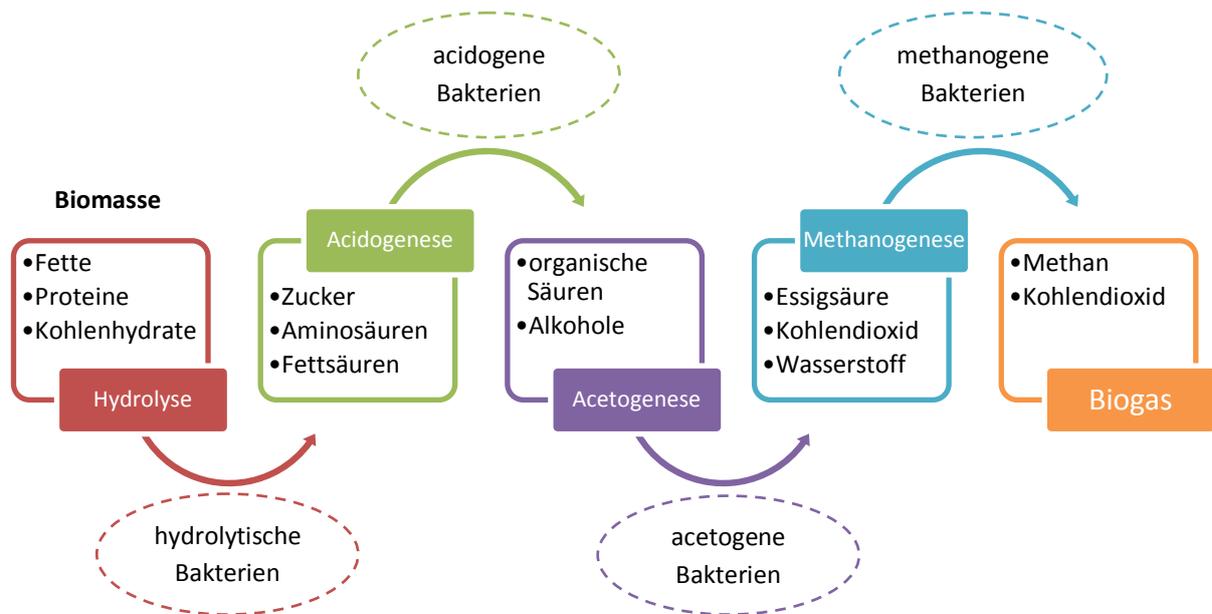


Abb. 1 Biogasbildung

Im ersten Schritt, der Hydrolyse, werden Makromoleküle wie Kohlenhydrate, Proteine und Fette von aeroben, hydrolytischen Bakterien durch extrazelluläre Enzyme in kurzkettige organische Verbindungen wie Zucker, Aminosäuren und Fettsäuren aufgespalten. Die Dauer der Aufspaltung ist abhängig von der Aktivität der extrazellulären Enzyme wie z.B. Cellulasen, Amylasen und Lipasen und von dem pH-Wert.

Durch acidogene Bakterien werden diese Verbindungen versäuert und es entstehen methanogene Substanzen z.B. Acetat und nicht methanogene Substanzen z.B. Alkohol. Die acidogenen Bakterien sind fakultativ anaerob, d.h. sie verbrauchen den restlichen Sauerstoff und sorgen somit für das von den methanogenen Bakterien benötigte anaerobe Milieu. Bei diesem Vorgang nimmt der pH-Wert ab.

Die nicht methanogenen Moleküle werden durch acetogene Bakterien in Essigsäure, Kohlendioxid und Wasserstoff zerlegt. Die Bakterien reduzieren Wasserstoff und sind sehr empfindlich gegenüber Temperaturschwankungen.

Den letzten Schritt der Biogasbildung stellt die Methanogenese dar. Dabei werden die methanogenen Verbindungen durch streng anaerobe methanbildende Bakterien in Methan und Kohlendioxid umgesetzt. Der pH-Wert liegt bei diesem Vorgang im neutralen bis schwach alkalischen Bereich. 90% des gesamten Methans werden in dieser Phase produziert, 70% stammen aus der Essigsäure (Eder, 2007).

Der Abbauprozess des organischen Materials in den vier Schritten verläuft mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, da aerobe Bakterien deutlich kürzere Generationszeiten als anaerobe Bakterien besitzen. Die Essigsäure- und Methanbildung verlaufen daher langsamer als die Hydrolyse und Versäuerung.

2.2 Mikroorganismen in Biogasanlagen

2.2.1 Arten von Mikroorganismen in Biogasanlagen

Die Art und Vielfalt der Mikroorganismen in der Biogasanlage ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Der pH-Wert beeinflusst die Aktivität der Bakterien, wenn dieser außerhalb des Optimums liegt, nimmt die Aktivität der Bakterien ab (Eder, 2007).

Die Bakterien benötigen eine ausreichende Nährstoffversorgung, die durch Zugabe von Gülle, Mist, Gras oder Mais gewährleistet wird (Eder, 2007). Durch die Zerkleinerung des Substrates entsteht eine große Oberfläche, sodass die Bakterien die Biomasse besser abbauen können. Außerdem kann eine Überfütterung der Bakterien durch gleichmäßige Zufuhr des Substrates verhindert werden.

Die vorkommenden Mikroorganismen in Biogasanlagen werden in drei Gruppen unterteilt (Abb. 2). Die Hydrolyse und Versäuerung werden durch hydrolytische und acidogene Bakterien durchgeführt. Diese stellen eine Mischkultur aus fakultativ und obligat anaeroben Mikroorganismen dar.

Die Acetogenese erfolgt durch acetogene Bakterien, die obligat anaerob sind. An der Methanbildung sind die obligat anaeroben methanogenen Mikroorganismen beteiligt (Schmidt, 1996).

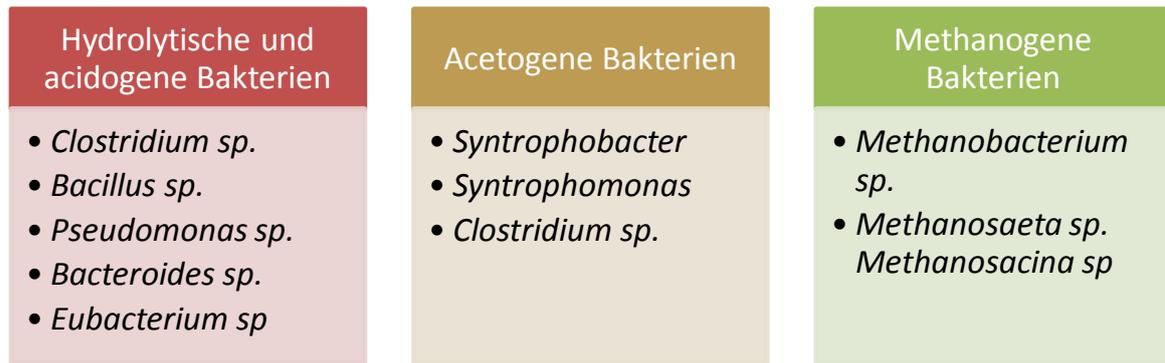


Abb. 2 Mikroorganismen in Biogasanlagen

Die zweistufigen Biogasanlagen ermöglichen, dass Hydrolyse und Methanbildung in räumlich getrennten Reaktoren ablaufen. Die Arten der Mikroorganismen in beiden Stufen unterscheiden sich und benötigen verschiedene Milieubedingungen. Die Optimierung dieser Bedingungen lassen sich durch den zweistufigen Prozess verwirklichen.

Für die Hydrolysestufe kann ein schwach saurer pH-Wert von 5,0 bis 6,5 eingestellt werden, sodass die Aktivität der hydrolytischen und acidogenen Bakterien gesteigert werden kann (Köllmeier, 2013). Die methanogenen Mikroorganismen bevorzugen vorwiegend einen neutralen bis schwach alkalischen pH-Wert von 7,0 bis 8,3, der in der Stufe der Methanisierung angepasst werden kann, um möglichst optimale Milieubedingungen zu schaffen (Busch, 2014).

2.2.2 Mikroorganismen in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe

Hydrolyse und Acidogenese lassen sich nicht klar trennen, da sie gemeinsam im Stoffwechsel ablaufen (Bauer, 2009). An dem Prozess sind verschiedene Bakterien beteiligt. In der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe wird das Substrat durch hydrolytische und acidogene Bakterien zersetzt. Die auftretenden Gattungen der hydrolytischen und acidogenen Bakterien sind z.B. *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bacteroides* und *Eubacterium* (Köllmeier, 2013).

Das Ausgangssubstrat enthält Fette, Proteine und Kohlenhydrate. Die hydrolytischen Bakterien zerlegen die organischen Verbindungen in Zucker, Aminosäuren und Fettsäuren. Diese kurzkettigen organischen Verbindungen werden anschließend durch acidogene Bakterien in organische Säuren und Alkohole gespalten.

Hydrolytische Bakterien nutzen als Ausgangssubstanz komplexes organisches Material und produzieren Monomere. Die acidogenen Bakterien nutzen diese Monomere als Ausgangssubstanz und produzieren organische Säuren, Alkohole, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff.

Die Vielfalt der Mikroorganismen, die am Substratabbau beteiligt sind, ist groß. Für den Abbau von Stärke und Zellulose sind Bakterien wie *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* und *Micrococcus* verantwortlich. Eiweiße werden durch die Bakterienarten *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* und *Clostridium* gespalten. Für die Zersetzung von Fetten sorgen die Bakterien *Bacillus*, *Alcaligenes* und *Pseudomonas* (Schmidt, 1996). Die Unterteilung der Bakterienarten ist in der folgenden Abb. 3 dargestellt.

Grampositive Bakterien	
aerob	<i>Eubacterium, Bacillus, Micrococcus, Bifidobacterium, Staphylococcus</i>
anaerob	<i>Clostridium, Peptococcus</i>
Gramnegative Bakterien	
aerob	<i>Pseudomonas, Alcaligenes</i>
anaerob	<i>Bacteroides</i>

Abb. 3 Einteilung der vorkommenden Bakterien in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe

Die Zersetzung der Biomasse erfolgt in den Stufen der Hydrolyse und Versäuerung vor allem durch Bakterien, aber auch manche Archaeen (Bauer, 2009). Die grampositiven Bakterien Clostridien und Bacillen werden häufig in Biogasanlagen identifiziert, die als Ausgangssubstrat landwirtschaftliche Abfälle verwenden (Bauer, 2009). Die Bakterienarten *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* spielen bei der Umsetzung des Substrates eine wichtige Rolle (Bauer, 2009).

Weiterhin gehören die Bakteriengattungen *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Vibrio*, *Acetovibrio*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* und *Sarcina* zu den vorkommenden Mikroorganismen in landwirtschaftlich betriebenen Biogasanlagen (Bauer, 2009). Des Weiteren wurden die Bakteriengattungen *Lysinibacillus*, *Variovax sp.*, *Brevibacterium*, *Stenotrophomonas* und *Acinetobacter* in Grassilage-Biogasfermentern nachgewiesen (Wang, 2014).

3 Materialien und Methoden

3.1 Probenmaterial, Chemikalien, Medien und Lösungen

3.1.1 Probenmaterial

Die Biogasprobe vom 26.11.14 wurde aus der Versäuerungsstufe der zweistufigen Biogasanlage in Scharlibbe entnommen. Die Biomasse setzt sich aus landwirtschaftlichen Substraten zusammen. Die Biogasprobe vom 10.02.15 wurde von der zweistufigen Biogasanlage der Milchproduktion Meyendorf KG/Börde Energie Meyendorf KG in Wanzleben zur Verfügung gestellt. Die Probenahme erfolgte aus dem offenen Fermenter der Versäuerungsstufe. Der pH-Wert der Probe betrug 6,65 bei 19,7°C. Die Biomasse besteht aus Gülle, Stroh, Tierkot und Mais. Beide Proben enthalten viele feste Bestandteile und sind sehr dickflüssig.

3.1.2 Chemikalien

Tab. 1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Artikel-/Chargennummer
Mac Conkey Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	X922.1 / 039102012
Plate Count Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	X930.1 / 02893263
LB Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	X969.2 / 363204315
LB Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	X964.2 / 15895716
Pepton aus Fleisch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	2366.3 / 170152278
Fleischextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	X975.1 / 05785140
Agar Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	5210.2 / 304215982
Agarose NEEO Ultra- Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	2267.5 / 114211909
Rotiphorese® 50×TAE	Carl Roth GmbH + Co. KG,	CL86.1 / 122184804

Puffer	Karlsruhe	
Roti [®] Safe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3865.1 / 373205108
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	5429.3 / 48467791
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	8043.2 / 22465466
Roti [®] -Stock 10×PBS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	1058.1 / 102184159
6× DNA Loading Dye	Thermo Scientific	#R0611 / 00162877
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM0241 / 00162853
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM0311 / 00154896
Water, nuclease-free	Thermo Scientific	#R0581 / 00246901
Dream Taq Green PCR Master Mix (2×)	Thermo Scientific	#K1081 / 00246649
10×FastDigest [®] Green Buffer	Fermentas	00063611
FastDigest [®] EcoRI	Fermentas	#FD0274
Ampicillin-Natriumsalz	neo Lab Migge	11755.0025 / 1475s315
IPTG	Fermentas	#R0392 / 0738
X-Gal Solution ready-to- use 20mg/ml	Thermo Scientific	#R0941 / 00239804

3.1.3 Agarmedien und Lösungen

Tab. 2 Medien

Medien	Zusammensetzung
Mac Conkey Agar (500ml)	25g Mac Conkey Agar, 3,25g Agar Agar, 500 ml dest. Wasser
Plate Count Agar (500ml)	11,75g Plate Count Agar, 2,5g Agar Agar, 500 ml dest. Wasser
LB Agar (500ml)	20g LB Agar, 2,5 g Agar Agar, 500ml dest. Wasser

Nutrient Agar (500ml)	2,5g Pepton aus Fleisch, 1,5g Fleischextrakt, 10g Agar Agar, 500ml dest. Wasser
LB Medium (1L)	10g LB Medium, 500ml dest. Wasser

Tab. 3 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Agarosegel (50ml)	0,5g Agarose, 50ml 1×TAE-Puffer
1×TAE-Puffer (1L)	20ml 50×TAE-Puffer in 1 L dest. Wasser
1× PBS-Puffer	50ml 10×PBS-Puffer in 450ml dest. Wasser
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA

