

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2013

Jenni Yli-Puntari

# BIOKAASUPROSESSIN METANOGEENISTEN BAKTEERIEN MÄÄRITTÄMINEN

- Menetelmän kehitys



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2013 | 36 sivua

Annika Brandt, FT

Jenni Yli-Puntari

# BIOKAASUPROSESSIN METANOGEENISTEN BAKTEERIEN MÄÄRITTÄMINEN – MENETELMÄN KEHITYS

Opinnäytetyössä kehitettiin menetelmä metanogeenisten bakteerien määrittämiseen biokaasureaktorista 454-pyrosekvensointimenetelmällä. Tavoitteena oli määrittää biokaasureaktorin metanogeenien bakteeripopulaation lähtötaso tiettyinä aikapisteinä mcrA-geenin avulla. Opinnäytetyö tehtiin Turun ammattikorkeakoulun T&K-projekti Susbiolle ja työssä analysoitiin pilot-mittakaavan biokaasureaktoria.

Työn teoriaosassa käsitellään anaerobista mädätystä, metanogeenisiä bakteereita, sekvensoinnin teoriaa sekä metaaninmuodostuksessa toimivan koentsyymin rakenneosan geenisekvenssiä.

Käytännön työssä käsitellään menetelmän kehitystä eli näytteiden esikäsittelyä, PCR-menetelmällä tuotettavien sekvensoitavien näytteiden valmistusta ja sekvensointia GS Junior-laitteella.

Menetelmä vaikuttaa alustavien testauksien mukaan toimivalta. Raakadataa analysoitiin Mothur-ohjelmalla, jolloin ensimmäisen aikapistemäärityksen tuloksena oli yli 7000 uniikkia sekvenssiä. Seuraavissa aikapistemäärityksissä uniikkien sekvenssien määrä putosi noin puoleen ensimmäisestä määrityksestä, mikä kertoisi bakteeripopulaation monimuotoisuuden vähentymisestä koejakson aikana. Aikapistenäytteet otettiin noin kuukauden välein.

Koska mcrA-tietokantaa ei ollut käytettävissä, ei metanogeenisiä bakteereja pystytty karakterisoimaan ja näin ollen lopullista varmistusta menetelmän toimivuudesta ei saatu. Tutkimusta tullaan jatkamaan luomalla mcrA-tietokanta, jonka avulla voidaan karakterisoida metanogeeniset bakteerit biokaasureaktorissa.

ASIASANAT:

biokaasu, metanogeeniset bakteerit, mcrA-geeni, 454-pyrosekvensointi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2013 | 36 pages

Annika Brandt, PhD

Jenni Yli-Puntari

## QUANTIFICATION OF METHANOGENIC BACTERIA FROM A BIOGAS PROCESS – METHOD DEVELOPMENT

This thesis concerned developing a method in order to quantify methanogenic bacteria from a pilot scale biogas plant treating sewage sludge by using the 454 pyrosequencing method. The thesis was part of the Susbio R&D project at Turku University of Applied Sciences. The goal was to determine the baseline of the methanogenic population in the pilot scale biogas plant within a certain time window by using the *mcrA* gene.

In the theory section of this thesis, anaerobic digestion, methanogenic bacteria, the background of sequencing, and the gene sequence of a coenzyme working in methane formation are discussed.

The practical part concerns the method development, sample preparation, and sequencing with the GS Junior device.

The method appears to be functional based on the preliminary testing. The raw data was analyzed with Mothur. The first set of samples gave a result of 7000 unique sequences and in the second and third sets the amount of unique sequences dropped nearly to a half from the first set. This would indicate a decrease in biodiversity during the time window. The sample sets were taken on a monthly basis.

Because of the absence of an *mcrA* database, methanogens could not be characterized. Thus the functionality of the method was not confirmed. The research will be continued by creating an *mcrA* database which can be used to characterize methanogenic bacteria in the biogas plant.

### KEYWORDS:

biogas, methanogenic bacteria, *mcrA* gene, 454 pyrosequencing

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO</b>	<b>13</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 ANAEROBINEN MÄDÄTYSPROSESSI BIOKAASUN VALMISTUKSESSA</b>	<b>9</b>
2.1 Mädätysprosessin vaiheet	11
<b>3 METANOGEENISET BAKTEERIT</b>	<b>14</b>
3.1 Metanogeenisten bakteerien substraattispesifisyys	15
3.2 Metyylikoentsyymi M reduktaasi	17
3.3 mcrA-geeni	18
<b>4 BAKTEERIEN TUNNISTUKSESSA KÄYTETTYJÄ MENETELMIÄ</b>	<b>19</b>
4.1 Sanger sekvensointi	19
4.2 Seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmät	20
4.2.1 454-pyrosequensointi	21
<b>5 MENETELMÄN KEHITYS</b>	<b>24</b>
5.1 DNA-eristyskitin valinta	24
5.2 Alukkeiden valinta	25
5.3 PCR-olosuhteiden optimointi	25
<b>6 METANOGEENISTEN BAKTEERIEN MÄÄRITYS</b>	<b>27</b>
6.1 Näyte	27
6.2 DNA:n eristys	28
6.3 Eristetyn DNA:n monistaminen ja puhdistaminen	28
6.4 Monistetun DNA:n valmistelu sekvensointiin	28
6.5 Sekvensointi	30
6.6 Sekvensointitulosten analysointi	31
<b>7 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>32</b>
7.1 Hampurin ammattikorkeakoulun tulokset	34
<b>LÄHTEET</b>	<b>35</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Kittitestien tulokset ja MO BIO:n kitillä eristettyjen näytteiden spektrit  
Liite 2. Eristettyjen aikapistenäytteiden puhtaudet, pitoisuudet ja päivämäärät  
Liite 3. Aikapisteiden Bioanalyzer-geelikuvat ensimmäisen ja toisen PCR:n ja geeliltä leikkaamisten jälkeen

## KUVAT

Kuva 1. Anaerobisen mädätysprosessin vaiheet	11
Kuva 2. Metanogeenisten bakteerien asema elämän fylogeneettisessä puussa	16
Kuva 3. Metyylikoentsyymi M reduktaasi (MCR) katalysoi reaktiota, jossa metyylikoentsyymi M ja koentsyymi B muutetaan metaaniksi ja heterodisulfidiksi (CoM-S-S-CoB)	17
Kuva 4. Yllä on metyylikoentsyymi M reduktaasi ja sen alla $\alpha$ , $\beta$ ja $\gamma$ alayksiköt. Violetilla on merkitty kofaktori $F_{430}$ . Keltaisilla nuolilla on osoitettu homologiset kohdat	18
Kuva 5. Alukkeiden kiinnittyminen haluttuun sekvenssiin	22
Kuva 6. Emulsio-PCR	22
Kuva 7. Nukleotidin liittymisen aikaansaama reaktio	23
Kuva 8. Sekvensointihelmet emulsio-PCR:n jälkeen	30

## TAULUKOT

Taulukko 1. Primereiden nimet, sekvenssit ja amplikonien pituudet	25
Taulukko 2. Käytetyt PCR-olosuhteet.	26
Taulukko 3. Emulsio-PCR:n ohjelma.	29
Taulukko 4. Sekvensoinnissa saadut arvot ja Rochen antamat raja-arvot.	30
Taulukko 5. Kaikkien ja uniikkien sekvenssien määrä aikapisteittäin.	32
Taulukko 6. Hampurin AMK:ssa määritetyt metanogeeniset bakteerit niiden morfologian perusteella aikapisteittäin.	34

## KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Adapteri	Amplikonin päähän PCR:n avulla kiinnitettävä lyhyt yksijuosteinen DNA-nauha
Amplikoni	PCR:n avulla valmistettu kaksijuosteinen DNA-fragmentti, joka koostuu käytetyistä alukkeista sekä kohdesekvenssistä
Asetotrofi	Metanogeeninen bakteeri, joka tuottaa metaania asetaattia pilkkomalla
CCD	Charged coupled device, sensori, joka muuttaa kameran taltioiman valon digitaaliseksi dataksi
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis, geielektroforeesi, jossa erotellaan muun muassa DNA-fragmentteja toisistaan. Geelissä denaturoivien kemikaalien pitoisuus nousee asteittain.
Eksoentsyymi	Solun ulkopuolelle erittyvä entsyymi
Hydrogenotrofi	Metanogeeninen bakteeri, joka tuottaa metaania vedystä
Key	Neljän emäksen sekvenssi, jonka avulla analyysiohjelma tunnistaa sekvensoitavan kohdan pikotiitterilevyiltä
Koentsyymi	Pieni orgaaninen yhdiste, joka liittyy entsyymiin edistämällä sen toimintaa
Kofaktori	Pieni epäorgaaninen yhdiste, yleensä metalli, joka liittyy entsyymiin edesauttaen sen toimintaa

Metylotrofi	Metanogeeninen bakteeri, joka tuottaa metaania metyyli-ryhmän omaavista yhdisteistä
MID	Molecular identifier, kymmenen emäksen mittainen näytekohtainen viivakoodi
Mädäte	Biokaasureaktorissa oleva biomassa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
T-RFLP	Terminal-restriction fragment length polymorphism, menetelmä, jossa fluoresoivalla merkkiaineella leimatut fragmentit pilkotaan restriktioentsyymillä, lajitellaan kokonsa mukaan ja havaitaan automatisoidulla sekvenssianalysaattorilla
TTGE	Temporal temperature gradient gel electrophoresis, geelielektroforeesi, jossa geelimatriisi on samanlainen mutta lämpötilaa nostetaan asteittain ajon edetessä
Vedyn osapaine	Vedyn määrä biokaasureaktorissa
VFA	Volatile fatty acids, haihtuvat rasvahapot, anaerobisen mädätyksen välituote

# 1 JOHDANTO

Biokaasu on suurimmaksi osaksi metaania, joka muodostuu biokaasureaktorissa metanogeenisten bakteerien toiminnan seurauksena anaerobisen mädätyksen loppuvaiheessa. Biokaasu on uusiutuvaa energiaa ja sitä voidaan hyödyntää lämmön ja sähkön tuotannossa sekä siitä voidaan jalostaa polttoainetta. (BG) Biokaasun tuotannossa toimivia mikrobeja on tutkittu mutta niiden avulla saatavaa tietoa ei vielä hyödynnetä biokaasun tuotannossa. Metanogeenien tunnistaminen saattaa edesauttaa sekä reaktorissa vallitsevien olosuhteiden ymmärtämistä että biokaasuprosessin optimointia.

Opinnäytetyö on tehty Turun ammattikorkeakoulun T&K –projekti Susbiolle. Teoriaosuudessa käsitellään anaerobista mädätystä, metanogeenisiä bakteereita ja sekvensoinnin perustaa sekä metaanin muodostuksessa toimivan metyylikoentsyymi M reduktaasin  $\alpha$ -alalyksikön geenisekvenssiä (mcrA).

