

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven er utført ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, faggruppe miljømikrobiologi. Prosessen har vært krevende og svært lærerikt. Oppgaven har bydd på utfordringer og til tider frustrasjon, men da er det godt å vite at det er i motbakke det går oppover.

Det er flere personer som har bidratt til at denne oppgaven har latt seg gjennomføre og jeg vil gjerne benytte dette avsnittet for å takke disse. Jeg vil takke veiledere forsker Jon Fredrik Hanssen og professor Knut Rudi for god veiledning, godt samarbeid og interessante diskusjoner. Jeg vil takke Live Heldal Hagen for god samarbeid på laboratoriet og gode diskusjoner under skriveprosessen.

Jeg vil generelt takke alle ved mikrobiologisk avdeling der laboratoriearbeidet har blitt gjennomført. Av disse vil jeg spesielt takke stipendiat Daniel Mania og avdelingsingeniører Else Marie Aasen for gode tips og alltid tilgjengelig for spørsmål. Rannei Tjåland for gode tips og alltid tilgjengelig for spørsmål, samt for hjelp med korrekturlesing. Jeg vil takke Jane Agger for god veiledning og hjelp ved bruk av HPLC.

Jeg vil takke Signe Lyngseth Vestby for oppmuntring undervegs og hjelp med korrekturlesing. Til slutt vil jeg takke min mor og far for god støtte gjennom hele utdannelsen.

Sammendrag

Dette studiet har fokusert på det mikrobielle samfunnet i en biogassreaktor. Mikroorganismer som bakterier og archaea deltar i produksjon av biogass gjennom en prosess kalt anaerob nedbryting (anaerobic digestion). Det mikrobielle samfunnet i en biogassreaktor er svært komplekst. I den senere tid er det imidlertid tatt i bruk molekylære metoder som «high-throughput» sekvensering, noe som har gitt oss en bedre innsikt i dette. Med denne metoden kan en analysere store mengder data på forholdsvis kort tid og til en overkommelig pris. En ulempe kan være forholdsvis korte avlesninger på 100 bp, men Illumina MiSeq har endret dette med avlesning på 150 bp. Ved bruk av metoder som FISH, qPCR og sekvensering, var hensikten med oppgaven å påvise grupper av mikroorganismer, deres rolle i biogassprosessen, utvikling i oppstartsperioden for biogassreaktorer med substrat fra storfegjødsel og fiskeensilasje, samt forekomst av spesifikke grupper av metanogener i forhold til total forekomst av archaea. Våre forsøk viste størst dominans for bakterier som tilhørte fylket *Firmicutes*, mens *Methanobacteriales* viste størst dominans blant metanogener. I tillegg til de oppnådde resultater, har oppgaven vist at det har vært gunstig å kombinere ulike metoder for analyse av det mikrobielle samfunnet. Dette kan være et grunnlag for videre arbeid i lignende forsøk.

Abstract

This study has focused on the microbial community in a biogas reactor. Microorganisms in the form of bacteria and Archaea are involved in the production of biogas through a process called anaerobic digestion. The microbial community in a biogas reactor is very complex. Recently it has been adopted molecular methods to gain a greater insight. New methods such as "high-throughput" sequencing have made it possible to gain a greater insight into the microbial community. This method can analyze large amounts of data in a relatively short time and at an affordable price. A disadvantage may be relatively short reads of 100 kb, but Illumina MiSeq has temporarily changed this with a reading of 150 kb. The purpose using methods such as FISH, qPCR and sequencing is to identify groups of microorganisms, their role in the biogas process, development of start-up period for biogas reactors with substrate from cattle manure and fish silage, and the occurrence of specific groups of metanogenes in relation to the total incidence of Archaea. The result showed the greatest dominance of bacteria belonging to *Firmicutes* phylum, while *Methanobacteriales* demonstrated the greatest dominance among methanogens. In addition to the results obtained, the task has shown that it has been beneficial to combine various methods of analysis of the microbial society. This might be a basis for further work on these methods in related experiments.