3.2. Primer, Kits, Materialien und Geräte

3.2.1 Primer

Tab. 4 universelle Bakterienprimer, Firma Metabion

Primer	Primersequenz	Länge [bp]	T _m [°C]	Annealing [°C]	Fragment größe [bp]
63f*	5'- CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	21bp	59,8	55	1300
1387r*	5'- GGG CGG (AT)GT GTA CAA GGC-3'	18bp	60,5		
EUB338f*	5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3'	18bp	60,5	55	1000

*Literatur: 63f/1387r: Marchesi et. al., 1998 und EUB338f: Miyashita et. al., 2009

3.2.2 Kits und Materialien

Tab. 5 Kits

Kits	Hersteller	Artikel-/Chargennummer
peqGOLD Bacterial DNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	12-3450-02 / 042811 12-3450-02 / 081814
Wizard [®] SV Gel und PCR Clean-Up System	Promega, Madison USA	A9282 / 0000137738
pGEM [®] -T Vector Systems	Promega, Madison USA	A3600 / 0000124110
JM109 Competent Cells	Promega, Madison USA	L2001 / 0000138582
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific	#K0503 / 00246389

pUC19 DNA	Thermo Scientific	#SD0061 / 00145290
-----------	-------------------	--------------------

Tab. 6 Materialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Parafilm [®] M	BRAND GmbH & Co. KG
sterile Plastikimpfösen	Greiner Bio-One GmbH
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen	Eppendorf AG
PCR-Tubes 0,2ml	Alpha Laboratories
Tubes 1,5ml	BRAND GmbH & Co. KG
Tubes 2,0ml	BRAND GmbH & Co. KG
sterile Zahnstocher	Fackelmann
Lysing Matrix B	MP Biomedicals GmbH

3.2.3 Geräte

Tab. 7 Geräte

Gerät	Hersteller	Gerätenummer
Analysenwaage CP153	Sartorius AG, Göttingen	18311017
Analysenwaage Competence CP224S	Sartorius AG, Göttingen	18304479
Centrifuge MiniSpin [®]	Eppendorf AG, Hamburg	MD-SDL-3001/03
Centrifuge-mixer CM-50M	LTF Labortechnik GmbH Co.KG	B13018
Multifuge 1L-R	Heraeus	B09694
Homogenisierer Fastprep [®] -24	MP Biomedicals GmbH, Eschwege	6002-500
Standard Power Pack P25 Biometra [®]	Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen	040-800
Magnetrührer RCT basic IKAMAG [®]	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen	00.265159
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg	535526400
Vortex-Genie [®] 2	Scientific Industries, Inc.	2E-15838
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg	

Sicherheitswerkbank Heraeus® HERAsafe® KS	Thermo Fisher Scientific	30056224
Memmert Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG	01A005630
Labcycler	SensoQuest GmbH, Göttingen	
NanoDrop® ND-1000 UV-Vis-Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	012937
PerfectBlue™ Minigelsystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	40-0911
UV-Transilluminator GENE GENIUS	Synoptics Ltd., Cambridge, UK	GVS20
MS2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen	L002050
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik GmbH	40530756
Eisbereiter F125 F80C	Icematic	B09685
Gasprofi	WLD Tec	B09690
pH-Meter	WTW	B09682
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg	FH012247

3.3 Methoden

3.3.1 Lebendzellzahlbestimmung und Masterplatten

Die Bestimmung der Lebendzellzahl der in der Biogasprobe vorhandenen Mikroorganismen erfolgt durch das Ausplattieren einer mit sterilem 1×PBS-Puffer hergestellten Verdünnungsreihe auf zwei verschiedenen Agarmedien. Zur Bestimmung der Anzahl aerober Mikroorganismen dienen der Plate Count- und Nutrient Agar.

Die Komponenten für die unterschiedlichen Agarmedien sind in Tab. 2 aufgeführt. Diese werden eingewogen und mit 500ml destilliertem Wasser versetzt. Der Agar wird durch Rühren auf dem Magnetrührer gelöst. Die Lösung wird für 15min bei 121°C sterilisiert und nach dem Autoklavieren auf 60°C abgekühlt. Der flüssige Agar wird in die Agarplatten gegossen und unter der Sterilwerkbank getrocknet. Die Lagerung der Platten erfolgt bei 4°C im Kühlschrank für Medien.

Für das Anlegen der Verdünnungsreihe werden 10g Biogasprobe mit festen und flüssigen Bestandteilen in 90ml PBS-Puffer gelöst. Die gelöste Biogasprobe wird mit einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Ein Reaktionsgefäßständer wird vorbereitet mit sieben sterilen 1,5ml-Tubes. Diese werden jeweils mit 900µl PBS-Puffer gefüllt und mit den Exponenten der Verdünnungsstufen beschriftet.

Von der gelösten Biogasprobe werden 100µl Probe entnommen, in das erste vorbereitete Tube überführt und gemischt. Diese Verdünnung entspricht der Verdünnungsstufe 10^{-1} . Aus dieser Verdünnungsstufe werden wiederum 100µl entnommen, in das zweite vorbereitete Tube überführt und gemischt, welches der Verdünnungsstufe 10^{-2} entspricht. Bei den folgenden Verdünnungsstufen wird auf dieselbe Art und Weise verfahren, bis die Verdünnungsstufe 10^{-7} erreicht ist.

Von der Verdünnungsreihe 10^{-1} bis 10^{-7} werden jeweils 100µl auf dem Nutrient- und PC Agar ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten wird bestimmt und die Lebendzellzahl für jede Verdünnungsstufe mit der Formel in Abb. 4 berechnet.

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{ml}} = \text{Anzahl gezählter KBE} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ausplattiertes Volumen}$$

Abb. 4 Berechnung der Lebendzellzahl/ml

Masterplatten

Die Kolonien, die auf den Platten der Verdünnungsstufen gewachsen sind, werden auf Masterplatten übertragen (Abb. 5). Es werden je eine Plate Count-, Nutrient- und MacConkey Agarplatte mit einem Petrischalensticker auf der Agarseite versehen. Die Kolonien werden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und jede Kolonie wird auf die drei vorbereiteten Platten übertragen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es erfolgt eine prozentuale Auswertung bezüglich der Anzahl der Kolonien, die nach der Inkubation gewachsen sind.

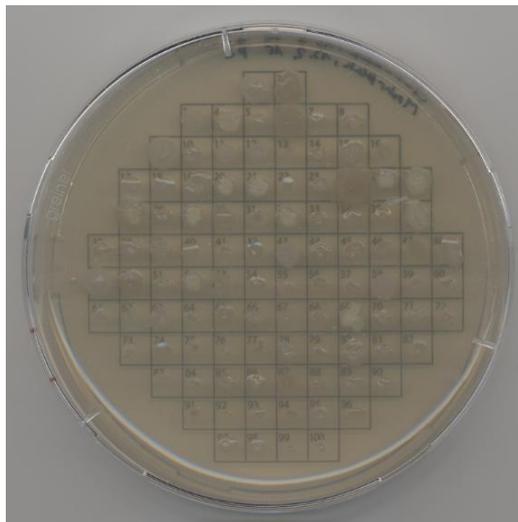


Abb. 5 Beispiel Masterplatte

3.3.2 Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Die Reaktion wird in drei Schritte unterteilt. Zuerst wird der DNA-Doppelstrang durch Denaturierung in zwei Einzelstränge aufgespalten. Abhängig von der DNA-Polymerase wird die Temperatur zwischen 94°C und 96°C gewählt. Die Anlagerung der Oligonukleotidprimer an spezifische Regionen der einzelsträngigen DNA-Abschnitte von beiden Seiten erfolgt durch Temperatursenkung auf 50°C bis 60°C. Die genaue Annealing-Temperatur ist abhängig von den verwendeten Primern. Je höher z.B. der Guanin-Cytosin-Gehalt der Primer, umso höher ist die Temperatur bei der Anlagerung, da mehr Wasserstoffbrückenbindungen enthalten sind. Die Oligonukleotidprimer legen durch ihre Anlagerung die Startpunkte für die DNA-Polymerase fest. Nach der Anlagerung der Oligonukleotidprimer erfolgt die Elongation durch die DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C. Die DNA-Polymerase füllt die fehlenden DNA-Stränge mit freien Nukleotiden auf.

Es entstehen als Produkte der PCR-Reaktion zwei doppelsträngige DNA-Fragmente. Diese gleichen der Ausgangs-DNA genau. Denaturierung, Anlagerung und Elongation bilden einen Zyklus, der mehrfach wiederholt wird. Für die PCR werden weiterhin Desoxynukleotide, Reaktionspuffer und die zu amplifizierende DNA benötigt. Die Reaktion erfolgt in einem PCR-Gerät.

Die verwendeten Bakterienprimer 63f, EUB338f und 1387r wurden entwickelt, um gezielt Bereiche aus der 16S rRNA aus Bakterien und Archaeen zu amplifizieren. Der universelle Bakterienprimer EUB338f dient zur Identifizierung von anaeroben methanotrophen Bakterien und Archaeen (Miyashita et. al., 2009). Die universellen Bakterienprimer 63f und 1387r amplifizieren eine große Vielfalt von Bakterienarten. Verschiedene Organismen wie z.B. der Coryneforme, Proteobakterien sowie die Bakteriengattungen *Micrococcus* und *Eubacterium* können identifiziert werden (Marchesi et. al., 1998).

In den PCR-Ansatz mit 6µl nukleasefreiem Wasser wird mit einem sterilen Zahnstocher etwas Koloniematerial von der Agarplatte überführt. Die Nullkontrolle enthält kein DNA-Template. Zu jeder Probe werden nach der zehnminütigen Denaturierung bei 99°C 14µl Ansatz aus Mastermix und Primern gegeben (Tab. 8). Wird anstelle des Zellmaterials von der Agarplatte die chromosomale DNA aus der DNA-Isolierung verwendet, setzt sich der PCR-Ansatz wie in Tab. 8 dargestellt zusammen.

Tab. 8 PCR-Ansatz für chromosomale DNA und Kolonie-PCR

Reagenzien	Kolonie	chromosomale DNA
MasterMix Dream Taq Green	10µl	10µl
Forward Primer 63f oder EUB338f (5pmol/µl)	2µl	2µl
Reverse Primer 1387r (5pmol/µl)	2µl	2µl
Water, nuclease-free	6µl	5µl
DNA (10-20ng/µl)	-	1µl
Kolonie	1	-
Gesamtvolumen	20µl	20µl

Die Annealing-Temperatur liegt bei 55°C für die verwendeten universellen Bakterienprimer. Der Ablauf des Programmes für die PCR ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9 Kolonie-PCR-Programm

Schritt	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	120	1
Denaturierung	94	30	40
Annealing	55	30	40
Elongation	72	60	40
Finale Elongation	72	300	1

Die PCR-Produkte werden auf einem Agarosegel aufgetragen. Der Farbstoff ist bereits im MasterMix Dream Taq Green enthalten. Die Produkte, die in der PCR durch Verwendung der chromosomalen DNA aus den DNA-Isolierungsversuchen entstanden sind, werden aufgereinigt und für die Ligation und Transformation mit dem Kit pGEM[®]-T Vector Systems eingesetzt.

Agarosegelelektrophorese

Bei der Agrosegelelektrophorese werden DNA-Moleküle in einem Gemisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA-Moleküle sind negativ geladen und wandern von der Anode zur Kathode. Umso größer die DNA-Fragmente sind, umso langsamer wandern sie durch das Agarosegel. Abhängig vom Agarosegehalt lassen sich DNA-Fragmente von 0,5 bis 25kb Länge voneinander trennen und identifizieren (Mülhardt, 2013).

Die Zusammensetzung des Agarosegels ist in Tab. 3 dargestellt. In der Mikrowelle wird die Agarose durch Kochen in dem Puffer gelöst. Die Lösung wird auf ca. 50°C abgekühlt und 2,5µl Roti[®] Safe Farbstoff hinzugegeben. Der Probenkamm wird in den Gelträger eingesetzt. Die gelöste Agarose wird in den zuvor abgedichteten Gelträger gegossen. Wenn das Gel erstarrt ist, wird der Probenkamm entfernt und der Gelträger in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wird bis zur Markierung mit 1×TAE-Puffer gefüllt. Die Proben werden in die Geltaschen gegeben. Das aufzutragende Volumen ist abhängig von der DNA-Konzentration. Ein oder zwei DNA-Marker werden aufgetragen, je nach erwarteter DNA-Länge (Abb. 6). Die Proben, die keinen Farbstoff enthalten, werden mit DNA Loading Dye vermischt. Dieser enthält den Farbstoff Bromphenolblau, der den Verlauf der DNA-Banden auf dem Gel sichtbar macht. Glycerin beschwert die Proben, sodass diese in die Geltaschen sinken.

Die Elektrophoresekammer wird mit dem Deckel verschlossen und an das Stromversorgungsgerät angeschlossen. Die angelegte Spannung wird auf 110V eingestellt und die Gelelektrophorese ist nach ca. 35 bis 40min beendet. Die Auswertung erfolgt mit dem UV-Transilluminator. Durch das UV-Licht werden die DNA-Banden auf dem Gel sichtbar gemacht. Die Größe des DNA-Fragmentes lässt sich durch den Vergleich mit den Banden des DNA-Markers bestimmen (Abb. 6).

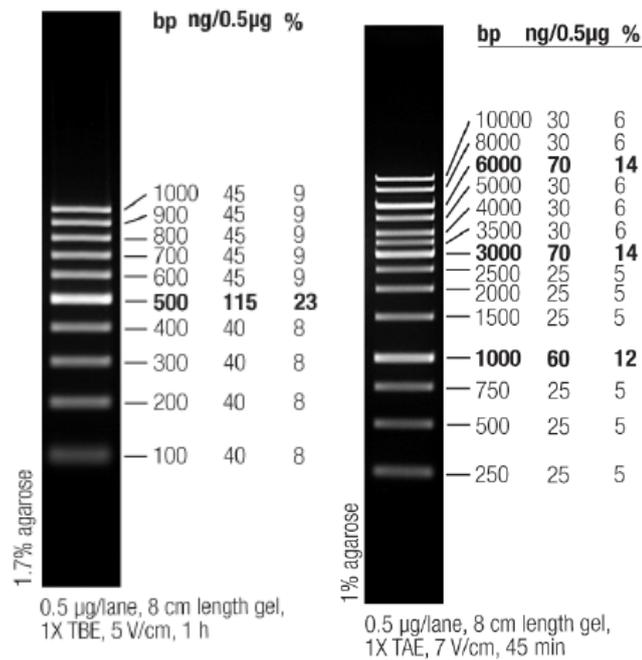


Abb. 6 links Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, rechts Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific

3.3.3 Sequenzvergleich

Die Amplifikationsprodukte, die in der Kolonie-PCR entstehen, werden zur Sequenzierung zur Firma SEQLAB versendet. Die Proben werden dazu in eine mit einem Barcode versehene 96-well-Mikrotiterplatte überführt und die verwendeten universellen Bakterienprimer werden zum Versenden vorbereitet (Tab. 10). Die Agarosegelbilder der PCR-Produkte werden ausgedruckt und mit versendet.