Tarkoituksena opinnäytetyössä oli kehittää menetelmä, jonka avulla biokaasureaktorin mädätteestä pystytään 454-pyrosekvensoinnilla tunnistamaan ja luokittelemaan anaerobisen mädätyksen metanogeeniset bakteerit. Näytteinä opinnäytetyössä käytettiin Susbion pilot-mittakaavan biokaasureaktorista saatua mädätettä.

Käytännön osiossa käsitellään menetelmän kehitystä, näytteiden esikäsittelyä, PCR-menetelmällä tuotettavien sekvensoitavien näytteiden valmistusta sekä niiden sekvensointia 454-GS Junior -laitteella pyrosekvensointiin perustuvalla menetelmällä.

Rinnakkaisnäytteet lähetettiin Saksaan Hampurin ammattikorkeakouluun, missä metanogeenisiä bakteereja karakterisoidaan mikroskooppimenetelmällä niiden morfologian perusteella. Lisäksi samoista näytteistä, kuin opinnäytetyön tutkimus suoritettiin, määritettiin myös 16S rRNA-geenin avulla biokaasuprosessin mikrobi.

## 2 ANAEROBINEN MÄDÄTYSPROSESSI BIOKAASUN VALMISTUKSESSA

Anaerobinen mädätys on moniosainen prosessi, joka riippuu monen eri mikrobin toiminnasta ja niiden toiminnan keskinäisistä suhteista. Prosessin toimivuus riippuu myös monista tekijöistä esimerkiksi lämpötilasta, sekoituksesta, viipymästä, inhibition määrästä ja pH:sta. (Appels ym. 2008)

Anaerobinen mädätys toimii kahdella lämpötila-alueella; mesofiilinen, joka on noin 37 °C ja termofiilinen alueella 50 - 55 °C. (Latvala 2009) Vakaaat lämpötilaolosuhteet tulisi säilyttää koko ajan reaktorin toimivuuden kannalta. Lämpötilavaihtelut vaikuttavat bakteereihin, etenkin metanogeenisiin, jotka voivat saada aikaan prosessin epäonnistumisen yhdessä päivässä lämpötilan muuttuessa yli asteen. (Boe 2006; Appels ym. 2008)

Sekoituksella pyritään luomaan yhtenäiset kemialliset, fysikaaliset ja biologiset olosuhteet koko reaktoriin. Sekoituksella edesautetaan lämmön ja ravinteiden tasaista jakautumista reaktorissa sekä kaasukuplien vapautumista. (Appels 2008)

Viipymä on se aika, joka biomassalta kestää kulkeutua reaktorin läpi. Viipymän tulee olla sellainen, että mikro-organismit ehtivät hajottaa mädätteessä olevan orgaanisen materiaalin. (Appels ym. 2008) Biomassan tulee myös viipyä reaktorissa riittävän kauan, jotta bakteeripopulaatio pystyy jakautumaan tässä tuoreessa biomassassa, jolloin bakteeripopulaatio pystyy kompensoimaan lähtevän biomassan mukana poistuvien bakteerien osuuden. (Turovskiy & Mathai 2006, 177) Liian lyhyt viipymä aiheuttaa metanogeenien huuhtoutumisen lietteen mukana, joka havaitaan VFA-pitoisuuksien nousuna. (Appels ym. 2008)

Korkeammassa lämpötilassa suurempi osa patogeeneistä kuolee, orgaaninen aines liukenee paremmin ja reaktionopeudet kasvavat biologisten ja kemiallisten hajoamisreaktioiden osalta. (Appels 2008) Termofiilisessa mädätysprosessissa vapaan ammoniakin osuus kasvaa verrattuna mesofiiliseen reaktioon,

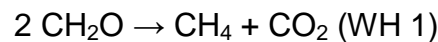
koska proteiinien hajoaminen on nopeampaa korkeammassa lämpötilassa. (Appels 2008) Ammoniakki toimii inhibiittorina mikro-organismeille, koska sen oletetaan pystyvän kulkeutumaan solukalvon läpi sisälle soluun. Solussa se muuttuu ammoniakista ammoniumiksi aiheuttaen vedyn tarpeen soluun, minkä solu korvaa ottamalla vetyä ulkopuolelta. Vetyä ottamalla solu pyrkii pitämään pH:n tasaisena ja poistaa samalla kaliumia aiheuttaen soluun kaliumin puutteen. (Schnürer & Jarvis, 2010, s.56) Termofiiliseen mädätysprosessiin tarvitaan kontrolloidummat olosuhteet kuin mesofiiliseen, koska termofiilinen prosessi on herkempi inhibitiolle nopeammin vapautuvien ammoniakkin ja VFA:n takia. (Boe 2006; Appels ym. 2008) Koska mesofiilisessä prosessissa lämpötila on noin 37 °C, sen bakteeripopulaatio on monimuotoisempaa ja lajikoostumus hyvin erilainen verrattuna termofiiliseen prosessiin. (Ritari ym. 2012)

VFA eli haihtuvat rasvahapot ovat tärkein anaerobisen mädätyksen välituote, koska metanogeenit käyttävät VFA:n johdannaisia metaboliassaan. VFA:n pitoisuus vaikuttaa prosessin happamuuteen, koska sen pitoisuuden noustessa pH laskee, jolloin metanogeenisten bakteerien toiminta heikkenee ja myös hydrolyysi ja haponmuodostus estyvät. VFA-pitoisuuden nousu kertoo prosessin epätasapainosta, esimerkiksi liian nopeasta syötöstä, lämpötilan vaihteluista tai myrkyllisistä yhdisteistä. Ongelmatilanteessa metanogeenit eivät käytä vetyä ja VFA:ta tarpeeksi nopeasti, joten niitä kertyy reaktoriin ja pH laskee. VFA on myös suurina pitoisuuksina myrkyllistä mikro-organismeille. VFA-pitoisuuden laskiessa pH nousee, jolloin metanogeenit joutuvat pois optimi pH-alueeltaan, mikä taas vaikuttaa niiden kasvuun ja samalla metanogeenien käyttämät substraatit vähenevät. (Appels 2008)

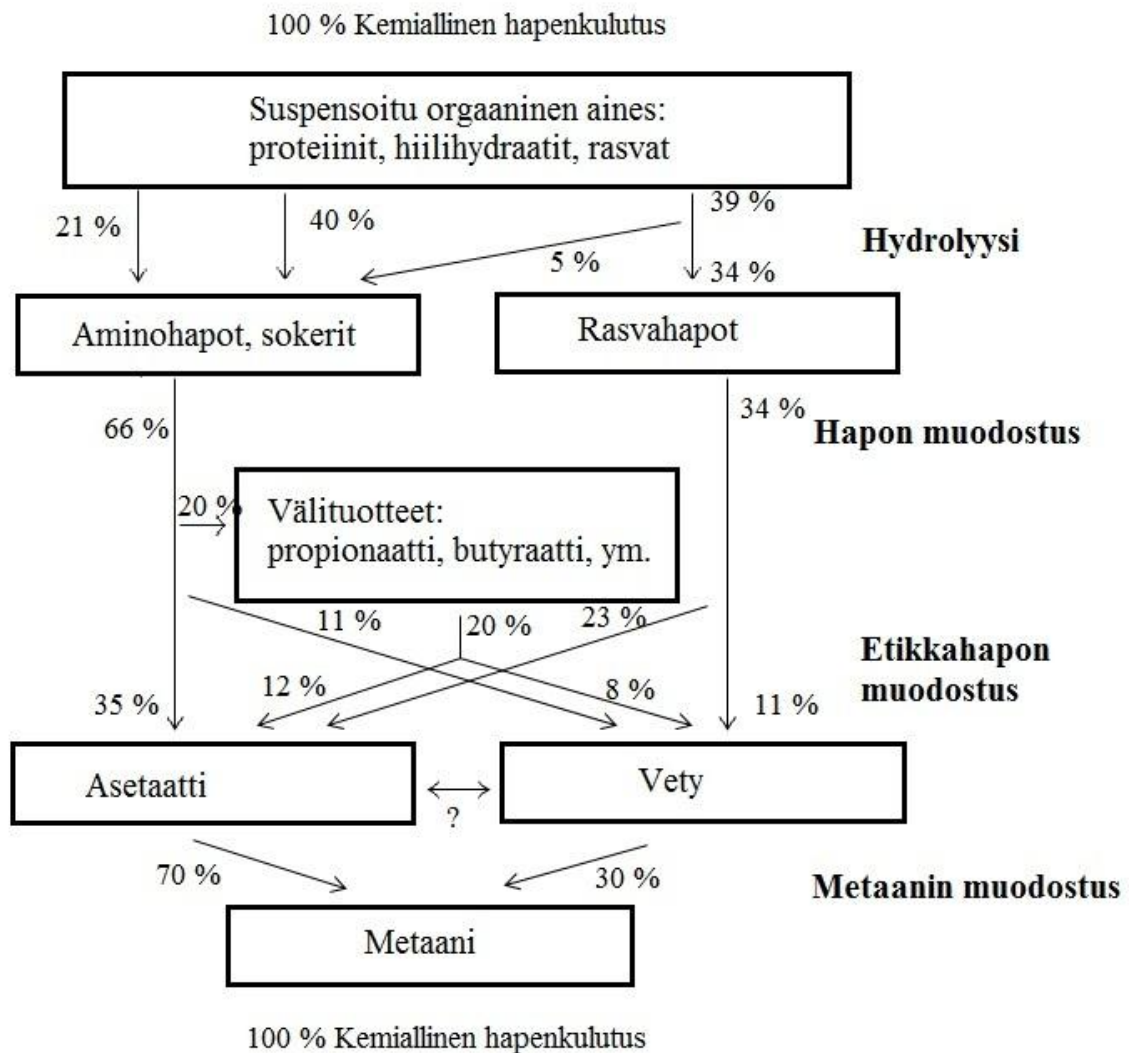
Bakteerien määrä ja metanogeenisten bakteerien suhde kaikkiin bakteereihin kuvaa biokaasureaktorin elinvoimaa ja mikrobiologisen ruokaketjun eheyttä. Hyvän anaerobisen mädätyksen saavuttamiseksi kokonaisbakteerien määrän millilitrassa tulisi olla suurempi kuin 800 miljoonaa, joista 10 % olisi metanogeenisiä bakteereja. (Scherer & Neumann 2011)

## 2.1 Mädätysprosessin vaiheet

Anaerobinen mädätys koostuu neljästä vaiheesta; hydrolyysi, hapon muodostus, etikkahapon muodostus ja metaanin muodostus. Anaerobisessa mädätyksessä orgaaninen aine hajoaa ja muuttuu mikrobien toiminnan seurauksena pääasiassa metaaniksi ja hiilidioksidiksi alla olevan reaktioyhtälön mukaan. (WH 1)



Anaerobisen mädätysprosessin vaiheet on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Anaerobisen mädätysprosessin vaiheet (WH 2).