Tab. 10 Empfehlungen zur Probenvorbereitung (Firma SEQLAB)

	Volumen / Konzentration
PCR-Produkt	10µl / 15ng/µl
Primer (separat)	200µl / 10µM

Die Firma sendet die DNA-Sequenzen als Dateien per E-Mail zurück. Die Sequenzen werden mit dem Programm BioEdit bearbeitet und in einem Textprogramm gespeichert. Die Identifizierung und der Vergleich der DNA-Sequenzen erfolgt mit der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST®). Das Programm „nucleotide blast“ wird aufgerufen. Die Anfragesequenz wird in das Fenster „Enter Query Sequence“ eingegeben, der Datensatz „Nucleotide collection“ gewählt, „megablast“ eingestellt und der Button „BLAST“ betätigt. Die Anfragesequenz sollte eine Übereinstimmung (Query Cover) von mindestens 99% mit der Zielsequenz aufweisen, um für die Auswertung in Betracht gezogen werden zu können.

3.3.4 Optimierung der DNA-Isolierung

Der Zellaufschluss und die DNA-Isolierung werden anhand von zwei Biogasproben optimiert, die unter Punkt 3.1.1 Probenmaterial aufgeführt und beschrieben sind. Mit der Probe vom 26.11.14 werden die ersten Versuche, um die DNA aus der Biomasse zu isolieren, durchgeführt. Im ersten DNA-Isolierungsversuch wird nur der flüssige Teil der Probe betrachtet, um eine Verdünnung der Probe zu vermeiden.

In weiteren Versuchen wird die gesamte Probe mit festen und flüssigen Bestandteilen verwendet. Der TE-Puffer, Tris-HCl-Puffer, PBS-Puffer und Lysis Puffer aus dem peqGOLD Bacterial DNA Kit zum Lösen der Probe werden in den ersten Versuchen verglichen. Die Zellaufschlussmatrizes B und E werden variiert. Die Matrix B ist speziell für den Aufschluss von Bakterienzellen geeignet. Die Matrix E dient zum Aufschließen von gemischten Proben aus der Umwelt wie z.B. Schlamm oder Erde. Im weiteren Verlauf werden unterschiedliche Schüttelzeiten mit dem PBS-Puffer betrachtet. In den letzten Versuchen werden verschiedene Zellaufschlusszeiten mit dem MP Fastprep®-24 untersucht. In der Anlage 1 sind die geänderten Parameter (Puffer, Schüttelzeit, Aufschlusszeit und Matrix) zu jedem Versuch aufgeführt.

Die Gesamtprobe vom 26.11.14 wird eingewogen, mit Puffer versetzt und 3min auf dem Vortex-Genie® gemischt. Die gelöste Probe wird 30min bei 150rpm geschüttelt. Von der Probe wird 1ml für 5min bei 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Zu dem gebildeten Pellet wird erneut 1ml Probe gegeben, 5min bei 10000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wird mehrmals wiederholt, sodass

insgesamt 5ml Probe verwendet werden, um ein Pellet zu bilden. Das Pellet wird in 1ml Puffer gelöst und in die Lysing Matrix B und E überführt. Der Zellaufschluss erfolgt bei 60s.

Die weiteren Schritte mit der vorbehandelten Probe sind bei allen durchgeführten DNA-Isolierungen gleich. Der Zellaufschluss erfolgt bei 6m/s im MP Fastprep[®]-24. Die Proben werden 3min im Eis inkubiert und 3min bei 13000rpm zentrifugiert. Je 200µl Überstand, 400µl Lysis Buffer, 20µl Proteinase K und 15µl RNase A werden gemischt und 30min bei 70°C und 400rpm inkubiert. Zu jeder Probe werden 600µl DNA Binding Buffer gegeben und von Probenmischung 600µl auf die Säule überführt. Das weitere Vorgehen entspricht dem Protokoll B. DNA-Isolation aus schwer aufschließbaren Bakterien aus dem peqGOLD Bacterial DNA Kit Abschnitt 2. Laden und Binden in der Anlage 2. Das Zentrifugieren erfolgt bei allen Schritten bei 13000rpm. Die DNA wird mit 50µl Elution Buffer eluiert. Die DNA-Konzentration wird mit dem NanoDrop[®] ND-1000 gemessen und die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

Das letztendliche Vorgehen der optimierten DNA-Isolierung wird nun beschrieben. Bei der zweiten Biogasprobe vom 10.02.15 werden zwei Zellaufschlusszeiten aus dem zuvor durchgeführten Versuch näher untersucht. Die Probenvorbereitung wird verändert. 20g Gesamtbioasprobe werden in 200ml sterilem PBS-Puffer gelöst und 30min bei 200rpm geschüttelt. Von der gelösten Probe werden 100ml entnommen, mit 100ml sterilem PBS-Puffer versetzt und 30min bei 200rpm geschüttelt. Je Tube werden 2ml Probe 10min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jedes Pellet wird in 100µl sterilem PBS-Puffer gelöst. Mehrere gelöste Pellets werden in ein Tube überführt und 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Im ersten Versuch werden fünf Pellets verwendet und beim zweitem Versuch drei Pellets (s. Anlage 1). Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 1ml sterilem PBS-Puffer gelöst und in ein Lysing Matrix B Tube überführt. Der Zellaufschluss erfolgt bei 2×30s und 3×25s. Die Proben werden nach jedem Zellaufschluss 3min im Eis inkubiert (weiteres Vorgehen s. oben).

3.3.5 DNA-Klonierung und Isolierung des übertragenden Plasmides

Das Vorgehen für diese Methode ist in der Arbeitsanweisung Ligation und Klonierung beschrieben. Das PCR-Produkt wird vor der Ligation aufgereinigt mit dem Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System. Das Vorgehen entspricht dem Protokoll DNA

Purification by Centrifugation B. Processing PCR Amplifications aus der Kitanleitung in der Anlage 3. Das Zentrifugieren wird bei allen Schritten bei 13000rpm durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgt mit 30µl nukleasefreiem Wasser. Die DNA-Konzentration wird mit dem NanoDrop® ND-1000 gemessen. Die DNA wird bei -20°C gelagert.

Bei der PCR wird an das Ende des neu gebildeten DNA-Stranges ein Adenosin-Nukleotid durch die Dream Taq Green DNA Polymerase angefügt, wodurch die 3'-A-überhängenden Enden erzeugt werden. Der pGEM®-T Vektor ist ein linearisierter Vektor mit einzelnen 3'-T-überhängenden Enden an beiden Seiten. Das PCR-Produkt wird in der Ligationsreaktion durch die T4 DNA Ligase mit dem pGEM®-T Vektor verknüpft. Die Masse an PCR-Produkt für den Ligationsansatz wird mit der in Abb. 7 dargestellten Formel berechnet. Das gewählte Verhältnis von Insert zu Vektor beträgt 3:1 und entspricht den empfohlenen Angaben des Herstellers (Promega).

$$Insert (ng) = \frac{Vektor (ng) \times Gr\ddot{o}\ddot{u}\ddot{u}\ddot{e} \text{ des Inserts } (kb)}{Gr\ddot{o}\ddot{u}\ddot{e} \text{ des Vektors } (kb)} \times \text{molares Verh\ddot{a}ltnis} \left(\frac{Insert}{Vektor} \right)$$

Abb. 7 Formel zur Berechnung der Masse an PCR-Produkt

Die Zusammensetzung des Ansatzes für die Ligation ist in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11 Reagenzien für den Ligationsansatz, pGEM®-T Vektor Systems

Reagenzien pro Ligationsansatz	SR	PK	HK
2×Rapid Ligation Buffer	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T Vektor (50ng)	1µl	1µl	1µl
T4 DNA Ligase	1µl	1µl	1µl
PCR Produkt	x µl	-	-
Kontroll-DNA	-	2µl	-
Water, nuclease-free	x µl	1µl	3µl
Gesamtvolumen	10µl	10µl	10µl

SR = Standard Reaktion mit PCR-Produkt, PK = Positivkontrolle mit Kontroll-DNA,

HK = Hintergrundkontrolle ohne DNA

Das Vorgehen für die Ligation und Transformation entspricht dem Quick Protocol des pGEM®-T Vector Systems in der Anlage 4. Die geänderten Parameter werden im folgenden Absatz beschrieben.

In 100µl fertige kompetente *E.coli*-Zellen JM109 von der Firma Promega werden 4µl vom Ligationsansatz gegeben. Die Zellen werden 20min im Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt 45s bei 42°C. Die Zellen werden 5min im Eis inkubiert. Zu jedem Ansatz werden 250µl LB-Medium gegeben und 60min bei 37°C und 800rpm inkubiert. Von jeder Probe werden jeweils 80µl und 150µl auf LB-Agarplatten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Berechnung der Transformationseffizienz der kompetenten *E.coli*-Zellen JM109 wird die pUC19-DNA verwendet. Die Transformation erfolgt wie oben beschrieben mit 1µl pUC19 (1ng/µl) und 900µl LB-Medium. Von dem Ansatz werden 100µl ausplattiert. Die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten auf den Platten werden gezählt, der Mittelwert von zwei Platten wird gebildet und die Transformationseffizienz berechnet (Abb. 8).

$$\frac{KbE}{[ng] DNA} (\text{Verdünnungsfaktor DNA}) = \frac{KbE}{[ng] DNA} (1000) = \frac{KbE}{\mu g DNA}$$

Abb. 8 Formel zur Berechnung der Transformationseffizienz

Das Blau-Weiß-Screening wird zur Selektion der positiven Klone angewendet (Abb. 9). Die Transformanden werden auf ampicillinhaltigem Agar mit dem Farbstoff X-Gal selektiert und auf β-Galactosidase-Aktivität geprüft, um die rekombinanten Klone zu identifizieren (Brown, 2011).

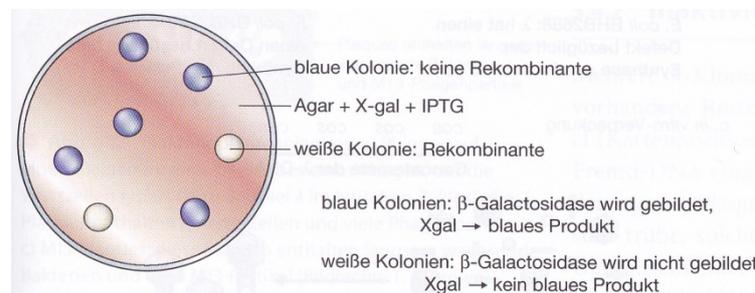


Abb. 9 Selektion der positiven Klone mit Blau-Weiß-Screening, Quelle: Brown, 2011

Der pGEM[®]-T Vektor enthält ein Gen für eine Ampicillinresistenz und besitzt das lacZ'-Gen, das einen Teil des Enzyms β -Galactosidase codiert (Abb. 10). Der Farbstoff X-Gal ist ein Lactoseanalog und wird von β -Galactosidase zu einem blauen Reaktionsprodukt abgebaut (Brown, 2011). IPTG in den Agarplatten wird als Induktor für das Enzym β -Galactosidase genutzt.

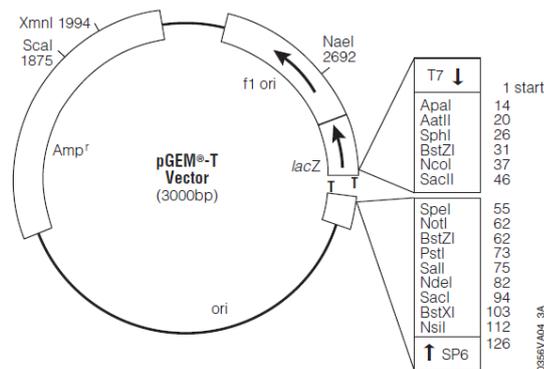


Abb. 10 pGEM[®]-T Vektor, Quelle: Promega

In den kompetenten *E. coli* JM109-Zellen ist das lacZ'-Gen inaktiviert. Die Zellen, die nur den pGEM[®]-T Vektor mit dem intakten lacZ'-Gen enthalten, erzeugen blaue Kolonien, da β -Galactosidase exprimiert werden kann. Das lacZ'-Gen wird auseinander gerissen wenn ein PCR-Produkt in den Vektor eingefügt wird, β -Galactosidase kann nicht mehr gebildet werden und die Kolonien bleiben weiß.

Isolierung des übertragenden Plasmides

Die Minipräparation zum Nachweis des übertragenden Plasmides wird mit dem GeneJet-Plasmid Miniprep Kit durchgeführt. Die weißen Klone werden in 5ml ampicillinhaltigem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150rpm inkubiert. Je Klon werden 2ml Zellen für 3min bei 13200rpm zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Zu dem gebildeten Zellpellet werden erneut 2ml Zellen gegeben, zentrifugiert und der Überstand wird verworfen.

Das weitere Vorgehen entspricht dem Protocol A. Plasmid DNA purification using centrifugies aus der Anleitung des GeneJet-Plasmid Miniprep Kit in der Anlage 5. Das Zentrifugieren bei allen Schritten erfolgt bei 13200rpm. Die DNA-Konzentration wird mit dem NanoDrop[®] gemessen.

Mit der isolierten Plasmid-DNA wird ein Einzelverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI angesetzt, um die enthaltenen Inserts nach erfolgter Klonierung erstmals zu charakterisieren. Die endgültigen Ergebnisse werden durch die Auswertung der Sequenzen erhalten.

Der Ansatz (Tab. 12) wird 5min bei 37°C inkubiert und auf einem Agarosegel aufgetragen. Die Aufbewahrung der Plasmid-DNA erfolgt bei -20°C.

Tab. 12 Reagenzien für einen Einzelverdau

Water, nuclease-free	15µl
10×FastDigest® Green Buffer	2µl
gereinigte Plasmid-DNA	2µl
FastDigest® enzyme EcoRI	1µl
Gesamtvolumen	20µl

Der pGEM®-T Vektor enthält keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI (Abb. 11). Die isolierte Plasmid-DNA, die das eingefügte PCR-Produkt enthält, kann eine Schnittstelle für das Enzym enthalten. Das Enzym EcoRI schneidet DNA jeglichen Ursprungs mit der Nukleotidsequenz G A A T T C (A = Adenin, C = Cytosin G = Guanin, T = Thymin).

Restriction Enzymes That Do **Not Cut the pGEM®-T Vector.**

AccB7I	BbsI	BstEII	FseI	PinAI	SpII
AccIII	BclI	Bsu36I	HindIII	PmeI	SrfI
Acc65I	BglIII	ClaI	HpaI	PmlI	StuI
AflII	BlpI	CspI	I-PpoI	PpuMI	Swal
AgeI	Bpu1102I	Csp45I	KasI	PshAI	Tth111I
AscI	BsaBI	DraII	KpnI	Psp5II	XbaI
AvaI	BsaMI	Eco47III	NarI	PspAI	XcmI
AvrII	BsmI	Eco72I	NheI	RsrII	XhoI
BalI	BsrGI	Eco81I	NruI	SgfI	XmaI
BamHI	BssHII	EcoNI	PacI	SgrAI	
BbeI	Bst1107I	EcoRI	PaeR7I	SmaI	
BbrPI	Bst98I	EheI	PflMI	SnaBI	

Abb. 11 Restriktionsenzyme, die den pGEM®-T Vektor nicht schneiden, Quelle: Promega

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Methoden zur Untersuchung der Mikroorganismen in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe von zweistufigen Biogasanlagen werden im Folgenden dargestellt und ausgewertet. Die Lebendzellzahlbestimmung wurde auf dem PC- und Nutrient Agar durchgeführt. Das Anlegen von Masterplatten diente zur morphologischen Unterscheidung vereinzelter Bakterienkolonien. Die Identifizierung von aeroben Mikroorganismen erfolgte mit der Kolonie-PCR. Durch den Sequenzvergleich wurden verschiedene Bakteriengattungen in der Probe nachgewiesen. Die Optimierung der DNA-Isolierung diente zur Gewinnung von PCR-fähigem Material. Die gebildeten PCR-Produkte wurden für die Klonierung eingesetzt, um anaerobe Mikroorganismen zu identifizieren.

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Lebendzellzahlbestimmung und Masterplatten

Die Lebendzellzahlbestimmung auf dem PC- und Nutrient Agar dient zur Bestimmung der Anzahl aerober (mikroaerophiler) Keime.

Die Ergebnisse von der Lebendzellzahlbestimmung (s. Anlage 6) der zwei Biogasproben sind in den folgenden Diagrammen in Abb. 12 und Abb.13 dargestellt.

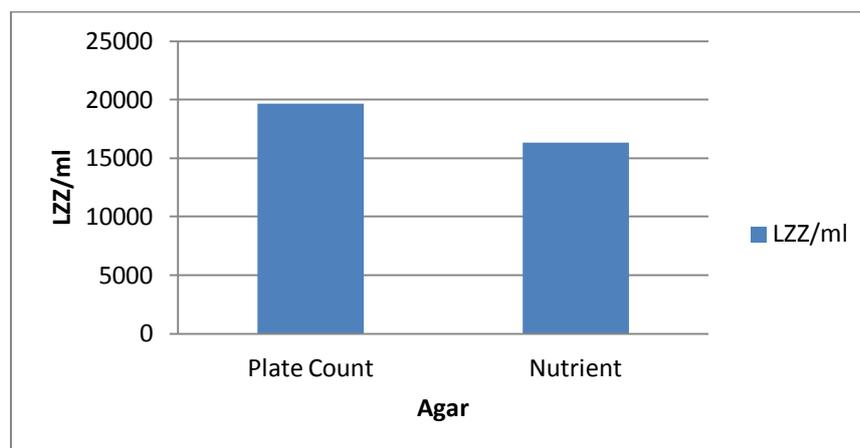


Abb. 12 Lebendzellzahlbestimmung 29.01.15 Biogasprobe vom 26.11.14

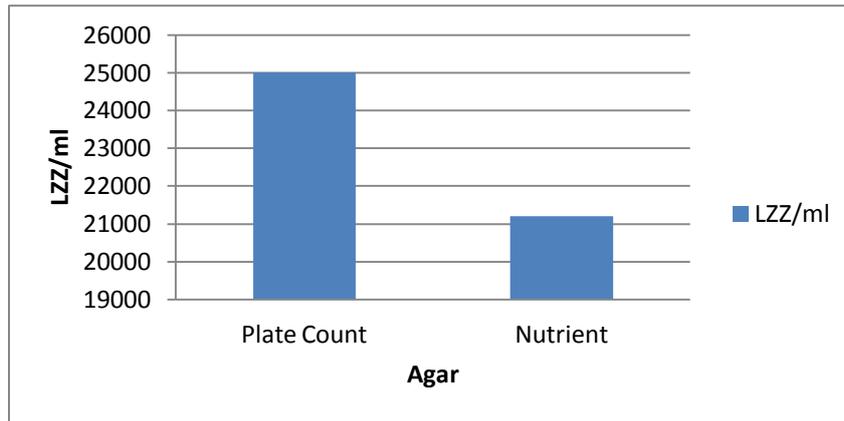


Abb. 13 Lebendzellzahlbestimmung 11.02.15 Biogasprobe vom 10.02.15

Das Auszählen der KbE auf den Agarplatten von der Verdünnungsreihe auf dem PC Agar (Abb. 14) und Nutrient Agar (Abb. 15) war ab der Verdünnungsstufe 10^{-2} möglich.



Abb. 14 Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} auf dem Plate Count Agar, Probe 10.02.15



Abb. 15 Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} auf dem Nutrient Agar, Probe 10.02.15

Die Lebendzellzahl bei beiden Biogasproben ist auf dem PC Agar um den Faktor 1,2 höher im Vergleich zum Nutrient Agar. Die Lebendzellzahl bei der frischen Biogasprobe vom 10.02.15 ist auf beiden Medien um den Faktor 1,3 größer als bei der länger gelagerten Probe vom 26.11.14.

Masterplatten

Das Anlegen der Masterplatten erfolgt zur morphologischen Unterscheidung vereinzelter Bakterienkolonien und Selektion verschiedener Bakterienarten. Der MC Agar dient zur selektiven Identifizierung von gramnegativen Bakterien. Der Nutrient Agar ist zur selektiven Identifizierung von gramnegativen Bakterien. Der Nutrient Agar ist zur Kultivierung von gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien und grampositiven Bakterien geeignet. Auf dem PC Agar wachsen aerobe grampositive und gramnegative Bakterien.

Die Kolonien von den Platten mit der Verdünnungsstufe 10^{-2} vom PC Agar (Abb. 14) und Nutrient Agar (Abb. 15) der Biogasprobe vom 10.02.15 wurden auf Masterplatten mit PC-, Nutrient- und MC Agar übertragen (Abb. 16, Abb. 17).

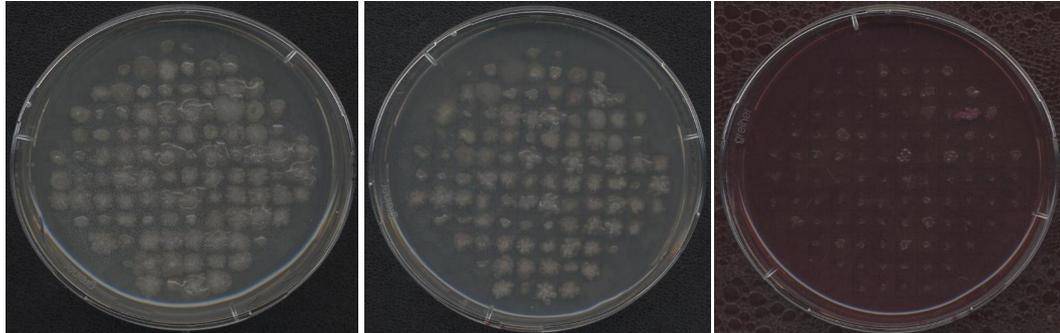


Abb. 16 Masterplatten: PC Agar, Nutrient Agar, MC Agar (Kolonien von Nutrient 10^{-2})

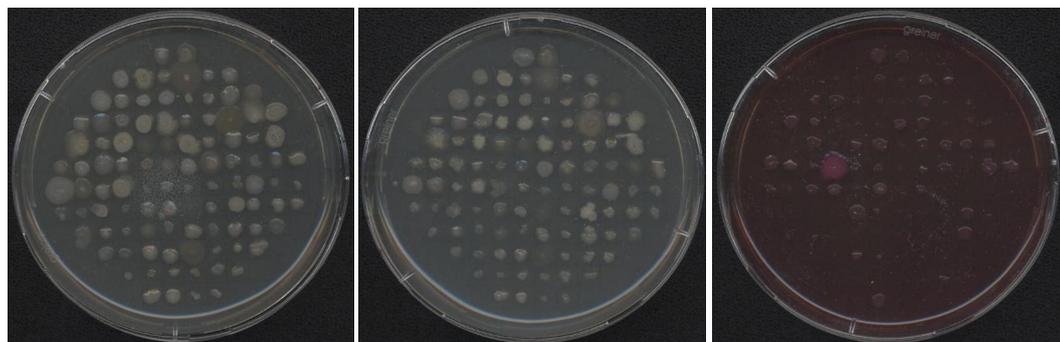


Abb. 17 Masterplatten: PC Agar, Nutrient Agar, MC Agar (Kolonien von PC 10^{-2})

20 Kolonien vom Nutrient Agar 10^{-2} und 20 Kolonien vom PC Agar 10^{-2} wurden auf den ersten Masterplatten angelegt. Auf dem PC- und Nutrient Agar sind 40 Kolonien gewachsen und 13 Kolonien auf dem MC Agar. Von den 100 Kolonien, die von dem Nutrient Agar 10^{-2} übertragen wurden, sind auf dem PC- und Nutrient Agar 100 Kolonien gewachsen und 26 Kolonien auf dem MC Agar (Abb. 16).

In Abb. 17 wurden 100 Kolonien vom PC Agar 10^{-2} auf Masterplatten übertragen. Auf dem PC- und Nutrient Agar waren nach der Inkubation 100 Kolonien vorhanden und 48 auf dem MC Agar. Im Durchschnitt sind ca. 3mal weniger Kolonien auf dem MC Agar vorhanden im Vergleich zum PC- und Nutrient Agar. Das bedeutet, dass der Anteil gramnegativer Bakterien in der Probe gering ist.

Die Morphologie der Kolonien auf dem PC- und Nutrient Agar ist ähnlich (Abb. 16, 17). Bei den Kolonien auf der PC Masterplatte (Abb. 17) wurden grampositive und gramnegative aerobe Bakteriengattungen wie z.B. *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Lysinibacillus* und *Arthrobacter* nachwiesen durch die Sequenzierung der PCR-Produkte. Eine Kolonie (Abb. 17, Nr. 65) die auch auf dem MC Agar gewachsen ist, wurde auf dem PC Agar als Bakterienart *Providencia alcalifaciens* identifiziert, die zur Familie der Enterobakterien gehört.

4.1.2 Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese

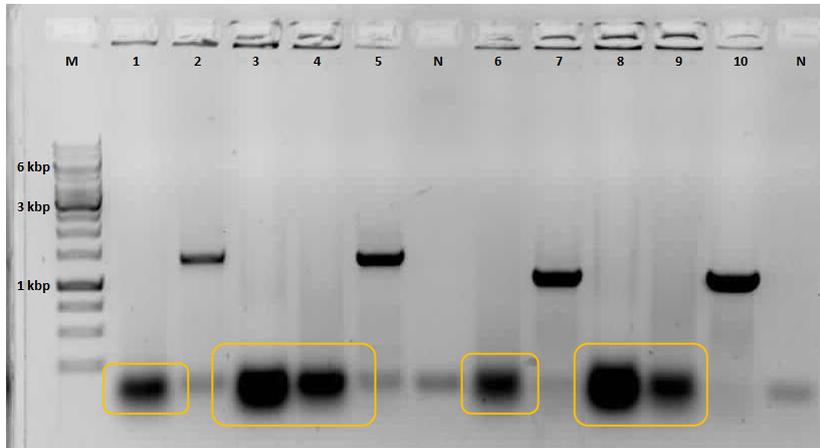
Die Kolonie-PCR dient zur Identifizierung von aeroben Mikroorganismen in der Biogasprobe. Die PCR-Produkte werden durch den Sequenzvergleich ausgewertet. Mit der PCR werden 100 Kolonien von der PC Masterplatte (Abb. 17) mit den universellen Bakterienprimern 63f, EUB338f und 1387r untersucht. Die morphologische Beschreibung der Kolonien und die Ergebnisse der Kolonie-PCR sind in Anlage 7 dargestellt.

Zunächst werden 50 Kolonien in der PCR untersucht (Gelbilder s. Anlage 8). Mit den Primern 63f und 1387r entstehen bei 38 Kolonien positive PCR-Produkte und mit den Primern EUB338f und 1387r bei 42 Kolonien.

Der Forward Primer EUB338f und der Reverse Primer 1387r werden für die Untersuchung von 50 weiteren Kolonien von der PC Masterplatte verwendet (Gelbilder s. Anlage 8). Die Kolonien, bei denen keine PCR-Produkte gebildet wurden, werden

noch mit den Primern 63f und EUB338f untersucht. Bei 85 von 100 untersuchten Kolonien mit den Primern EUB338f und 1387r sind positive PCR-Produkte entstanden. Diese wurden zur Sequenzierung zur Firma SEQLAB gesendet.