Hydrolyysissä hajotetaan liukenematonta orgaanista materiaalia ja suuria molekyyliyhdisteitä, kuten lipidejä, hiilihydraatteja ja proteiineja rasvahapoiksi sokeiksi ja aminohapoiksi. (Appels ym. 2008) Yhdisteet hajoavat bakteerien eksoentsyymien vaikutuksesta ja polymeerien kovalenttiset sidokset katkeavat veden kanssa tapahtuvan reaktion seurauksena muodostaen monomeerejä. (Deublein & Steinhauser 2008, 94) Hiilihydraatit hydrolysoituvat muutamassa tunnissa ja proteiinit ja lipidit muutamassa päivässä. Lignoselluloosan ja lingiinin hajoaminen tapahtuu hitaasti ja epätäydellisesti. (Deublein & Steinhauser 2008, 94.) Hydrolyysiin ja haponmuodostukseen osallistuu suuri määrä mikrobeja; 128 laukoa 18 suvusta ja 58 lajistista. Yleisimmät suvut ovat *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* ja *Bacteroides*. (Deublein & Steinhauser 2008, 129)

Hapon muodostuksessa pilkotaan hydrolyysissä syntyneitä yhdisteitä. Hajotuksessa syntyy haihtuvia rasvahappoja, ammoniakkia, hiilidioksidia ja rikkivetyä sekä asetaattia, etikkahappoa ja alkoholia. (Appels ym. 2008; Deublein & Steinhauser 2008, 94) Fermentatiiviset mikro-organismit toimivat laajalla pH-alueella. Ne tuottavat alhaisessa pH:ssa lähinnä etikka- ja voihappoa, kun taas korkeammassa pH:ssa etikkahapon lisäksi propionihappoa. (Boe 2006) Melkein kaikki hapon muodostuksessa toimivat mikro-organismit osallistuvat myös hydrolyysiin, erityisesti suvut *Clostridium*, *Paenibacillus* ja *Ruminococcus*. (Deublein & Steinhauser 2008, 131)

Anaerobisen mädätysprosessin kolmannessa vaiheessa orgaaniset hapot ja alkoholit hajotetaan etikkahapoksi, hiilidioksidiksi ja vedyksi (Appels ym. 2008). Asetogeeniset suvut selviytyvät vain, jos ne elävät symbioosissa vetyä kuluttavan suvun kanssa. Yleisimmät bakteerit, jotka osallistuvat etikkahapon muodostukseen ovat *Desulfovibrio*, *Aminobacterium* ja *Acidaminococcus* suvun jäseniä. (Deublein & Steinhauser 2008, 134, 135)

Metanogeeniset bakteerit tuottavat metaania vedystä, asetaatista ja metyyli-ryhmän sisältävistä yhdisteistä. Metaanin muodostus tapahtuu anaerobisissa oloissa. Metanogeeniset bakteerit tarvitsevat toimiakseen korkean vedyn osapaineen ja toiminnallaan pienentävät vedyn määrää mahdollistaen asetogeenisten bakteerien toiminnan. Tällöin metaanin muodostuksen toimiessa, etikkaha-

pon muodostuskin toimii ongelmitta. Kun metanogeenisten bakteerien toiminta häiriintyy, prosessi ylihappamoituu. (Deublein & Steinhauser 2008, 97) Metanogeenit ovat erittäin herkkiä pH:n suhteen ja niiden optimi pH-alue on välillä 6,8 - 7,2. (Turovskiy & Mathai 2006, 179)

### 3 METANOGEENISET BAKTEERIT

Metanogeenit ovat anaerobisia prokaryootteja, jotka kuuluvat *Archaea* yläkuntaan. Taksonomisesti metanogeenit muodostuvat viidestä lahkosta: *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* ja *Methanopyrales*. (Boone & Castenholz 2001)

Metanogeenisten bakteerien halkaisija vaihtelee välillä 0,1 – 15 µm mutta filamentit voivat olla jopa 200 µm pitkiä. Bakteereja on monenmuotoisia ja ne voivat olla yksinään tai ryhmissä. Metaania tuottavilla bakteereilla on epätavallisen korkea rikkipitoisuus; 2,5 % niiden kuivapainosta. Metanogeenisten bakteerien soluseinästä puuttuu muramiinihappo ja useilta metanogeeneilta puuttuu soluseinää suojaava kuori. (Gerardi 2003, 17-18, 22)

Metanogeeniset bakteerit jakaantuvat hitaasti, joten vaaditaan vähintään 12 päivää suuren metanogeenisten bakteerien populaation saavuttamiseksi. Bakteerien hidas kasvu johtuu niiden saamasta suhteellisen pienestä energiamäärästä, mikä taas selittyy rajoitetulla substraattien määrällä. Vetyä kuluttavalla metaanintuotolla bakteerit saavat enemmän energiaa kuin asetaatin halkomisella. Asetaattia substraattina käyttävä metaanintuotto on kuitenkin yleisempää johtuen pienestä vedyn osapaineesta, mikä suosii asetaattia muodostavien bakteerien toimintaa. Vedyn alhaisesta osapaineesta on hyötyä, sillä muuten asetaatin ja metaanin tuotto asetaatista vähenee ja hajotusta hidastavien sivutuotteiden määrä kasvaa. (Gerardi 2003, 27)

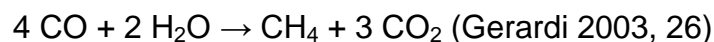
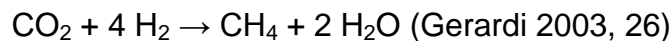
Metaania tuottavilla bakteereilla on ainutlaatuiset kofaktorit  $F_{420}$  ja  $F_{430}$  sekä ainutlaatuinen koentsyymi M. Kofaktorit  $F_{420}$  ja  $F_{430}$  toimivat vedyn kuljettajina ja koentsyymi M muuttaa hiilidioksidia metaaniksi. (Gerardi 2003, 18) Koentsyymi on orgaaninen molekyyli, joka kiinnittyy entsyymiin ja katalysoi reaktiota. Kofaktori taas on epäorgaaninen molekyyli, joka toimii samalla tavalla kuin koentsyymi. (Heino & Vuento 2007, 67)  $F_{420}$  on fluoresoiva molekyyli. Se absorboi hape-tettuna aallonpituudella 420 nm mutta menettää pelkistettynä kykynsä sekä absorboida että fluoresoida. (Zeikus 1977, 531) Kofaktori  $F_{430}$  absorboi aallonpi-

tuudella 430 nm ja sen synteisiin tarvitaan nikkeliä.  $F_{430}$  on metyylikoentsyymi M reduktaasin liitännäinen. (Thauer 1998)

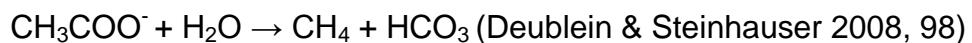
### 3.1 Metanogeenisten bakteerien substraattispesifisyys

Kaikki metanogeeniset bakteerit eivät hajota kaikkia substraatteja, vaan ne voidaan jakaa substraattien perusteella kolmeen eri ryhmään; vetyä käyttäviin, asetaattia käyttäviin ja metyyliä käyttäviin. (Deublein & Steinhauser 2008, 98)

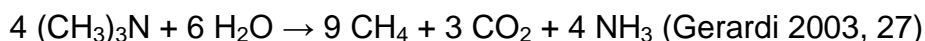
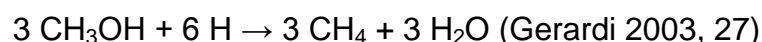
Hydrogenotrofiset metanogeenit käyttävät pääasiassa vetyä mutta myös hiilimonoksidia tuottaessaan metaania. Hydrogenotrofit metanogeenit auttavat ylläpitämään matalaa vedyn osapainetta muodostamalla metaania. (Gerardi 2003, 26) Alla olevissa reaktioyhtälöissä on esitetty hydrogenotrofien metaaninmuodostustavat.



Asetaattia substraattinaan käyttävät asetotrofiset metanogeenit halkaisevat ase-taatin metaaniksi ja vetykarbonaatiksi. Asetotrofiset metanogeenit lisääntyvät hitaammin kuin hydrogenotrofiset metanogeenit ja ovat herkkiä vedyn kertymiselle. (Gerardi 2003, 26) Asetotrofien metaaninmuodostus on esitetty alla olevassa reaktioyhtälössä.



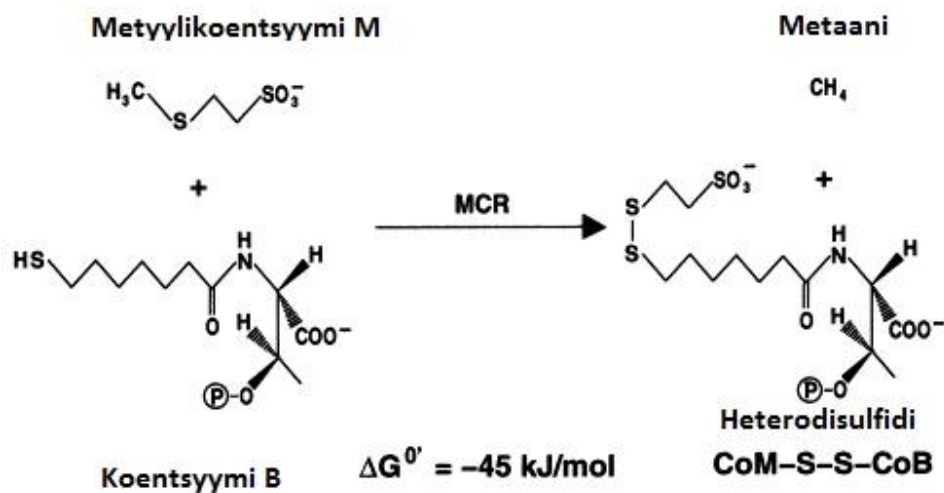
Metyyliä käyttävät metyilotrofiset metanogeenit käyttävät substraatteina yhdistei-tä, joissa on metyyliiryhmä, esimerkiksi metanolia ja metyyliamiinia, tuottaes-saan metaania. (Gerardi 2003, 27) Metylotrofien metaaninmuodostuksen reak-tiot on kuvattu alla.