Tab. 13 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 17.02.15

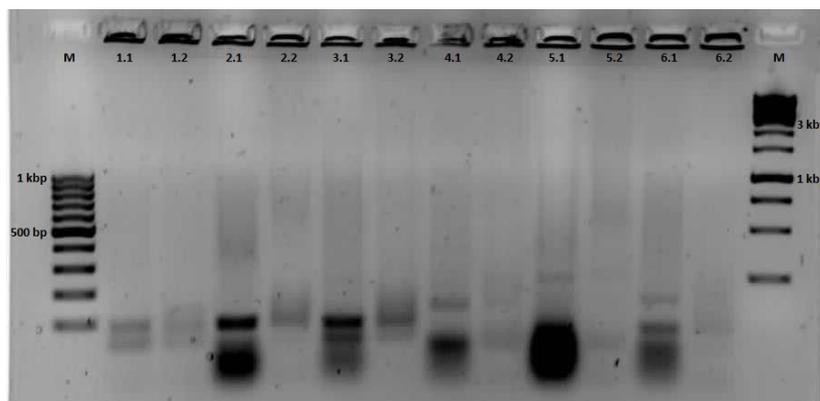


universelle Bakterienprimer 1: 63f/1387r 55°C	
M	Gene Ruler 1kb DNA Ladder
1	Kolonie 7, PC-Agar, B1
2	Kolonie 29, PC-Agar, B1
3	Kolonie 48, PC-Agar, B1
4	Kolonie 86, PC-Agar, B1
5	Kolonie 58, PC-Agar, B1
N	Negativkontrolle
universelle Bakterienprimer 2: EUB338f/1387r 55°C	
6	Kolonie 7, PC-Agar, B1
7	Kolonie 29, PC-Agar, B1
8	Kolonie 48, PC-Agar, B1
9	Kolonie 86, PC-Agar, B1
10	Kolonie 58, PC-Agar, B1
N	Negativkontrolle

Abb. 18 Kolonie-PCR vom 17.02.15 mit Primerkombination 1 (63f/1387r) und Primerkombination 2 (EUB338f/1387r)

In Abb. 18 ist das Ergebnis der Kolonie-PCR vom 17.02.15 dargestellt. Die Proben, bei denen im Bereich von 100bp bis 200bp Banden sichtbar sind, werden nach der Behandlung mit RNase auf ein Gel aufgetragen (Abb. 19) und zum Vergleich das nicht behandelte Produkt.

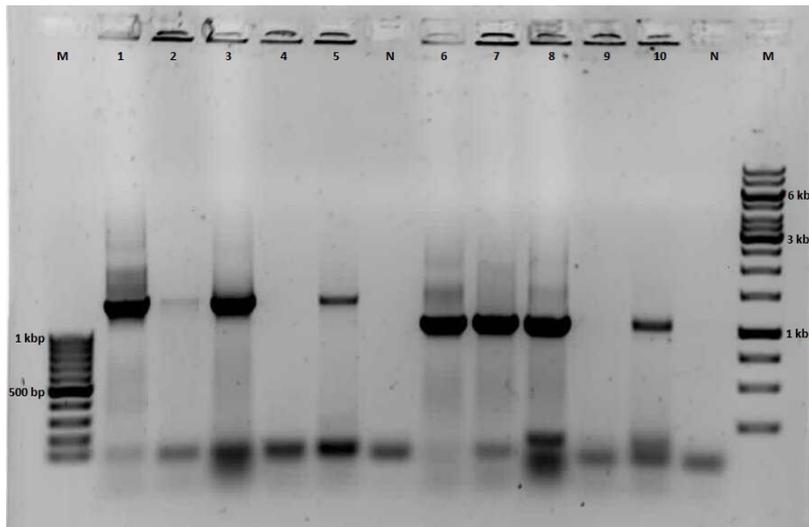
Tab. 14 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 18.02.15



63f/1387r	
M	Gene Ruler 100bp Ladder
1.1	Kolonie 7 ohne RNase
1.2	Kolonie 7 mit RNase
2.1	Kolonie 48 ohne RNase
2.2	Kolonie 48 mit RNase
3.1	Kolonie 86 ohne RNase
3.2	Kolonie 86 mit RNase
EUB338f/1387r	
4.1	Kolonie 7 ohne RNase
4.2	Kolonie 7 mit RNase
5.1	Kolonie 48 ohne RNase
5.2	Kolonie 48 mit RNase
6.1	Kolonie 86 ohne RNase
6.2	Kolonie 86 mit RNase
M	Gene Ruler 1kb Ladder

Abb. 19 PCR-Produkte ohne und mit RNase-Behandlung 18.02.15

Tab. 15 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 18.02.15

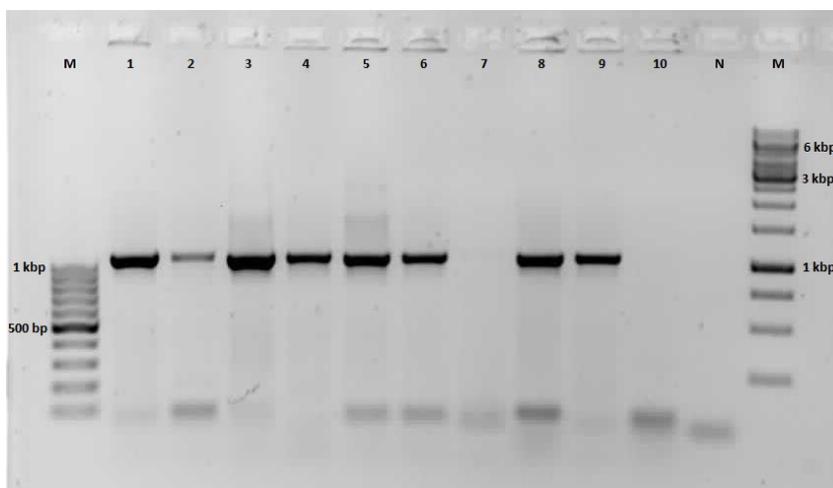


63f/1387r 55°C	
M	Gene Ruler 100bp Ladder
1	Kolonie 9, PC-Agar, B1
2	Kolonie 21, PC-Agar, B1
3	Kolonie 44, PC-Agar, B1
4	Kolonie 67, PC-Agar, B1
5	Kolonie 83, PC-Agar, B1
N	Negativkontrolle
EUB338f/1387r 55°C	
6	Kolonie 9, PC-Agar, B1
7	Kolonie 21, PC-Agar, B1
8	Kolonie 44, PC-Agar, B1
9	Kolonie 67, PC-Agar, B1
10	Kolonie 83, PC-Agar, B1
N	Negativkontrolle
M	Gene Ruler 1kb Ladder

Abb. 20 Kolonie-PCR vom 18.02.15 mit Primerkombination 1 (63f/1387r) und Primerkombination 2 (EUB338f/1387r)

Die Kolonie-PCR vom 18.02.15 (Abb. 20) wurde mit beiden Primerkombinationen durchgeführt. In dem Gelbild in Abb. 21 sind die Ergebnisse der Kolonie-PCR vom 03.03.15 mit den Primern EUB338f und 1387r dargestellt. Die weiteren Gelbilder der Kolonie-PCR von der PC Masterplatte (Abb. 17) sind in der Anlage 8 dargestellt, in denen bei einigen Proben zusätzliche Banden im Bereich von 100bp bis 300bp sichtbar sind.

Tab. 16 rechts: Beschreibung zur Kolonie-PCR vom 03.03.15



universelle Bakterienprimer 2: EUB338f/1387r 55°C	
M	Gene Ruler 100bp DNA Ladder
1	Kolonie 46, PC-Agar, B1
2	Kolonie 47, PC-Agar, B1
3	Kolonie 49, PC-Agar, B1
4	Kolonie 50, PC-Agar, B1
5	Kolonie 51, PC-Agar, B1
6	Kolonie 52, PC-Agar, B1
7	Kolonie 53, PC-Agar, B1
8	Kolonie 54, PC-Agar, B1
9	Kolonie 55, PC-Agar, B1
10	Kolonie 56, PC-Agar, B1
N	Negativkontrolle
M	Gene Ruler 1kb DNA Ladder

Abb. 21 Kolonie-PCR vom 03.03.15 mit Primerkombination 2 (EUB338f/1387r)

Mit den Primern 63f und 1387r sind bei zwei Kolonien, bei der die DNA-Amplifikation mit den Primern EUB338f und 1387r nicht erfolgreich war, positive PCR-Produkte entstanden. Die Proben wurden noch nicht zur Sequenzierung gesendet.

4.1.3 Sequenzvergleich

Die Auswertung der Sequenzen der Kolonie-PCR-Produkte dient dazu, einen Überblick über die vorhandenen aeroben Mikroorganismen in der Biogasprobe zu erhalten.

Die Ergebnisse wurden von Frau Dipl. oec. troph. Dorit Binder ausgewertet (Tab. 29 Anlage 9). Eine Übersicht der vorkommenden Mikroorganismen in der untersuchten Biogasprobe vom 10.02.15 stellt das Diagramm in Abb. 22 dar.

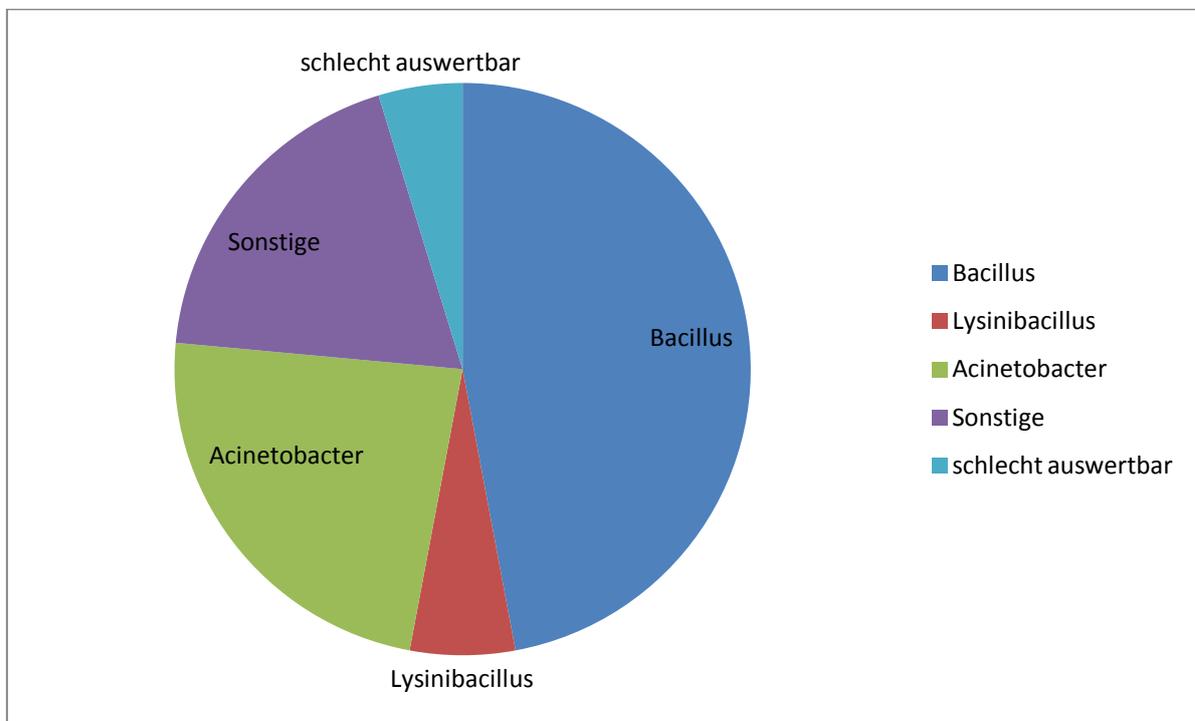


Abb. 22 Diagramm der identifizierten Mikroorganismen, Quelle: Frau Dipl. oec. troph. Dorit Binder

Die 85 Sequenzen der Kolonie-PCR-Produkte wurden ausgewertet. Die *Bacillus*-Gattung (47%) wurde bei 40 Proben identifiziert und stellt den größten Anteil der Mikroorganismen dar. Die Gattung der *Acinetobacter* (23%) wurde bei 20 Kolonien nachgewiesen. Die *Lysinibacillus*-Gattung (6%) wurde bei 5 Kolonien identifiziert. Die Sequenzen von 16 Kolonien wurden der Gruppe der sonstigen identifizierten Mikroorganismen (19%) zugewiesen. Die Sequenzen von 4 Proben gehören zum Anteil der schlecht auswertbaren Sequenzen (5%).

4.1.4 Optimierung der DNA-Isolierung

Die Optimierung des Zellaufschlusses und der DNA-Isolierung aus der Biomasse dienen zur Gewinnung von chromosomaler DNA für die PCR mit universellen Bakterienprimern. Die amplifizierten Produkte werden für die DNA-Klonierung eingesetzt. Die Messwerte und die Vorgehensweise für jeden Optimierungsversuch sind in der Anlage 1 aufgeführt.

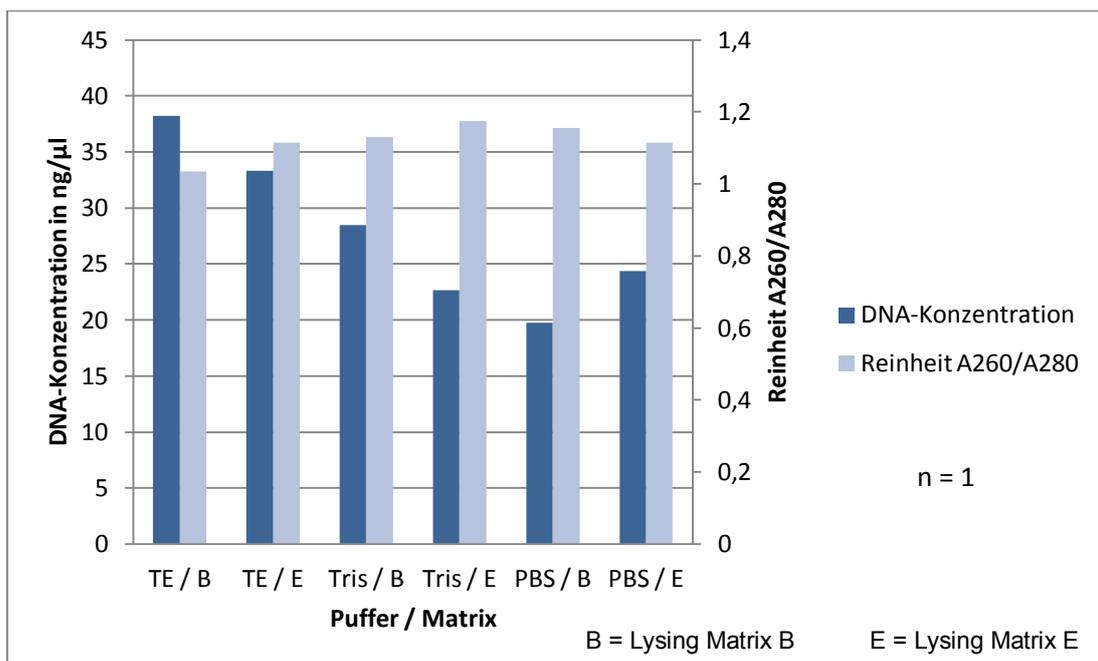


Abb. 23 DNA-Isolierung vom 26.01.15 Variation Puffer/Matrix (Probe 26.11.14)

Für die DNA-Isolierung in Abb. 23 wird der flüssige Überstand der Biogasprobe verwendet, um eine Verdünnung der Probe zu vermeiden. Aufgrund der unterschiedlichen DNA-Konzentrationen wird im nächsten Versuch die gesamte Probe mit festen und flüssigen Bestandteilen betrachtet.