### 3.2 Metyylikoentsyymi M reduktaasi

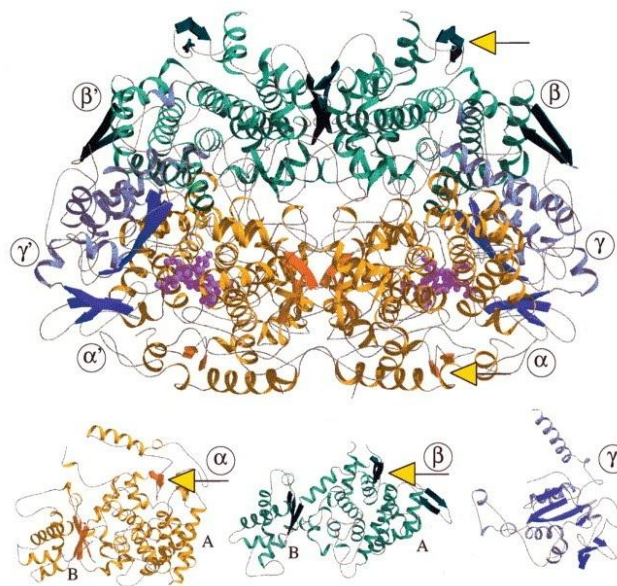
Metyylikoentsyymi M reduktaasi on metaaninmuodostuksen avainentsyymi (Traversi ym. 2012). Vaikka metaanin tuottoreitit alkavat eri lähtöaineista, ne päättyvät metyylikoentsyymi M reduktaasin katalysoimaan metaanin muodostusreaktioon. (Thauer 1998) Esimerkiksi hiilidioksidi sitoutuu ensin metanofuraaniin ja sitten asteittain pelkistyy metyyli ryhmäksi, joka lopulta liittyy koentsyymi M:ään muodostaen metyylikoentsyymi M:n (Grabarse ym. 2001). Metyylikoentsyymi M reduktaasi (MCR) käyttää substraatteina metaanin muodostuksessa koentsyymi B:tä sekä eri lähtöaineista muodostunutta metyylikoentsyymi M:ää. (Thauer 1998) MCR:n katalysoima metaaninmuodostusreaktio on esitetty alla olevassa kuvassa 3.



Kuva 3. Metyylikoentsyymi M reduktaasi (MCR) katalysoi reaktiota, jossa metyylikoentsyymi M ja koentsyymi B muutetaan metaaniksi ja heterodisulfidiksi (CoM-S-S-CoB) (Grabarse ym. 2001).

MCR:n molekyylimassa on noin 300 kDA ja se koostuu kolmesta eri alayksiköstä,  $\alpha$  (McrA),  $\beta$  (McrB) ja  $\gamma$  (McrG). (Shima ym. 2002; Grabarse ym. 2001) MCR:iin on sitoutuneena kaksi molekyyliä kofaktori  $F_{430}$ :tä. (Grabarse ym. 2001) Entsyymikompleksin oletetaan olevan uniikki ja läsnä kaikissa metanogeneisissä (Thauer, 1998).

MCR operoni esiintyy kahdessa muodossa, MCRI ja MCRII. MCRI muotoa oletetaan olevan kaikissa metanogeeneissä, kun taas MCRII muotoa on osoitettu olevan vain *Methanobacteriales* ja *Methanococcales* -lahkoissa. MCR:n  $\alpha$  alayksikköä (MCRI) koodaa *mcrA*-geeni, kun taas *mrtA*-geeni koodaa MCRII:ta. Geenisekvenssit ovat hyvin samanlaisia, joten alukkeiden suunnittelulla on suuri merkitys. (Luton ym. 2002) Alla olevassa kuvassa 4 on esitetty metyylikoentsyymi M reduktaasi. Keltaisella on merkitty entsyymikompleksissa  $\alpha$  alayksikkö, vihreällä  $\beta$  alayksikkö, sinisellä  $\gamma$  alayksikkö ja violetilla kofaktori  $F_{430}$ .



Kuva 4. Yllä on metyylikoentsyymi M reduktaasi ja sen alla  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  alayksiköt. Violetilla on merkitty kofaktori  $F_{430}$ . Keltaisilla nuolilla on osoitettu homologiset kohdat (Grabarse ym. 2001).

### 3.3 *mcrA*-geeni

MCR entsyymien läsnäolo määrittää solun metanogeeniseksi, joten entsyymien yhtä rakenneosaa,  $\alpha$  alayksikköä, koodaavaa *mcrA*-sekvenssiä voidaan käyttää metanogeenien määrittämiseen. Geenin *mcrA* perusteella määritetty metanogeenien fylogeneettinen puu muistuttaa läheisesti 16S rRNA -pohjaisesti määritettyä ja siksi *mcrA*-geeniä voidaan käyttää kohdegeeninä PCR-pohjaisessa määrittämisessä. (Luton ym. 2002) Geeniä ei ole tutkittu vielä kovin paljoa, eikä siitä ole koottu julkista tietokantaa.

## 4 BAKTEERIEN TUNNISTUKSESSA KÄYTETTYJÄ MENETELMIÄ

Bakteerien tunnistuksessa käytetään apuna niiden erikoispiirteitä kuten 16S rRNA -geenisekvenssiä, koentsyymejä ja kofaktoreita. Käytetyimpiä menetelmiä ovat ne, joissa ensin vahvistetaan haluttu geeni PCR:lla, pilkotaan sattumanvaraisesti ja muodostuneet fragmentit lajitellaan geelielektroforeesilla. Tällaisia menetelmiä ovat muun muassa PCR-DGGE/TTGE ja T-RFLP. (Zhou ym. 2011)

FISH-menetelmä on myös yleinen metanogeenisten bakteerien määrittämiseen käytetty menetelmä. Menetelmässä fluoresoivia molekyyliä kiinnitetään tutkittaviin geeneihin joko suoraan tai toisen molekyylin avulla ja fluoroforin lähettämä valo mitataan CCD-kameralla. (Moter & Göbel 2000)

Metanogeenejä karakterisoidaan myös kofaktori  $F_{420}$  avulla, joka havaitaan optisella mikroskoopilla sen autofluoresenssin avulla. (Deublein & Steinhäuser 2008, 135) Saksassa Hampurin ammattikorkeakoulussa bakteerit määritetään värjäämällä solut SYBR® Green-väriaineella ja asettamalla ne metyyliisellulosaalla päällystetyille mikroskooppilevyille. Solut lasketaan automaattisesti morfologian perusteella kofaktori  $F_{420}$ :n autofluoresenssin avulla. (HAW)

Yli 30 vuoden ajan käytetyin sekvensointimenetelmä oli Sangerin menetelmä. Seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmät ovat kuitenkin ohittaneet Sangerin menetelmän käytön, koska niiden sekvensointikapasiteetti on suurempi. (Zhou ym. 2011)

### 4.1 Sanger sekvensointi

Sangerin dideksimenetelmässä luodaan DNA polymeraasin avulla sekvensoitavalle sekvenssille vastinnauhaa. Reaktiossa on normaaleja deoksinukleotidejä ja dideksinukleotidejä, joista puuttuu happiatomi 3' aseman lisäksi 2' asemasta, jolloin DNA-synteesi ei voi jatkua dideksinukleotidistä eteenpäin.

Dideoksinukleotidit voidaan myös leimata, jolloin tulosten analysointi on helpompaa ja tekniikka automatisoitavampaa. (Suominen ym. 2010, 177-181)

Sekvensoitavalle DNA-juosteelle tehdään neljä PCR:ta käyttäen kaikkia neljää deoksinukleotidiä ja vain yhtä dideoksinukleotidiä reaktiota kohden. Jokainen reaktio tuottaa vain fragmentteja, jotka loppuvat reaktiossa olevaan dideoksinukleotidiin. Dideoksinukleotidejä on reaktiossa rajallinen määrä, joten sen liittyminen syntyvään juosteeseen on sattumanvaraista, mikä johtaa siihen, että fragmenteista tulee erikokoisia. PCR-amplikonit erotellaan kokonsa mukaan ja riippuen reaktiosta, kaikki fragmentit loppuvat tiettyyn emäkseen, joten sekvenssi pystytään lukemaan. (Suominen ym. 2010, 177-181)

#### 4.2 Seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmät

Seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmät perustuvat sekvensoitavan DNA:n vastinnauhan luomiseen PCR:n avulla. PCR-pohjaisissa menetelmissä käytetään kohdegeenin mukaan suunniteltuja alukkeita. Suosituimmat geenit metanogeenien määrittämisessä ovat 16S rRNA ja mcrA, muita geenejä ovat fwd-geeni, joka katalysoi hiilidioksidin muuntamista formyyylimetafuraaniksi ja ftr-geeni, joka katalysoi formyyylimetafuraanin muuntamista metyylietrahydrometanopteriiniksi. Geenillä mcrA ei ole vielä kovin kattavaa tietokantaa, mikä tuo haasteita geenin käytölle. (Zhou ym. 2011) 16S rRNA on 1550 emäsparia pitkä, se esiintyy kaikissa soluissa ja koodaa ribosomin yhtä alayksikköä. Ribosomi on tärkeässä roolissa solunsisäisiä proteiineja tuottaessa. (16S rRNA\_1) Geenissä on yhdeksän variaabelia aluetta, joiden avulla pystytään määrittämään, mihin lajiin eliö kuuluu. Geenin avulla pyritään yleensä selvittämään lajia, eikä niinkään erottamaan saman lajin yksilöitä toisistaan. (Clarridge 2004)

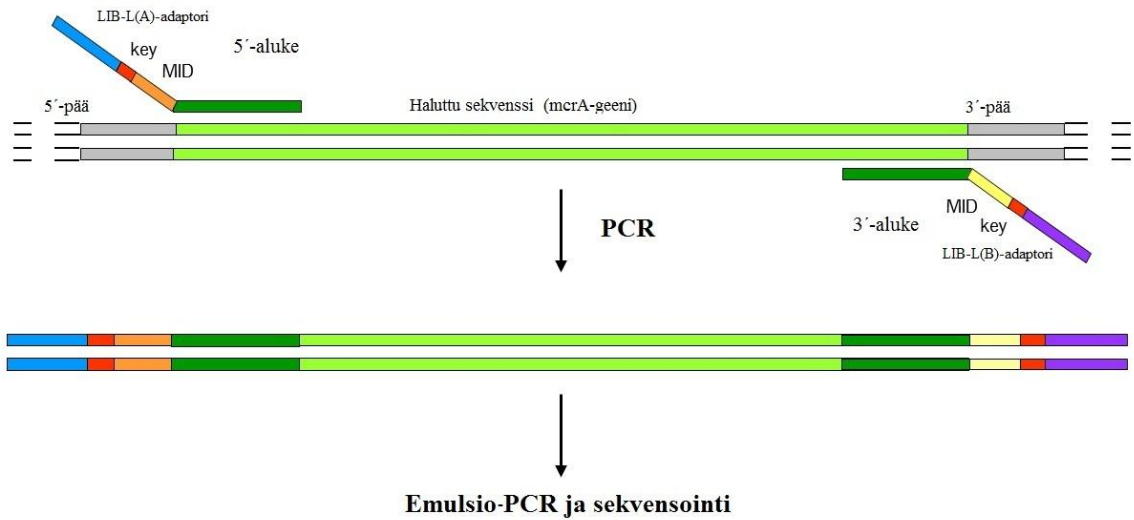
Esimerkiksi Illuminan the genome analyzer -laitteessa sekvensoitava DNA pilkotaan mekaanisesti. Sattumanvaraisesti muodostuneisiin fragmentteihin liitetään molempiin päihin adapterit, joista ne kiinnittyvät kennon pohjalla oleviin vastinadaptereihin. Yksijuosteisesta sekvensoitavasta DNA-nauhasta muodostuu kaksijuosteista vastinadapterin toimiessa alukkeena. Samaan kohtaan

muodostuu useampi kloni samasta amplikonista, joka aiheuttaa signaalin vahvistumisen. Sekvensoinnissa käytetään emäksiä, joissa jokaisessa emäksessä on sille ominainen fluoresoiva väriaine. DNA-polymeraasi liittää emäksen sekvensoitavaan juosteeseen ja laserilla virittämällä saadaan kuvattua, mikä emäs on kyseessä. Fluoresoiva väriaine poistetaan ja seuraavan emäksen on taas mahdollista liittyä juosteen 3'-päähän. Muita seuraavan sukupolven sekvensointilaitteita ovat muun muassa SOLiD ja PyroMark ID. (Mutz ym. 2013)