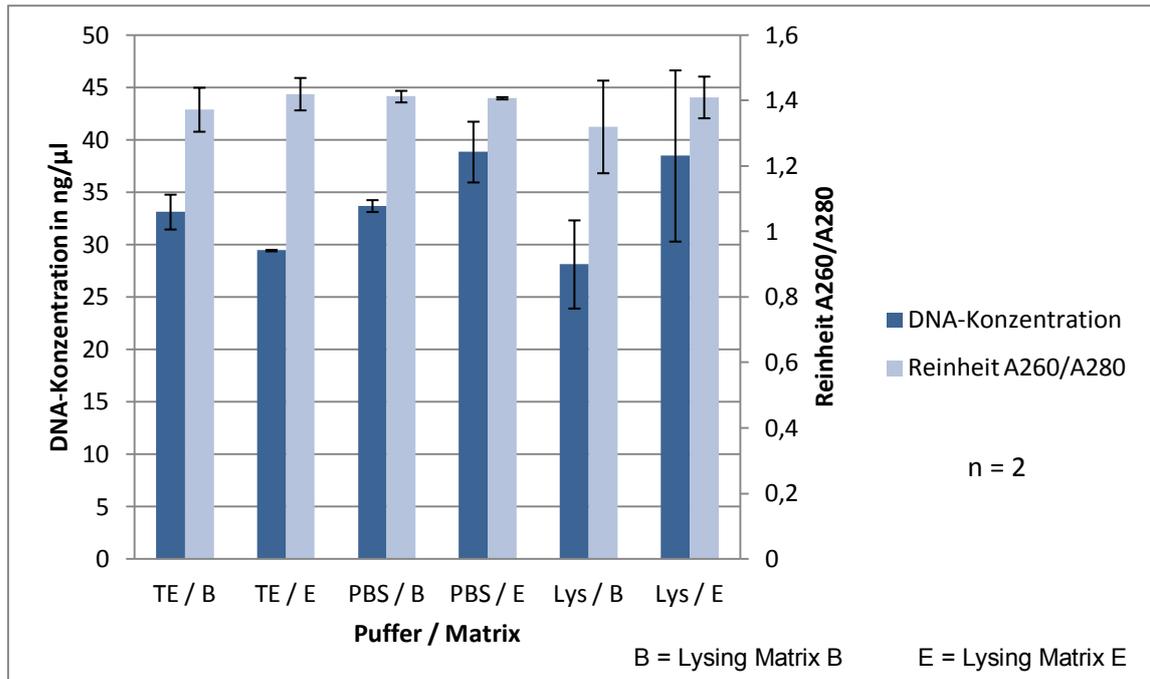


Abb. 24 DNA-Isolierung vom 03.02.15 Variation Puffer/Matrix (Probe 26.11.14)

Bei der DNA-Isolierung in Abb. 24 wird die gesamte Biogasprobe verwendet mit flüssigen und festen Bestandteilen. Die höchste DNA-Konzentration wurde bei der Verwendung des PBS-Puffers erzielt, daher wird dieser weiter verwendet.

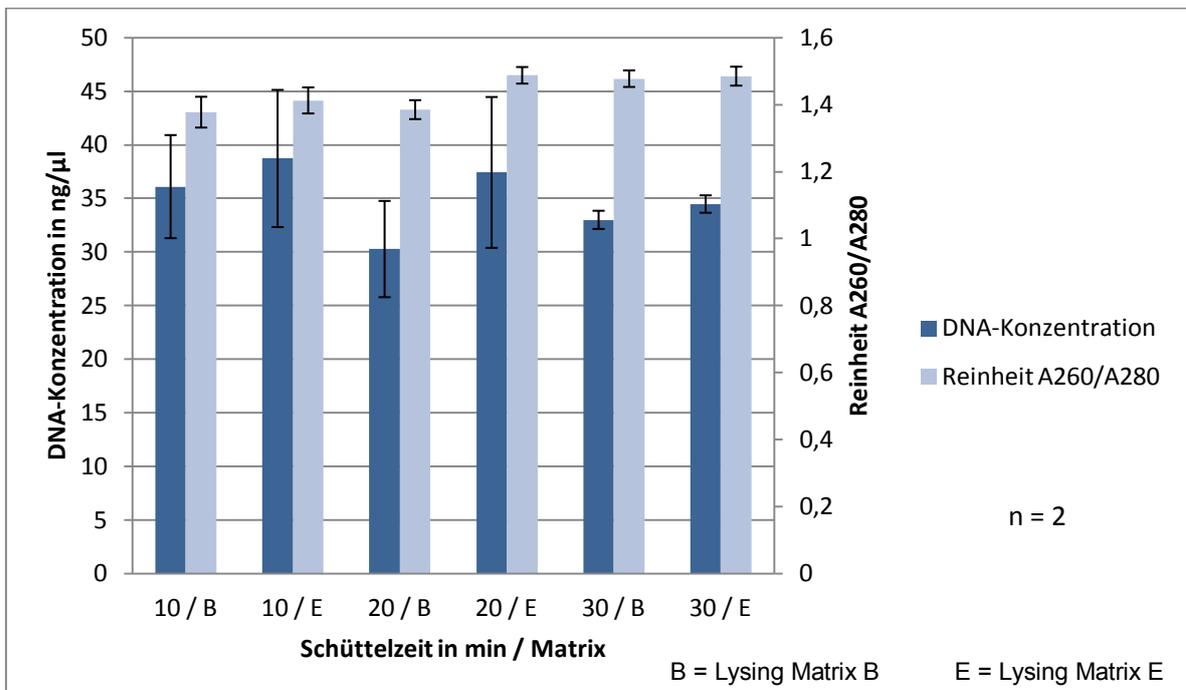


Abb. 25 DNA-Isolierung vom 04.02.15 Variation Schüttelzeit/Matrix (Probe 26.11.14)

Aufgrund der geringen Standardabweichung bei der DNA-Konzentration und der besseren Reinheit bei 30min Schüttelzeit (Abb. 25), wird mit dieser Zeit weiter gearbeitet.

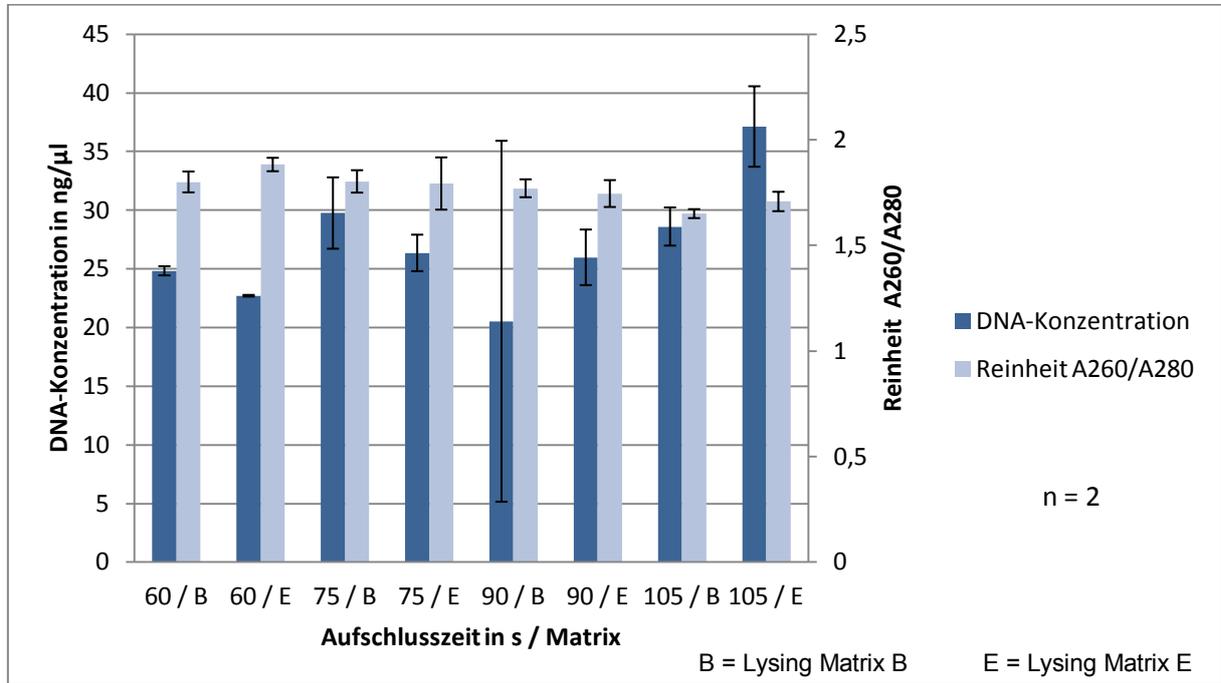


Abb. 26 DNA-Isolierung vom 05.02.15 Variation Aufschlusszeit/Matrix (Probe 26.11.14)

Die Zellaufschlusszeiten 60s und 75s werden im nächsten Versuch verglichen, da die DNA-Konzentration bei 75s etwas höher ist (Abb. 26). In den vorangegangenen Versuchen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Matrizes festgestellt, daher wird die Matrix B weiter verwendet.

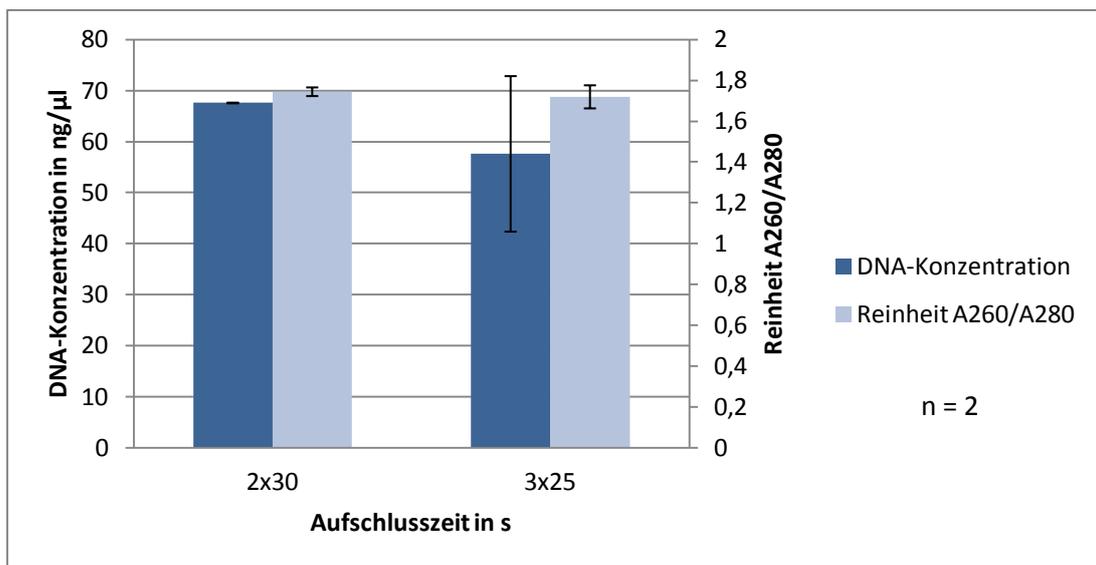
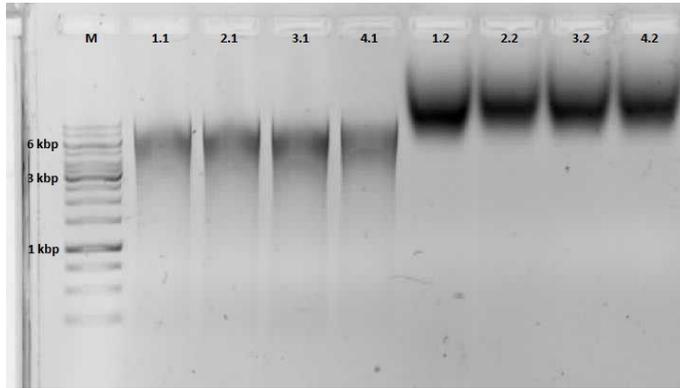


Abb. 27 DNA-Isolierung vom 11.02.15 Variation Aufschlusszeit (Probe 10.02.15)

Die Standardabweichung bei 75s Zellaufschlusszeit ist hoch (Abb. 27), daher wird der Vergleich der Aufschlusszeiten im nächsten Versuch wiederholt. Die DNA-Konzentration wurde durch die geänderte Probenvorbereitung auf über 60ng/μl erhöht bei der Aufschlusszeit 2×30s (Abb. 27).

Tab. 17 DNA-Konzentration und Reinheit Proben 11.02.15



Probe	DNA-Konzentration [ng/μl]	Reinheit A260/A280
M	Gene Ruler 1kb Ladder	
1	67,65	1,73
2	67,55	1,76
3	68,4	1,76
4	46,85	1,68

Abb. 28 DNA-Isolierung 11.02.15 1.1 bis 4.1 und Durchflüsse 1.2 bis 4.2

Auf dem Gelbild in Abb. 28 wurde die isolierte DNA aus der Optimierung vom 11.02.15 (Tab. 17) aufgetragen (1.1 bis 4.1) und die dazugehörigen Durchflüsse (1.2 bis 4.2) nach dem ersten Zentrifugieren der Säule mit dem peqGOLD Bacterial DNA Kit. Die isolierte DNA ist hochmolekular. Anhand der höher liegenden Banden der Durchflüsse ist zu erkennen, dass ein großer Anteil der DNA durch die Säule hindurchfließt und nicht an der Membran gebunden wird.