#### 4.2.1 454-pyrosekvensointi

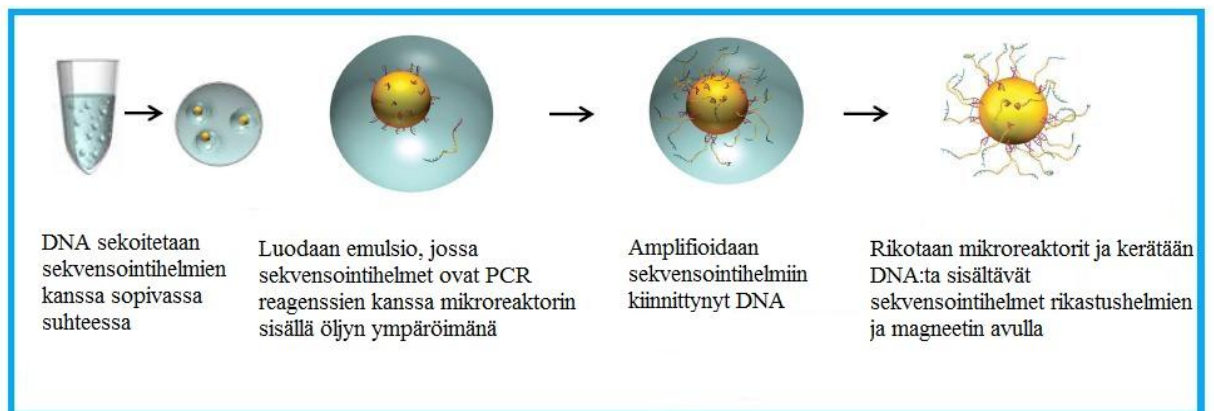
Turun ammattikorkeakoulussa on käytössä seuraavan sukupolven DNA-sekvensointiin soveltuva Roche GS Junior -laite. Laitteen DNA sekvensointi perustuu pyrosekvensointimenetelmään. Menetelmällä pystytään sekvensoimaan 400 emäksen pituisia fragmentteja 99 % tarkkuudella. Sekvensointi ja raakadatan prosessointi kestää 10 tuntia. Laitteella on mahdollista sekvensoida sekä amplikoneja että sekvensoitavasta organismista otettuja satunnaisia fragmentteja, niin sanotulla shotgun-menetelmällä. (Roche)

Tässä opinnäytetyössä sekvensoitava tuote luodaan PCR-menetelmällä lisäämällä itse sekvensointiin tarvittavat sekvenssit PCR:ssa tarvittaviin alukkeisiin. Sekvensoinnissa tarvittaviin sekvensseihin kuuluvat lyhyt sekvensointialuke, Key sekä näytekohtainen viivakoodi eli MID. Sekvensointialuketta hyväksi käyttäen amplikoni kiinnittyy sekvensointihelmiin. Key on neljästä emäksestä koostuva sekvenssi, jonka avulla laite tunnistaa, missä sekvensointihelmessä on kiinnittyneenä PCR-tuotetta. MID on näytekohtainen viivakoodi, jonka avulla pystytään erottamaan, mistä näytteestä mikäkin sekvensointituloksella on. 5' ja 3'-alukkeet kuuluvat monistettavaan ja määritettävään kohdesekvenssiin. Alukkeiden koostumus ja niiden kiinnittyminen haluttuun sekvenssiin on esitetty kuvassa 5. (Roche)



Kuva 5. Alukkeiden kiinnittyminen haluttuun sekvenssiin (Roche).

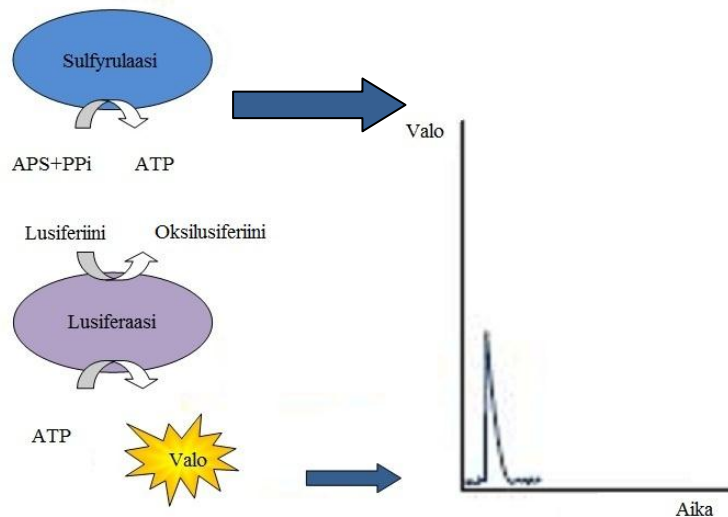
PCR-amplikonit amplifioidaan emulsiossa sekvensointihelmien pinnalle. Emulsio-PCR:n periaate on esitetty alla olevassa kuvassa 6. Emulsio-PCR:ssa amplikonit sekoitetaan PCR-reagenssien ja sekvensointihelmien kanssa siten, että emulsio-PCR:ssa saadaan laskennallisesti jokaiseen vesiöljy-mikroreaktoriin yksi amplikonimolekyyli yhtä sekvensointihelmeä kohden. Sekvensointihelmi sisältää amplifioinnin jälkeen useamman kopion yhdestä ja samasta amplikonista. Mikroreaktorit rikotaan ja amplikonia sisältävät sekvensointihelmet erotellaan muista helmistä magneettisten rikastushelmien ja magneetin avulla. (Roche)



Kuva 6. Emulsio-PCR (Roche).

Sekvensointihelmet ladataan Rochen valmistamalle GS Juniorin pikotiitterilevyllä, joka on valmistettu siten, että yhteen kuoppaan mahtuu vain yksi helmi. Levyllä laitetaan myös DNA-polymeraasia, ATP-sulfurylaasia, lusiferaasia, apyraasia, 5' fosfosulfaattia (APS) ja lusiferiiniä. (Roche)

Sekvensoinnissa sekvensoitavalle amplikonille luodaan vastinnauhaa syöttämällä polymeraasientsyymille kutakin emästä vuorotellen. Mikäli polymeraasientsyymi liittyy vastinemäksen, vapautuu pyrofosfaattia (PPi). ATP-sulfurylaasi muuttaa PPi:n ATP:ksi APS:n läsnäollessa. ATP toimii energianlähteenä lusiferaasientsyymille, joka saa aikaan valoa tuottavan reaktion, jossa lusiferiini muuttuu oksilusiferiiniksi. Syntyvä valo kuvataan GS Juniorin sisällä olevalla CCD-kameralla. Valon määrä on suoraan verrannollinen liitettyjen vastinemästen lukumäärään. Valon määrän perusteella luodaan pyrogrammi, jonka piikin korkeudet riippuvat liitettyjen nukleotidien määrästä. Alla olevassa kuvassa 7 on esitetty nukleotidin aikaansaama reaktio. Laitteen ja menetelmän ongelmana on erottaa homopolymeerisekvenssit, koska valon määrän lisääntyminen ei ole lineaarinen suhteessa liitettyjen nukleotidien määrään, mikäli liitettyjen nukleotidien määrä on suurempi kuin kahdeksan. Vapaat nukleotidit hajotetaan apyraasilla ja reaktio aloitetaan uudestaan seuraavalla emäksellä. (Roche)



Kuva 7. Nukleotidin liittymisen aikaansaama reaktio (Pyrosequencing).

## 5 MENETELMÄN KEHITYS

GS Juniorilla oli sekvensoitu ennen opinnäytetyötä erilaisia näytteitä, esimerkiksi bakteerien koko genomia. Biokaasulaitoksen mädätettä ei ollut ennen käytetty sekvensointiin, joten ensin piti luoda keino DNA:n eristämiseen mädätteestä. Parhaan DNA-eristyskitin löydyttyä alettiin eristystä DNA:sta vahvistaa haluttua metanogeenisten bakteerien biomarkkeri- eli *mcrA*-geeniä ja saattamaan geenifragmentteja sekvensoinnin vaatimaan muotoon. Menetelmän kehityksessä pyrittiin mahdollisimman puhtaaseen lopputuotteeseen, jotta saataisiin mahdollisimman luotettavat tulokset.

### 5.1 DNA-eristyskitin valinta

DNA:n eristäminen aloitettiin tarkastelemalla eri valmistajien tarjoamia DNA:n eristykseen sopivia kittejä. Kittejä löytyi kuusi viideltä eri valmistajalta. Testattiin kolmea eri eristykseen tarkoitettua ja yhtä konsentroidintuotetta tarkoitettua kittiä. Parhaimman kitin löydyttyä testattiin vielä, miten eristyksestä saataisiin parempi käyttäen kyseisen kitin valmistajan parannusehdotuksia. Opinnäytetyössä DNA:n eristämiseen mädätteestä valittiin MO BIO:n PowerSoil DNA isolation kitti, koska sitä käyttämällä näytteen spektri näytti DNA:lle ominaiselta, DNA:n pitoisuus oli korkein ja puhtaus oli yli 1,8. Kittitestien tulokset ja MO BIO:n kitillä eristettyjen näytteiden spektrit ovat esitettyinä liitteessä 1.

Näytteiden eristäminen tapahtui parhaiten siten, että näytteitä sentrifugoitiin 8500 x g 20 minuuttia. Supernatantti kaadettiin pois ja sakasta otettiin 250 mg näyte, josta DNA eristettiin käyttämällä PowerSoil DNA isolation kit:iä ohjeiden mukaisesti. Eristetyn DNA:n pitoisuus ja puhtaus mitattiin ensin NanoDrop-spektrofotometrillä ja tarkempi pitoisuus mitattiin PicoGreen-menetelmällä. PicoGreen-menetelmä perustuu fluoresoivaan väriaineeseen, jonka pitoisuus mitataan Hidexillä.

## 5.2 Alukkeiden valinta

Kirjallisuuslähteiden perusteella valittiin kolme sopivinta aluketta. Alukkeet on esitetty taulukossa 1. Alle 150 emäsparin kokoero mahdollistaisi sen, että molemmilla alukkeilla saadut amplikonit voitaisiin laittaa yhtä aikaa emulsio-PCR:oon. Kaikilla alukkeilla suoritettiin PCR lämpötilagradienttina ja reagensiseoksena kokeiltiin kahta erilaista seosta, joista vain toinen tuotti PCR-amplikoneja. Valittiin käytettäväksi alukepari ML, koska se oli ainoa, joka tuotti PCR:ssa amplikoneja.

Taulukko 1. Primereiden nimet, sekvenssit ja amplikonien pituudet (Juottonen ym. 2006).

Primeri	Sekvenssi (5'-3')	Pituus (bp)	Amplikonin pituus (bp)
MCRf	TAYGAYCARATHHTGGYT	17	~490
MCRr	ACRTTCATNGCRTARTT	17	
ME1	GCMATGTCARATHGGWATGTC	20	~760
ME2	TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT	21	
MLf	GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWACAGC	32	~470
MLr	TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT	23	

## 5.3 PCR-olosuhteiden optimointi

PCR-olosuhteita optimoitiin muuttamalla ML-alukkeiden konsentraatiota, entsyymien pitoisuutta, DNA:n määrää, sekä annealing-lämpötilaa (=alukkeiden liittymislämpötila). Entsyymien tehokkuutta pyrittiin edistämään lisäämällä magnesiumkloridia mutta sillä saatiin tuotettua enemmän epäspesifisiä tuotteita. Amplikonien pituus, laatu ja pitoisuus määritettiin Bioanalyzer:illa. Pitoisuus määritettiin vaihtoehtoisesti myös Qubit-fluorometrillä. Tuotettujen amplikonien koko oli noin 580 emäsparia ja annealing lämpötilaksi valittiin ML-alukeella 54 °C.

Muuttamalla alukkeiden, DNA:n ja entsyymien määrää ei onnistuttu poistamaan primer-dimereita, joten päädyttiin käyttämään agaroosigeeliä, jossa fragmentit erottuisivat kokonsa mukaan ja vain haluttu kokoluokka saataisiin leikattua talteen. Optimoinnin jälkeen käytetyt PCR-olosuhteet on esitetty alla olevassa taulukossa 2.

Taulukko 2. Käytetyt PCR-olosuhteet.

Reagenssi	Pitoisuus reaktiossa	Ohjelma
H <sub>2</sub> O		94 °C 3 min
10 x Buffer	1 x	94 °C 30 s
dNTP (10 mM)	0,2	54 °C 45 s   35 sykliä
Primer MLf (10 µM)	0,1	72 °C 1 min
Primer MLr (10 µM)	0,1	72 °C 8 min
Entsyymi 5U	1,25 U	6 °C hold
DNA (10 ng/µl)	10 ng	

## 6 METANOGEENISTEN BAKTEERIEN MÄÄRITYS

Biokaasureaktorista otettiin kolme näytettä ns. perusjakson ajalta, jolloin reaktoria syötettiin pelkästään jätevedenpuhdistamolietteellä. Tarkoituksena oli määrittää biokaasureaktorin bakteeripopulaation lähtötaso. Määrittämällä lähtötaso pystytään jatkossa havainnoimaan biokaasureaktorin prosessimuutosten aiheuttama muutos bakteeripopulaatiossa. Näytteet otettiin määrättyinä aikapisteinä, eristettiin, vahvistettiin PCR:lla kolmeen kertaan ja sekvensoitiin Rochen GS Juniorilla. Koejakso oli 25.2.13 – 2.4.13 ja aikapisteiksi valittiin päivät 2502, 1803 ja 0204.

### 6.1 Näyte

Turun AMK:n Susbio-projektin pilot-mittakaavan biokaasureaktori toimi opinnäytetyön tutkimuskohteena. Reaktorin kokonaistilavuus on 4 m<sup>3</sup>, josta aktiivinen tilavuus on 3,5 m<sup>3</sup>. Mesofiilistä prosessia ohjataan ohjausjärjestelmän avulla, jolla määritetään reaktorin lämpötila, sekoittimen nopeus, syöttösekvenssin tiheys, syötön määrä ja reaktorin aktiivinen tilavuus. Reaktorin sekoituksesta johdun uskotaan, että otettu näyte on edustava otos koko reaktorissa vaikuttavista bakteereista. Näytteen kuiva-ainepitoisuus on ollut koejakson aikana keskimäärin 7,3 % ja pH on ollut noin 7,7.

## 6.2 DNA:n eristys

DNA eristettiin samana päivänä, kuin näytteet oli otettu. Näytteet sentrifugoitiin kuivajakeen erottamiseksi nestejakeesta. Kuivamassasta otettiin kolme näytettä DNA eristykseen, joka tapahtui kitin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Eristys perustui näytteen mekaaniseen hajottamiseen, sentrifugoimalla tapahtuvaan epäpuhtauksien poistoon sekä adsorptiokolonnilla DNA:n talteenottoon ja puhdistukseen. Eristetyt DNA-näytteet siirrettiin pakastimeen odottamaan, että kaikkien aikapisteiden näytteet saatiin eristettyä ja niiden jatkokäsittely suoritettiin yhtäaikaaisesti. Liitteessä 2 on esitetty DNA näytteiden puhtaus ja pitoisuus aikapisteittäin.

## 6.3 Eristetyn DNA:n monistaminen ja puhdistaminen

PCR suoritettiin menetelmän optimoinnissa saavutettujen reaktio-olosuhteiden mukaisesti. Alukkeina käytettiin pelkkiä geenispesifisiä alukkeita. PCR:n jälkeen näytteet pipetoitiin itse valmistetulle 1,8 % agarosigeelille ja ajettiin 80 voltin jännitteellä kunnes näytepuskuri oli ajautunut geelin reunaan. Agarosigeelit kuvattiin ja amplikonit leikattiin talteen. DNA eristettiin agarosigeeliltä käyttäen kaupallista kolonniadsorptioon perustuvaa kittiä. Amplikonit ajettiin Bioanalyzer:lla, ajatuksena tarkistaa, saatiinko tuote geeliltä ja poistuivatko primer-dimerit ja muut epäpuhtaudet. Ajettu Bioanalyzer-geelikuva on liitteessä 3.

## 6.4 Monistetun DNA:n valmistelu sekvensointiin

Toinen PCR suoritettiin samoilla reaktio-olosuhteilla kuin ensimmäinen, mutta alukkeina käytettiin sekvensointialuke + adapteri + Key + MID –koostuvaa fuusioaluketta. PCR:n jälkeen kaikkien aikapisteiden näytteet rinnakkaisineen yhdistettiin ja ajettiin 1,8 % agarosigeelille. Bändi leikattiin geeliltä ja DNA eristettiin geeliltä käyttäen samaa kittiä kuin ensimmäisen PCR:n jälkeen. Tuote ajettiin Bioanalyzer:lla ja kohdeamplikonin pituus oli 598 emäsparia ja pitoisuus on

1,11 ng/ $\mu$ l. Bioanalyzer-kuva on esitetty liitteessä 3. Näytteen tarkempi DNA-pitoisuus määritettiin Qubit-fluorometrillä.

Emulsio-PCR ja sekvensointi suoritettiin Turun AMK:n molekyyli diagnostiikan laboratorion emPCR (LIB-L)-protokollan mukaan. Qubitilla ja Bioanalyzerillä saatujen tulosten perusteella laskettiin molekyylimäärä seuraavan kaavan mukaan;

$$\text{molekyylit} / \mu\text{l} = \frac{c \times N_A}{M \times \text{amplikoni}}$$

jossa c on näytteen pitoisuus ng/ $\mu$ l,  $N_A$  Avogadron vakio  $6,022 \times 10^{23}$  1/mol, M molekyylimassa (DNA nukleotideilla noin  $656,6 \times 10^9$  ng/mol) ja amplikoni on amplikonin pituus emäspareina, joka on 598 bp.

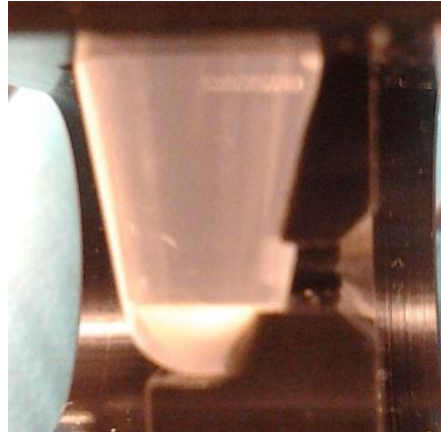
Näyte laimennettiin pitoisuuteen  $2 \times 10^6$  molekyyliä/ $\mu$ l. Valmisteltiin emulsio-PCR:oon tarvittavat reagenssit ja luotiin emulsio valmistajan ohjeiden mukaisesti. Näytettä pipetoitiin siten, että laskennallisesti tulisi yksi amplikoni yhtä sekvensointihelmeä kohti. Emulsio jaettiin 96-kuoppalevyille ja PCR suoritettiin taulukon 3 ohjelmalla.

Taulukko 3. Emulsio-PCR:n ohjelma.

emPCR	
94 °C 4 min	
94 °C 30 s	
58 °C 4,5 min	50 sykliä
68 °C 30 s	
10 °C hold	

PCR:n jälkeen emulsio kerättiin kuoppalevyiltä, emulsio hajotettiin ja sekvensointihelmet kerättiin talteen. Sekvensointihelmiltä poistettiin vastinjuoste, joka ei ollut kovalenttisesti sitoutunut. Magneettiset rikastushelmet kiinnitettiin sekvensoitavan DNA-juosteen sekvensointialukkeeseen ja magneetin avulla saatiin kerättyä sekvensoitavat DNA:ta sisältävät sekvensointihelmet talteen. Rikastushelmet poistettiin sekvensointialukkeiden päistä, lisättiin sekvensointiin vaadit-

tavat alukkeet valmiiksi helmiin. Helmien määrä laskettiin helmilaskurin avulla. Alla olevassa kuvassa 8 on esitetty helmilaskuri ja sekvensointiin käytetty määrä sekvensointihelmiä. Helmiä on laskurin alempaan reunaan, joten niiden määrä on noin 500 000.



Kuva 8. Sekvensointihelmet emulsio-PCR:n jälkeen.

## 6.5 Sekvensointi

Itse valmistetut reagenssit, sekvensointihelmet ja kontrollihelmet ladattiin pikotiitterilevyille valmistajan ohjeiden mukaisesti. Levyn lataamisen jälkeen sekvensointi käynnistettiin. Raakadata analysoitiin "full processing for shotgun and paired end" algoritmin mukaisesti. Taulukossa 4 on kerrottuna sekvensoinnista saadut arvot ja Roehen antamat rajat.

Taulukko 4. Sekvensoinnissa saadut arvot ja Roehen antamat raja-arvot.