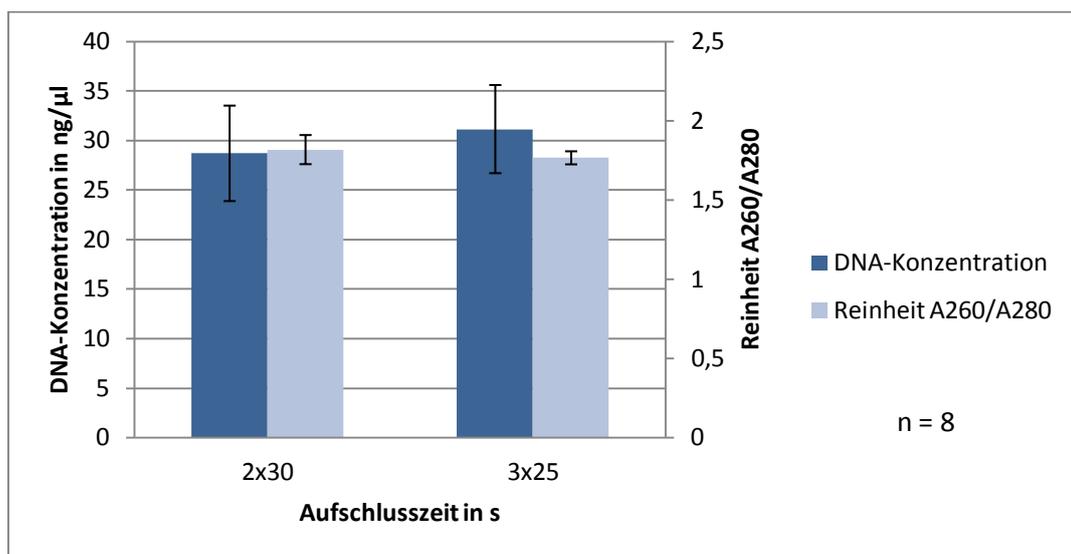


Abb. 29 DNA-Isolierung vom 16.02.15 Variation Aufschlusszeit (Probe 10.02.15)

Die Optimierung der DNA-Isolierung vom 11.02.15 wurde wiederholt (Abb. 29) mit weniger Pellets (s. 3.3.4), da in dem vorangegangenen Versuch (Abb. 27) bereits die Höhe der DNA-Konzentration optimiert wurde und nur der Vergleich der Zellaufschlusszeiten im Vordergrund stand.

Die DNA-Konzentration (Abb. 29) ist bei der Aufschlusszeit $3 \times 25s$ um $2,4ng/\mu l$ höher. Die Reinheit der DNA liegt bei der Aufschlusszeit $2 \times 30s$ im Gegensatz zu $3 \times 25s$ über 1,8 (Abb. 29). Die Standardabweichung bei der DNA-Konzentration und der Reinheit ist bei der Aufschlusszeit $3 \times 25s$ geringer als bei $2 \times 30s$ (Abb. 29). In Abb. 30 ist das letztendliche Vorgehen der optimierten DNA-Isolierung zusammenfassend dargestellt.



Abb. 30 optimierte DNA-Isolierung

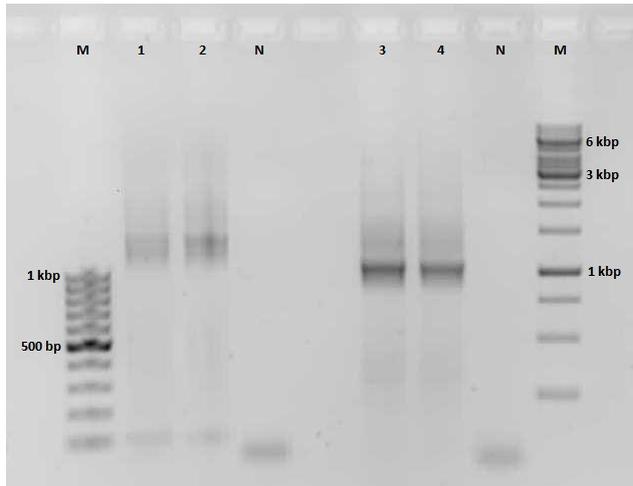
4.1.5 DNA-Klonierung und Isolierung des übertragenden Plasmides

Die Kultivierung von anaeroben Bakterien unter normalen Kulturbedingungen ist schwierig. Die DNA-Klonierung ist eine Methode, mit der versucht wird, anaerobe Mikroorganismen zu identifizieren. Die Klonierung erfolgt mit dem Kit pGEM[®]-T Vector Systems. Die Proben der DNA-Isolierung vom 16.02.15 werden für die PCR eingesetzt (Tab. 18).

Tab. 18 DNA-Konzentration und Reinheit der DNA-Isolierungen vom 16.02.15, Probe 10.02.15

Probe	DNA-Konzentration [ng/μl]	Reinheit A260/A280
2×30 P7	22,18	1,955
2×30 P8	23,455	1,81

Tab. 19 Beschreibung der PCR vom 09.03.15



universelle Bakterienprimer 1: 63f/1387r 55°C	
M	Gene Ruler 100bp DNA Ladder
1	Probe 2×30 P7
2	Probe 2×30 P8
N	Negativkontrolle
universelle Bakterienprimer 2: EUB338f/1387r 55°C	
3	Probe 2×30 P7
4	Probe 2×30 P8
N	Negativkontrolle
M	Gene Ruler 1kb DNA Ladder

Abb. 31 PCR mit DNA-Isolierung 09.03.15 mit Primerkombination 1 (63f/1387r) und Primerkombination 2 (EUB338f/1387r)

Die Messwerte vom NanoDrop® nach der Aufreinigung der PCR-Produkte 3 und 4, die für die Ligation eingesetzt wurden (Abb. 31, Tab. 19), sind in Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 20 DNA-Konzentration und Reinheit der PCR-Produkte

PCR-Produkt	DNA-Konzentration [ng/μl]	Reinheit A260/A280
3	46,30	1,895
4	44,55	1,925

In Tab. 21 sind die Ergebnisse des Blau-Weiß-Screenings dargestellt.

Tab. 21 Anzahl der KbE und Verhältnis von blau zu weiß

Probe	Anzahl KbE 80μl	Anzahl KbE 150μl	blau : weiß
SR 3	30 blau, 14 weiß	72 blau, 45 weiß	64,85 % : 35,15 %
SR 4	109 blau, 31 weiß	214 blau, 70 weiß	76,65 % : 23,35 %
PK	23 blau, 56 weiß	75 blau, 86 weiß	37,85 % : 62,15 %
HK	26 blau	80 blau	-

SR = Standard Reaktion mit PCR-Produkt, PK = Positivkontrolle mit Kontroll-DNA,
HK = Hintergrundkontrolle ohne DNA

Die Ergebnisse werden mit den vorgegebenen Werten aus dem „Technical Manual“ des pGEM[®]-T und pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, 2010) verglichen und ausgewertet. Die Anzahl der blauen und weißen gezählten KbE auf der PK entspricht den Anforderungen. Das Verhältnis von blauen zu weißen Kolonien auf der PK entspricht auch den vorgegebenen Werten. Die HK dient der Bestimmung der Anzahl von blauen Kolonien, die durch Religation des pGEM[®]-T Vektors entstehen.

Die Anzahl der blauen Kolonien in der HK dient als Vergleich zur Anzahl der blauen Kolonien in der Standardreaktion. Zwischen den Werten bei den blauen Kolonien der SR 3 und der HK sind die Abweichungen gering. Bei der SR 4 liegt die Anzahl der blauen Kolonien deutlich über der Anzahl der Kolonien auf der HK. Das Verhältnis von blau zu weiß ist bei beiden Transformationen mit der eigenen amplifizierten DNA umgekehrt zur PK.

Die Transformationseffizienz der kompetenten *E.coli*-Zellen JM109 der Firma Promega beträgt 2×10^7 KbE/ μ g DNA.

Isolierung des übertragenden Plasmides

Die Proben mit der isolierten Plasmid-DNA (Tab. 22) wurden auf einem Agarosegel aufgetragen (Abb. 32).

Tab. 22 rechts: DNA-Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA

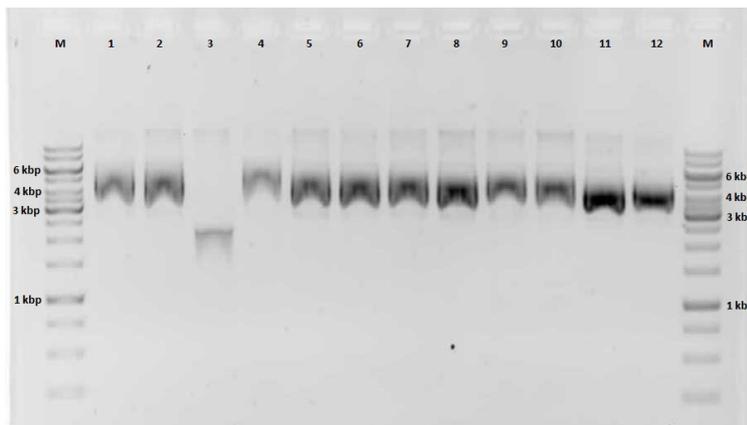


Abb. 32 Plasmidisolierung pGEM[®]-T Vektor 19.03.15

Probe	DNA-Konzentration [ng/ μ l]	Reinheit A260/A280
1	76,09	1,89
2	104,38	1,82
3	41,23	1,77
4	63,185	1,9
5	101,71	1,865
6	109,57	1,89
7	95,465	1,895
8	145,99	1,93
9	101,795	1,94
10	135,92	1,955
11	175,735	1,995
12	116,46	1,91
M	Gene Ruler 1kb DNA Ladder	

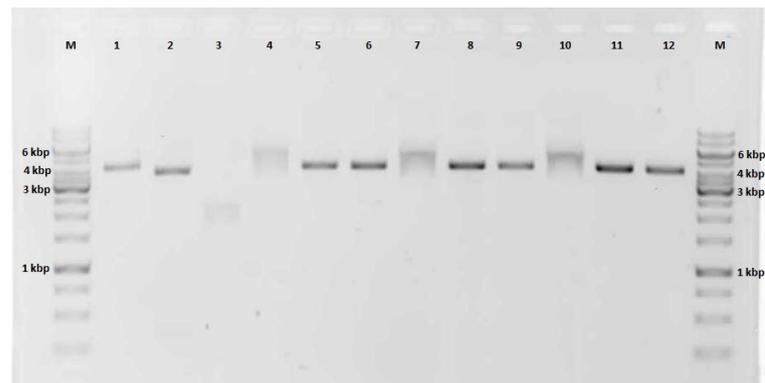


Abb. 33 Einzelverdau der Plasmide mit EcoRI 20.03.15

Das Gelbild vom Einzelverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI ist in Abb. 33 dargestellt. PCR-Produkt (1kbp) und Vektor (3kbp) ergeben eine Größe von 4kbp. In Probe 1 könnte ein größeres DNA-Fragment enthalten sein, da die Bande über 4kbp liegt. Die Banden der Proben 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12 befinden sich auf der Höhe von 4kbp. In Probe 3 ist kein Vektor enthalten. Die isolierte Plasmid-DNA in den Proben 4, 7, 10 wurde durch das Enzym EcoRI nicht geschnitten, da keine eindeutigen Banden sichtbar sind. Die isolierten Plasmide wurden noch nicht zur Sequenzierung gesendet.

4.2 Diskussion

4.2.1 Lebendzellzahlbestimmung und Masterplatten

Der Plate Count Agar dient zur Bestimmung der Anzahl der aeroben mikrobiellen Flora und der Nutrient Agar ist für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl kulturfähiger Organismen geeignet (Roth, 2014). Die Lebendzellzahl auf dem PC- und Nutrient Agar unterscheidet sich nicht wesentlich. Die Morphologie der Kolonien auf den beiden Vollmedien ist ähnlich und sie sind beide für die Kultivierung der Mikroorganismen in der Biogasprobe geeignet.

Der Mac Conkey Agar ist geeignet zur Identifizierung von gramnegativen Bakterien wie z.B. fakultativ anaeroben Enterobakterien und *Escherichia coli*. Der prozentuale Anteil der gewachsenen Kolonien auf dem MC Agar liegt unter 50%. Das heißt, dass der Anteil der gramnegativen Bakterien in der Probe gering ist. Die Bakterienart *Providencia alcalifaciens* wurde bei einer rosa gefärbten Kolonie auf dem PC Agar identifiziert und ist auch auf dem MC Agar gewachsen.

Diese Bakterienart gehört zur Familie der Enterobakterien. Die anderen, auf dem MC Agar gewachsenen Kolonien, die auf der PC Masterplatte untersucht und identifiziert wurden, waren keine Enterobakterien. Die Kolonien, die als gramnegative *Acinetobacter* auf der PC Masterplatte identifiziert wurden, sind auf dem MC Agar gewachsen, was das Wachstum von gramnegativen Bakterien auf dem Agar bestätigt.

Der PC Agar dient zur Bestimmung von aeroben Mikroorganismen, wie z.B. den Bakterienarten *Staphylococcus* und *Bacillus subtilis*. Die Bakterienarten *Bacillus subtilis* und *Lysinibacillus* wurden auf dem PC Agar nachgewiesen und die fakultativ anaerobe, grampositive Bakterienart *Bacillus cereus*. Verschiedene aerobe, grampositive Bakterien der *Bacillus*-Gattungen wurden durch den Sequenzvergleich identifiziert, z.B. *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus sporothermodurans* und *Bacillus sonorensis*. Mehrere Kolonien auf dem PC Agar wurden der Bakteriengattung der gramnegativen *Acinetobacter* zugeordnet.

Auf dem Nutrient Agar wachsen gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien z.B. *Enterobacteriaceae* und grampositive Bakterien wie z.B. *Bacillus* und *Eubacterium*. Mehrere *Bacillus*-Gattungen wurden auf dem PC Agar nachgewiesen und sind auch auf dem Nutrient Agar gewachsen. Aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae* wurde der Vertreter *Providencia alcalifaciens* bei einer Kolonie nachgewiesen (s. MC Agar).

Von den untersuchten Kolonien wurden 40 der *Bacillus*-Gattung zugeordnet, deren Wachstum auf dem PC- und Nutrient Agar zu erwarten war. Die Gattung der gramnegativen *Acinetobacter* wurde bei 20 Kolonien nachgewiesen, was das zu erwartende Wachstum von gramnegativen Bakterien auf Nutrient Agar bestätigt. Bei 5 Kolonien wurde die Bakteriengattung *Lysinibacillus* identifiziert. Die *Arthrobacter*-Gattung wurde bei 4 Kolonien festgestellt. Beide Gattungen gehören zu den aeroben, grampositiven Bakterien, deren Wachstum auf dem PC- und Nutrient Agar zu erwarten war.