	Saadut arvot	Roche
Raw wells	249 483	200 000-230 000
Key pass wells	233 875	90 % of raw wells
Total bases	58 500 466	>35 000 000
Dot + mixed %	9,00	<20 %
Short %	20,38	<30 %
Passed filter %	69,33	>50%
Control with 400 base pairs $\geq$ 95 %	76,63	over 60 % OK over 80 % great

Sekvensoinnin tulokset täyttävät Rochen aja-arvot, joten sekvensointi oli onnistunut. Raw wells –arvo on hieman yli analysoinnille annetun optimaalisen alueen mutta ei kuitenkaan niin paljoa, että se vaikuttaisi sekvenssien laatuun. Jos raw wells –arvo olisi liian suuri, se vaikuttaisi dot + mixed % ja short % -arvoihin, jotka kuvastavat sekvenssien laatua ja luotettavuutta.

## 6.6 Sekvensointitulosten analysointi

Tulokset analysoitiin Mothur-ohjelman versiolla 1.29.2. Käytän Patric D. Schlossin 454 SOP:ia. 454 SOP:n mukaan poistettuun aluke- ja MID-sekvenssit, yli 8 mittaiset homopolymeerit ja alle 200 emäsparin mittaiset sekvenssit. Seuraavaksi analysoitiin vain uniikit eli ainutlaatuiset sekvenssit. Saatuja uniikkeja sekvenssejä verrattiin 16S rRNA-tietokantaan ja todettiin, etteivät tutkitut näytteet olleet kontaminoituneet 16S rRNA-geenillä, koska sekvensseistä ei saatu vastaavuuksia kyseisellä tietokannalla. Sekvenssien jatkoanalysointi vaatisi erityisen mcrA-tietokannan, jonka puuttuessa opinnäytetyössä ei pystytty nimeämään bakteereja. Satunnaisrinnastus NCBI:n tietokantaan vertaaminen antaa tulokseksi aiemmin julkaistun mcrA-geenin erinäisillä metanogeeneillä, joten satunnaistestin mukaan onnistuttiin amplifioimaan oikeaa geeniä.

## 7 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Alla olevassa taulukossa 5 on esitetty kaikkien ja uniikkien sekvenssien määrä aikapisteittäin. Rinnakkaisten tulokset ovat esitettyinä vierekkäin. Taulukosta havaitaan, että kaikkien sekvenssien lukumäärä on kasvanut mutta uniikkien sekvenssien määrä on vähentynyt. Uniikkien sekvenssien määrän väheneminen helmikuusta huhtikuuhun saattaa johtua siitä, että ennen koejakson aloittamista pilot-reaktorissa oli testauksessa prosessia parantavaa lisäainetta. Lisäaine on saattanut jäädä vaikuttamaan bakteeripopulaation vielä pidemmäksi aikaa, mikä näkyisi bakteeripopulaation kasvaneena monimuotoisuutena. Lisäaineen poistuttua bakteeripopulaatio palautuisi ennalleen yksipuolisemman ravintoaineen seurauksena.

Taulukko 5. Kaikkien ja uniikkien sekvenssien määrä aikapisteittäin.

	2502		1803		0204	
<b>Sekvenssit</b>	11776	9939	12597	13192	14646	14292
<b>Uniikit sekvenssit</b>	2897	4172	1579	1651	1877	2006
<b>Yhteensä sekvenssejä</b>	21715		25789		28938	
<b>Yhteensä uniikkeja</b>	7069		3230		3883	

Yllä olevasta taulukosta 5 nähdään, että kahden rinnakkaisnäytteen välillä on eroavuutta, koska työvaiheita ja siten virhelähteitä on useita; esimerkiksi DNA:n eristys, sekvenssien leikkaaminen agarosigeeliltä ja PCR. DNA:n eristyksessä käytettävän näytemäärän pienuudesta johtuen näytteen homogeenisuus on kriittinen. Sekvenssien leikkaaminen agarosigeeliltä aiheuttaa myös merkittävän virhelähteen ja tässä opinnäytetyössä se tehtiin samoille näytteille kolmesti. PCR tuo myös yhden virhelähteen lisää, koska lyhyemmät sekvenssit monistuvat nopeammin ja siten myös paremmin kuin pidemmät sekvenssit.

Koska mcrA-tietokantaa ei ollut saatavilla, metanogeenijä ei pystytty nimeämään. Seuraavana vaiheena opinnäytetyön jälkeen on tietokannan kokoaminen tai hankkiminen, mikä rajattiin suuritöisyyden vuoksi opinnäytetyön ulkopuolelle.

Biokaasureaktorin perustason metanogeeniset bakteerit ovat kuitenkin sekvensoituina, joten tietokannan avulla seuraavia aikapisteitä saadaan verrattua opinnäytetyössä kerättyihin tietoihin ja muutokset bakteeripopulaatiossa havaittua. Lisätutkimuksella saataisiin tietoa bakteeripopulaation muutoksista ja esimerkiksi syötteen vaikutuksesta bakteereihin, mistä olisi hyötyä ongelmatapauksissa, kuten reaktorin kaasuntuoton romahtaessa.

*mcrA*-tietokannan avulla saadaan selville, onko alukkeilla onnistuttu saamaan oikeaa geeniä. Jos saataisiin sekvenssejä vain lahkoista *Methanobacteriales* ja *Methanococcales*, tiedettäisiin, että alukkeilla on saatu *mrtA*-geeniä *mcrA*-geenin sijaan. Menetelmän toimivuuden kannalta olisi myös oleellista saada tietää, onko kaikista metanogeenien luokista saatu mikrobeja. Siten saataisiin tietää, ovatko käytetyt alukkeet tarpeeksi universaaleja ottamaan kaikkien mikrobien *mcrA*-geenit vai ovatko ne liian spesifisiä ja jättävät joitakin bakteereja pois.

Opinnäytetyössä ML-alukkeilla luodut amplikonit ovat pidempiä kuin kirjallisuuslähteiden mukaan pitäisi olla. Syytä tähän ei ole tiedossa mutta asian selittäisi alukkeiden heikko toimivuus tai amplikonin pituuden vaihtelu lähdemateriaalista riippuen.

DNA:n eristys oli onnistunut, koska absorbanssien mittaustulokset osoittavat eristetyn DNA:n olevan puhdasta. Eristyksen onnistumisesta kertoo myös se, että samoista DNA-eristysaikapistenäytteistä kartoitettiin mikrobien 16S rRNA-geenin avulla. Ennen sekvensointia tehdyt toimenpiteet näyttäisivät onnistuneilta geelikuvien perusteella. Sekvensointiajo oli onnistunut, sillä saadut arvot täyttivät Rochen raja-arvot.

## 7.1 Hampurin ammattikorkeakoulun tulokset

Hampurin ammattikorkeakoulussa on määritetty metanogeeniset bakteerit niiden morfologian mukaan ja tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Hampurin AMK:ssa määritetyt metanogeeniset bakteerit niiden morfologian perusteella aikapisteittäin.

<b>Hampurin ammattikorkeakoulussa saadut tulokset aikapisteittäin</b>			
	<b>2502</b>	<b>1803</b>	<b>0204</b>
<b>Solujen kokonaismäärä (solua/ml)</b>	1,48E+10	1,98E+10	1,66E+10
<b>Metanogeenisiä bakteereja (solua/ml)</b>	5,63E+08	7,18E+08	7,37E+08
<b>Metanogeenisiä bakteereja (%)</b>	3,81	3,63	4,45
<b>Metanogeeniset bakteerit morfologisesti luokiteltuna aikapisteittäin (% metanogeenisistä bakteereista):</b>			
<b><i>Methanomicrobia</i></b>	58,8	62,8	73,7
<b><i>Methanobacteria</i></b>	17,9	13,0	12,3
<b><i>Methanospirillum</i></b>	0,1	0,0	0,0
<b><i>Methanosarcina</i></b>	10,4	9,7	10,0
<b><i>Methanosaeta</i></b>	12,7	14,6	4,0

*Methanospirillum*-suvusta tunnetaan yksi laji ja lajin edustajat käyttävät vetyä substraattinaan. Laji kuuluu yleisimpiin metanogeenisiin bakteereihin mutta ei tuloksista päätellen kuulu pilot-reaktorin bakteereihin. *Methanosarcina*-suku kuuluu yleisimpiin metanogeenisiin ja useat suvun jäsenet hallitsevat metaanin tuoton kaikista kolmesta substraatista. Suvun osuus on pysynyt koko koejakson ajan tasaisena, joten ravinteet, joita suvun edustajat käyttävät eivät ole muuttuneet. *Methanosaeta*-sukuun kuuluvat ainoat tunnetut pelkästään asetaattia substraattinaan käyttävät metanogeenit. Suvun edustajien vähentymisestä voisi päätellä sen, että biokaasureaktorin syötteen muuttuessa yksipuolisemmaksi, näiden bakteerien käyttämän substraatin osuus on vähentynyt.

## LÄHTEET

16S rRNA\_1: [http://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/genomics/ribosome.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/ribosome.html)  
Viitattu 29.4.13

Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., Dewil, R. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste- activated sludge. *Progress in energy and combustion science*, 34. 755-781.

Boe, K. 2006. Online monitoring and control of the biogas process. Tohtoriväitöskirja, Institute of environment & resources, Technical university of Denmark

Boone, D.R., Castenholz, R.W. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. painos. New York: Springer-Verlag, 721

Clarridge III, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews* 17; 4. 840-862

Deublein, D., Steinhauser, A. 2008. *Biogas from waste and renewable resources. An introduction*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.

Galagan, J.E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M.G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S. ym. 2002. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res* 12. 532-542

Garcia, J.L., Patel, B.K.C., Ollivier, B. 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe* 6. 205-226

Gerardi, M.H. 2003. *The microbiology of anaerobic digesters*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Grabarse, W., Mahlert, F., Duin, E.C., Goubeaud, M., Shima, S., Thauer, R.K., Lamzin, V., Ermler, U. 2001. On the mechanism of biological methane formation: structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding. *Journal of molecular biology*, 309, 315-330.

HAW: Saksan Hampurin ammattikorkeakoulu

Heino, J., Vuento, M. 2007. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. WSOY Oppimateriaalit Oy. 1. painos

BG: [http://www.motiva.fi/toimialueet/uusiutuva\\_energia/bioenergia/biokaasu](http://www.motiva.fi/toimialueet/uusiutuva_energia/bioenergia/biokaasu). Viitattu 23.1.13

Juottonen, H., Galand, P.E., Yrjälä, K. 2006. Detection of methanogenic *Archaea* in peat: comparison of PCR primers targeting the mcrA gene. *Research in microbiology*, 157. 914-921

Latvala, M. 2009. *Biokaasun tuotanto suomalaisessa toimintaympäristössä*. Suomen ympäristökeskus. Helsinki; Edita Prima Oy

Leigh, J.A., Whitman, W.B. 2013. *Brenner's encyclopedia of genetics*. 2. painos. 188-191

Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W. 2002. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148. 3521-3530.

Moter, A., Göbel, U.B. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods* 41. 85-112

Mutz, K.O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J.G., Stahl, F. 2013. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current opinion in biotechnology* 24. 22-30

Pyrosequencing: <http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454> Viitattu 29.4.13

Ritari, J., Koskinen, K., Hultman, J., Kurola, J.M., Kymäläinen, M., Romantschuk, M., Paulin, L., Auvinen, P. 2012. Molecular analysis of meso- and thermophilic microbiota associated with anaerobic biowaste degradation. *BMC Microbiology*, 12:121

Roche; koulutustilaisuudet, työohjeet ja yrityksen internetsivut

Scherer, P. Neumann, L. 2011. International symposium on anaerobic digestion of solid waste and energy crops 2011. Austria; Vienna

Schnürer, A., Jarvis, Å. 2010. Microbiological handbook for biogas plants. Avfall Sverige, SGC

Shima, S., Warkentin, E., Thauer, R.K., Ermler, U. 2002. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 93, No. 6. 519-530.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K., Pelkonen J. 2010. Geenitekniikka. Turun ammatti- korkeakoulu

Thauer, R.K., 1998, Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*, 144. 2377-2406.

Traversi, D., Villa, S., Lorenzi, E., Degan, R., Gilli, G. 2012. Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *Journal for environmental management*, 111. 173,177.

Turovskiy, I.S., Mathai, P.K. 2006. Wastewater sludge processing. New Jersey; John Wiley & Sons, Inc.

Wastewater handbook(WH):

1)[http://www.wastewaterhandbook.com/documents/sludge\\_treatment/831\\_anaerobic\\_digestion\\_theory.pdf](http://www.wastewaterhandbook.com/documents/sludge_treatment/831_anaerobic_digestion_theory.pdf)

2)[http://www.wastewaterhandbook.com/webpg/th\\_sludge\\_83anaerobic\\_digestion.htm](http://www.wastewaterhandbook.com/webpg/th_sludge_83anaerobic_digestion.htm)

Viitattu 10.5.13

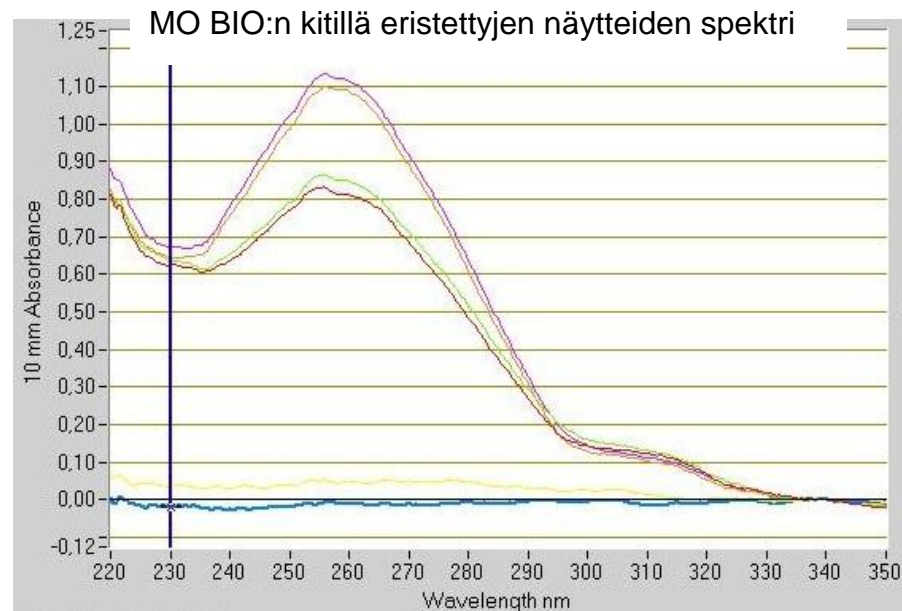
Zeikus, J.G. 1977. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological reviews*, June. 514-541.

Zhou, M., McAllister, T.A., Guan, L.L. 2011. Molecular identification of rumen methanogens: technologies, advances and prospects. *Animal feed science and technology* 166-167. 76-86

Liite 1. Kittitestien tulokset ja MO BIO:n kitillä eristettyjen näytteiden spektrit.

Kittitestien tulokset

454 SOP: <a href="http://www.mothur.org/wiki/454_SOP">http://www.mothur.org/wiki/454_SOP</a> Viitattu 5.8.13			NanoDrop			NanoDrop		PicoGreen
Näyte m(g)	Esikäsittely	Kitti	Puhtaus 260/280	Pitoisuus ng/μl	Jatkokäsittely	Puhtaus 260/280	Pitoisuus ng/μl	Pitoisuus ng/μl
0,2479	8500 g 20 min	MO BIO, 12888	1,17	37,43	MO BIO konsentroidi	1,73	29,67	-
0,2507	8500 g 20 min	PowerSoil DNA Isolation Kit	1,17	36,755	PrepMan ultra	1,63	16,77	-
0,2453	8500 g 20 min	MO BIO, hajotettu lämmittämällä	1,66	41,33	MO BIO konsentroidi	1,81	33,03	25,66
0,2476	8500 g 20 min	MO BIO, hajotettu lämmittämällä	1,77	54,885	MO BIO konsentroidi	1,84	47,44	39,09
0,2477	8500 g 20 min	Norgen,49300	1,81	24,765	-			
0,2439	8500 g 20 min	Soil DNA Isolation Kit (High HA)	1,80	28,46	-			
0,2508	-		1,72	17,505	-			
0,2466	-		1,85	11,895	-			
0,1042	8500 g 20 min	Epicentre, SM02005	0,715	1,49	-			
0,0981	8500 g 20 min	SoilMaster DNA extraction kit	0,14	0,375	-			



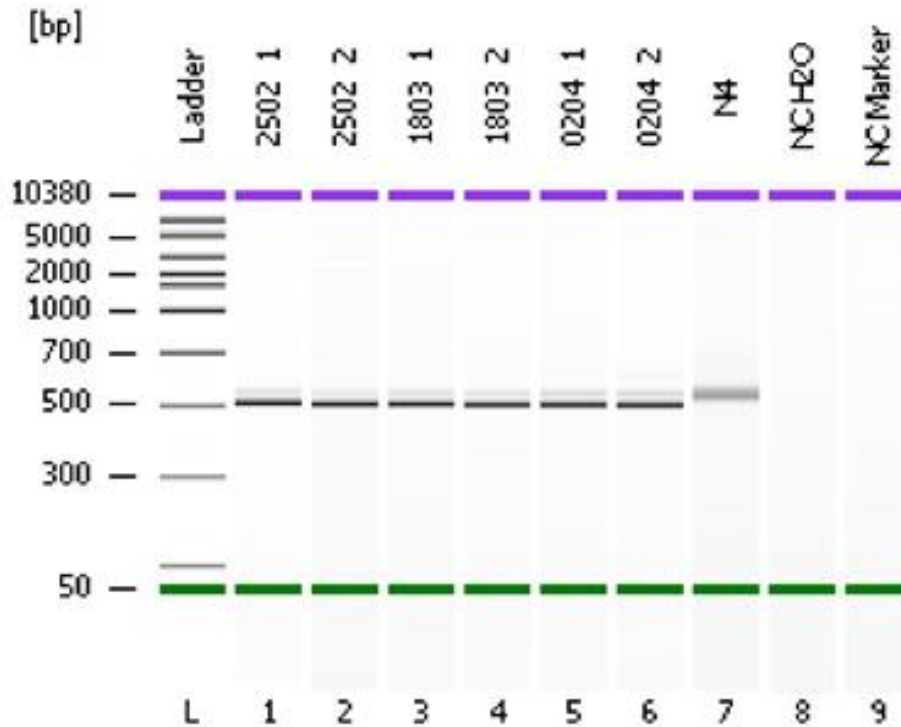
### Aikapisteiden puhtaudet ja pitoisuudet

Näyte	260/280	NanoDrop pvm.	Pitoisuus ng/ $\mu$ l	PicoGreen pvm.
2502_1	1,91	26.2.2013	108,791	12.3.2013
2502_2	1,9	26.2.2013	112,2256	12.3.2013
2502_3	1,92	26.2.2013	91,78461	12.3.2013
1803_1	1,86	3.4.2013	101,9794	4.4.2013
1803_2	1,86	3.4.2013	112,6628	4.4.2013
1803_3	1,86	3.4.2013	109,8412	4.4.2013
0204_1	1,85	3.4.2013	133,3968	4.4.2013
0204_2	1,88	3.4.2013	124,4953	4.4.2013
0204_3	1,87	3.4.2013	112,6052	4.4.2013

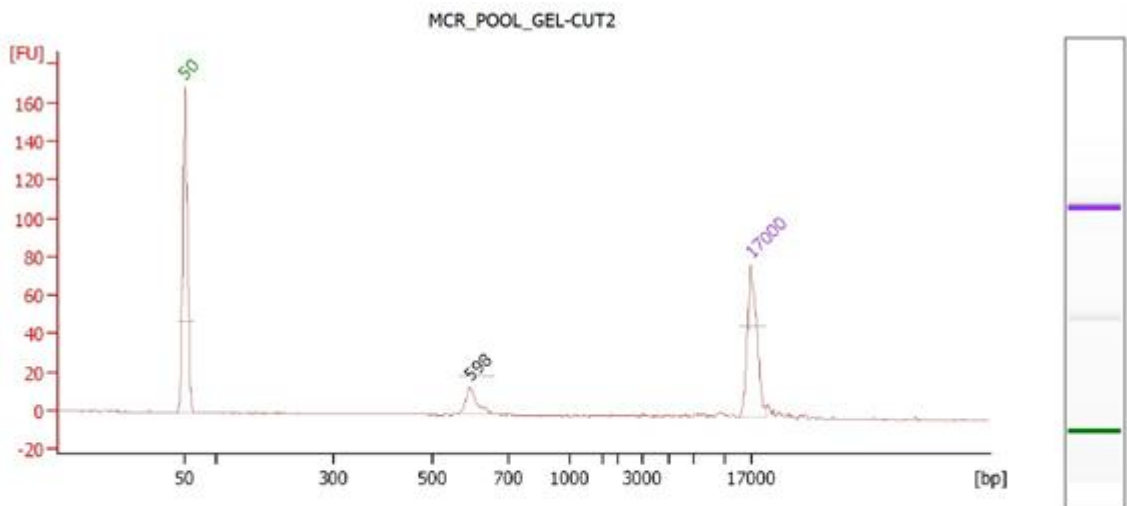
Liite 3. Aikapisteiden Bioanalyzer-geelikuvat ensimmäisen ja toisen PCR:n ja geeliltä leikkaamisen jälkeen.

Bioanalyzer-kuva ensimmäisen PCR:n ja geeliltä eristämisen jälkeen

### Electrophoresis File Run Summary



Bioanalyzer-kuva toisen PCR:n ja geeliltä eristämisen jälkeen



Overall Results for sample 4 : MCR\_POOL\_GEL-CUT2

Number of peaks found: 1

Peak table for sample 4 : MCR\_POOL\_GEL-CUT2

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	50	8,30	251,5	Lower Marker
2	598	1,11	2,8	
3	17 000	4,20	0,4	Upper Marker