Die zu erwartenden Bakteriengattungen *Staphylococcus* und *Eubacterium* sind nicht auf dem PC- und Nutrient Agar gewachsen. Die gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae* wurden nur bei einer Kolonie nachgewiesen. Die Gattung *Acidovorax* wurde bei einer Kolonie identifiziert. Die *Paenibacillus*-Gattung wurde bei einer Kolonie nachgewiesen.

4.2.2 Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese

Die Anwesenheit von RNA wurde in einigen PCR-Produkten nachgewiesen. Schwächere Banden und Schmier könnten durch Verunreinigungen entstanden sein. Die Erzeugung von zusätzlichen Banden und Schmier könnte durch Optimierung der PCR-Bedingungen verringert werden. Die Reduzierung der Anzahl der Zyklen von 40 auf 30 bei den Schritten im PCR-Programm könnte eine positive Auswirkung auf die Qualität der Amplifikationsprodukte haben (Marchesi et. al, 1998).

Wenn eine bestimmte Menge an PCR-Produkten gebildet wurde, nimmt die Vermehrungsrate stark ab (Mülhardt, 2013). Durch die Sammlung von Endprodukten wie z.B. DNA wird die Synthese verlangsamt. Die Neusynthese von Produkten wird aufgrund der steigenden Wahrscheinlichkeit der Anlagerung zweier fertiger DNA-Stränge reduziert. Die Menge an intakten Nukleotiden und intakter Polymerase kann abnehmen (Mülhardt, 2013).

Eine verstärkte Fehlanlagerung durch den Wettbewerb mit nicht spezifischen Produkten wie z.B. Primerdimeren ist möglich (Mülhardt, 2013). Dadurch nimmt die Zahl an falschen Amplifikationsprodukten zu. Das gebildete PCR-Produkt kann auf dem Agarosegel Schmier ober- und unterhalb der richtigen amplifizierten DNA-Sequenz oder zusätzliche Banden erzeugen.

Die Denaturierungs- und Annealingtemperaturen könnten variiert werden und die Dauer der Zyklen. Die Änderung der $MgCl_2$ -Konzentration oder Zusätze wie z.B. DMSO könnten zur Verbesserung der PCR-Bedingungen führen. Die Anlagerung der Primer, die Spaltung der DNA-Doppelstränge bei der Denaturierung, die Spezifität des Produktes, die Entstehung von Primerdimeren und die Fehlerrate werden durch Mg^{2+} beeinflusst (Mülhardt, 2013).

Verschiedene Zusätze wie z.B. DMSO, Betain und Formamid könnten eine Steigerung der Spezifität bewirken und die Amplifikation von Sequenzen mit hohem Gehalt an Guanin und Cytosin erleichtern (Mülhardt, 2013).

Die zusätzlichen PCR-Banden könnten auch durch die Anwesenheit von mehreren verwandten Sequenzen in der verwendeten Ausgangs-DNA entstanden sein. Die verwendeten Primer wurden universell für Bakterien konzipiert und ihre Sequenz ist nicht spezifisch für eine bestimmte Bakterienart. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die Bildung unerwünschter PCR-Produkte (Mülhardt, 2013).

4.2.3 Sequenzvergleich

Die für den Abbau von Stärke und Zellulose, die Spaltung von Eiweißen und Zersetzung von Fetten verantwortlichen aeroben, grampositiven Bakterien der *Bacillus*-Gattung wurden in der Probe identifiziert. Zu den nachgewiesenen Arten gehören *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus sonorensis* und die fakultativ anaerobe, grampositive Bakterienart *Bacillus cereus*.

Die Bakteriengattungen *Lysinibacillus* und *Acinetobacter* wurden identifiziert, die bereits in Grassilage-Biogasfermentern nachgewiesen wurden (Wang, 2014). Zu den eher seltenen identifizierten Bakterien gehört die Gattung *Arthrobacter*. Diese gehören zur Art der *Actinobacteria* und zählen zu den vorkommenden Mikroorganismen in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe von Biogasanlagen. Die Bakterienart *Providencia alcalifaciens* wurde bei einer Kolonie identifiziert und gehört zur Familie der Enterobakterien. Die Gattungen *Acidovorax* und *Paenibacillus* wurden auch identifiziert.

4.2.4 Optimierung der DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde durch Änderung der Probenvorbereitung (Puffer, Schüttelzeit) und Variation des Zellaufschlusses (Matrix, Zeit) optimiert. Die DNA-Konzentration wurde erhöht auf über 60ng/µl und eine DNA-Reinheit von 1,8 erzielt.

Die Zellaufschlusszeiten 2×30s und 3×25s unterscheiden sich hinsichtlich der Höhe der DNA-Konzentration und der Reinheit der DNA nicht wesentlich. Eine eindeutige Aussage, welche Zellaufschlusszeit besser geeignet ist, um die Zellen in der Biomasse aufzuschließen, konnte nicht getroffen werden. Die Zeiten könnten in weiteren Versuchen näher untersucht werden.

Die Säule könnte überladen sein mit einer zu großen DNA-Menge, da in dem ersten Durchfluss noch höher molekulare DNA enthalten ist. Daher könnte die DNA-Isolierung mit dem peqGOLD Bacterial DNA Kit genauer untersucht werden.

Der Einfluss der Schüttelzeit mit PBS-Puffer könnte näher betrachtet werden, aufgrund der hohen Standardabweichung bei den Werten unter 30min. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der DNA-Isolierung wäre, die Probe nach dem ersten Schüttelvorgang mit PBS-Puffer zu filtrieren, um eine weitere Verdünnung der Probe zu vermeiden, die

DNA-Konzentration weiter zu erhöhen und grobe Bestandteile abzutrennen. Der Vergleich weiterer DNA-Isolierungs-Kits könnte ebenso in Betracht gezogen werden.

Die isolierte DNA könnte in der PCR mit universellen Bakterien- und Pflanzenprimern genauer untersucht werden. Die Möglichkeit besteht, dass noch zu größeren Anteilen pflanzliche DNA enthalten ist, deren weitgehende Entfernung bei der DNA-Isolierung berücksichtigt werden könnte.

4.2.5 DNA-Klonierung und Isolierung des übertragenden Plasmides

Die PCR mit der isolierten Gesamt-DNA aus der Biogasprobe vom 10.02.15 lieferte Amplifikationsprodukte, die erfolgreich für die DNA-Klonierung eingesetzt wurden. Eine Steigerung der Qualität der PCR-Produkte könnte durch Veränderung verschiedener Parameter im PCR-Programm erreicht werden. Die Anzahl der Zyklen, die Dauer der Zyklen und die Temperaturen könnten variiert werden.

Die Eigenschaften des für die Ligation verwendeten PCR-Produktes beeinflussen das Verhältnis von blauen zu weißen Kolonien. Die Kontroll-DNA wurde entwickelt, um mehr weiße als blaue Kolonien zu erzeugen, was durch die Ergebnisse des Blau-Weiß-Screenings bestätigt wurde.

Bei der DNA-Klonierung mit der eigenen amplifizierten DNA wurden mehr blaue als weiße Transformanden erhalten. Die Ergebnisse der Transformation mit der Kontroll-DNA lassen sich nicht direkt mit den erzielten Ergebnissen aus der Transformation mit der eigenen amplifizierten DNA-Sequenz vergleichen, da das eigene PCR-Produkt im Gegensatz zur Kontroll-DNA andere Eigenschaften z.B. eine andere Länge besitzt (Promega, 2010).

Das Verhältnis von Vektor zu Insert kann das Ergebnis der Transformation wesentlich beeinflussen. Aufgrund fehlender 3'-T-überhängenden Enden, die z.B. durch einen unvollständigen Verdau entstehen, kann der pGEM[®]-T Vektor wieder zusammengefügt werden in der Ligation und als Ergebnis werden blaue Kolonien gebildet.

Durch den Einzelverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI wurde nachgewiesen, dass die eigenen amplifizierten PCR-Produkte im pGEM[®]-T Vektor enthalten sind und die DNA-Klonierung erfolgreich war. Die endgültigen Ergebnisse werden erst durch die Auswertung der Sequenzen erhalten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden Mikroorganismen zu identifizieren, die in Proben aus der Versäuerungsstufe von zweistufigen Biogasanlagen enthalten sind.

Bei der Biogasprobe vom 26.11.14 wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die DNA-Isolierung durchgeführt. Die Biogasprobe vom 10.02.15 wurde mit folgenden Methoden untersucht: Bestimmung der Lebendzellzahl auf dem Plate Count- und Nutrient Agar, Anlegen von Masterplatten auf dem PC-, Nutrient- und Mac Conkey Agar, Kolonie-PCR, Optimierung der DNA-Isolierung, PCR mit der isolierten DNA, DNA-Klonierung und Isolierung des übertragenden Plasmides.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl ergab, dass PC- und Nutrient Agar zur Kultivierung der Mikroorganismen geeignet sind. Die geringe Anzahl an gewachsenen Kolonien auf dem Mac Conkey Agar zeigt, dass wenige gramnegative Bakterien in der Probe vorhanden sind.

In der Kolonie-PCR von der PC Masterplatte sind 85 positive PCR-Produkte von 100 untersuchten Kolonien mit den universellen Bakterienprimern EUB338f und 1387r entstanden, die zur Sequenzierung gesendet wurden.

Durch den Sequenzvergleich wurden verschiedene Mikroorganismen identifiziert: die Bakteriengattungen *Bacillus*, *Lysinibacillus* und *Acinetobacter*. In einigen Proben wurde die Gattung der *Arthrobacter* nachgewiesen.

Die DNA-Isolierung aus der Biogasprobe wurde durch die Änderung der Probenvorbereitung (Puffer, Schüttelzeit) und durch Variation des Zellaufschlusses (Matrix, Zeit) optimiert. Die isolierte DNA wurde für die PCR eingesetzt.

Die DNA-Klonierung mit dem pGEM[®]-T Vektor von PCR-Produkten, die durch Verwendung der isolierten chromosomalen DNA entstanden sind, war erfolgreich.

Literaturverzeichnis**Bücher**

Brown, T.A.: Gentechnologie für Einsteiger, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 2002, ISBN 3-8274-1302-8

Brown, T.A.: Gentechnologie für Einsteiger, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2011, ISBN 978-3-8274-2868-4

Eder, B.: Biogas Praxis, ökobuch Verlag, Staufen bei Freiburg, 2007, ISBN 978-3-936896-13-8

Horton, H. R.: Biologie, Biochemie, 4. aktualisierte Auflage, Pearson Deutschland GmbH, 2008

Kayser, O.: Grundwissen Pharmazeutische Biotechnologie, 1. Auflage, B.G. Teubner GmbH, 2002, ISBN 3-519-03553-7

Mülhardt, C.: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 7. Auflage, Springer-Verlag Heidelberg, Berlin, 2013, ISBN 978-3-642-34635-4

Nicholl, D.: Gentechnische Methoden, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 1995, ISBN 3-86025-298-4

Schmid, R.: Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002, ISBN 3-527-30865-2

Zeitschriftenartikel

Marchesi, J.R.; Sato, T.; Weightman, A.J.; Martin, T.A.; Fry, J.C.; Hiom, S.J.; Wade, W.G.: Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA, in: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 64, No. 2, Februar 1998, S. 795–799

Miyashita, A.; Mochimaru, H.; Kazama, H.; Ohashi, A.; Yamaguchi, T.; Nunoura, T.; Horikoshi, K.; Takai, K.; Imachi, H.: Development of 16S rRNA gene-targeted primers for detection of archaeal anaerobic methanotrophs (ANMEs), in: Federation of European Microbiological Societies, Microbiol Lett 297, Mai, 2009, S. 31–37

Prüß, H., Schattner, T., Schlegel, M., 2008: Biogaserzeugung, Bioerdgaseinspeisung und räumlich getrennte KWK-Verstromung: ein Praxisbeispiel, Darmstadt, HEAG Süd Hessische Energie AG

Abschlussarbeiten

Köllmeier, Tanja: Analyse spezialisierter Bakteriengemeinschaften und deren cellulolytische Hauptvertreter für die Hydrolyse in thermophilen Biogasanlagen, Dissertation, Technische Universität München, 2013

Schmidt, Karsten: Konzeption und Aufbau einer kleintechnischen Biogasanlage mit nachfolgender Vergärung von Restmüll, Diplomarbeit, MFH Iserlohn, 1996

Seyfarth, Kerstin: Mikrobiologie der Fermentation in NawaRo-Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung des Abbaus von Propionsäure, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2012

Wang, Likun: Analyse von Mikroorganismenpopulation aus Grassilage-Biogasfermentern, Masterarbeit, Hochschule Anhalt, 2014

Webseiten und Webdokumente

Bauer, Christoph: Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen, Schriftenreihe der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft, 2009

Busch, Günter: Zweistufige Biogasverfahren, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Senftenberg, 2014

Lubenau, Udo: Biogaszusammensetzung und innovative Biogasaufbereitungsverfahren, DBI Gas- und Umwelttechnik GmbH, Biogas-Forum Leipzig, 2009

Messelhäußler, Ute: Kultivierungsverfahren für Bakterien in: Busch, U.(Hrsg.): Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik, Grundlegende Methoden und Anwendungen, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010

Promega: „Technical Manual“ pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems, TM042, 2010

Roth, Carl: Produkt-Datenblatt, Mac Conkey Agar, 2014, Produkt-Datenblatt, Nähragar, 2014, Produkt-Datenblatt, Plate Count Agar, 2014

Anlagenverzeichnis
Anlagen auf beigefügter CD

Abbildungsverzeichnis.....	-2-
Tabellenverzeichnis.....	-3-
Anlage 1 Ergebnisse der DNA-Isolierung Probe 26.11.14 und 10.02.15.....	-4-
Anlage 2 Arbeitsanweisung peqGOLD Bacterial DNA Kit.....	-16-
Anlage 3 Protokoll Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System.....	-18-
Anlage 4 Protokoll pGEM [®] -T and pGEM [®] -T Easy Vector Systems.....	-19-
Anlage 5 Protokoll Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit.....	-21-
Anlage 6 Ergebnisse der Lebendzellzahlbestimmung Probe 26.11.14 und 10.02.15.....	-23-
Anlage 7 Morphologie PC-Masterplatte und Ergebnisse Kolonie-PCR.....	-24-
Anlage 8 Gelbilder der Kolonie-PCR von der PC Masterplatte (Probe 10.02.15).....	-29-
Anlage 9 Sequenzvergleich der PCR-Produkte (Probe 10.02.15).....	-36-

Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt oder anderswo als Prüfungsarbeit eingereicht.

Bernburg, den 08.07.15

Franziska Brandt