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Historie og tidligere observasjoner.....	1
1.2	Metanogener og deres habitat.....	2
1.3	Biogass	3
1.3.1	Biokjemiske prosesser i dannelse av metan.	4
1.3.2	Anaerob nedbryting til dannelse av biogass	5
1.4	Fysiologiske forutsetninger for generering av metan	11
1.5	Inhibering og forebygging av inhibering i biogassprosessen	11
1.5.1	Forbindelser som forårsaker inhibering.....	11
1.5.2	Forebygging av inhibering	12
1.6	Identifisering av mikrobielle samfunn i anaerob nedbryting.....	13
1.7	Aktuelle metoder for analyse i forbindelse med biogass.....	16
1.7.1	Dyrkningsmetoder	16
1.7.2	Gasskromatografi (GC)	16
1.7.3	Høytytelse væskekromatografi (HPLC).	17
1.8	Identifisering ved bruk av molekylære metoder.....	18
1.8.1	Fluorescence <i>in situ</i> hybridisering (FISH).....	18
1.8.2	DNA ekstraksjon	19
1.8.3	Polymerase kjede reaksjon (PCR).....	20
1.8.4	Kvantitativ polymerase kjede reaksjon (qPCR)	21
1.8.5	Kvantifisering av PCR produkt	23
1.8.6	Sangersekvensering	23
1.8.7	«Next generation» Illumina sekvensering	24
1.9	Målet med oppgaven	26
2	Materialer og metoder	27
2.1	Rammene rundt prosjektet.....	27
2.2	Mikrobiologiske metoder	28
2.2.1	Oppsett og oppstart reaktorer	28
2.2.2	Beregning VS, TS og Spesifikk gassproduksjon.....	29
2.2.3	Gassmåling fra reaktorene	30
2.2.4	Prøveuttak fra reaktorene	31
2.2.5	Beregning av antall organismer i reaktorer, totaltall	31
2.3	Kjemiske analysemetoder.....	32
2.3.1	Gass kromatograf (GC) for beregning av % CH ₄ og CO ₂	32

2.3.2 Høy ytelse væskechromatografi HPLC, for analyse av VFA.....	33
2.4 Molekylære metoder.....	33
2.4.1 Fluorescens <i>in situ</i> hybridisering FISH	33
2.4.2 DNA ekstraksjon	34
2.4.3 Kvantitativ polymerase kjede reaksjon qPCR	35
2.4.3.1 qPCR kjørt med probe.....	36
2.4.3.2 qPCR kjørt med EvaGreen®	37
2.4.3.3 Beregning av antall mikroorganismer	37
2.4.3.4 Polymerase kjede reaksjon, PCR.....	37
2.4.5 Kvantifisering av PCR produkt ved bruk av PicoGreen.....	38
2.4.6 Forbehandling PCR produkt før Illumina sekvensering.....	39
2.4.7 ”Next generation” Illumina sekvensering.....	39
2.4.7.1 Konstruksjon av PRKI Illumina-primer bibliotek	39
2.4.8 Forbehandling av PCR produkt for Sangersekvensering.....	40
2.4.8.1 ExoSAP behandling.....	40
2.4.8.2 Big Dye Terminator labeling kit v1.1	40
2.4.8.3 Xterminator opprensings prosedyre	41
2.5 Behandling av sekvenserings resultat.....	41
2.5.1 Direkte sekvensering	41
2.5.2 Illuminasekvensering.....	42
3 Resultater.....	43
3.1 Metodetesting og optimalisering	43
3.2 Identifisering av det mikrobiologiske samfunnet i en bioreaktor	46
4 Diskusjon.....	63
4.1 Gassproduksjon	63
4.2 Det mikrobielle samfunnet i en bioreaktor	65
4.3 Konklusjon	70
4.4 Refleksjoner over egne resultater.	71
5 Evaluering av metoder og videre arbeid.....	73
5.1 Oppstart og drift samt behandling av biogassreaktorer	73
5.2 FISH	75
5.3 GC og HPLC	76
5.4 DNA ekstraksjon	76
5.5 PCR og qPCR.....	77
5.6 Videre arbeid	78
Litteratur.....	79

Oversikt over forkortelser anvendt i oppgaven

CM	Storfe gjødsel
FE	Fiskeensilasje
INOC	Inokulum
PCR	Polymerase kjede reaksjon
qPCR	Kvantitativ polymerase kjede reaksjon
FISH	Fluorescens <i>in situ</i> hybridisering
VFA	Volatile fatty acids
TS	Tørrstoff
VS	Innhold organisk materialet
GC	Gasskromatografi
HPLC	Høytytelse væskekromatografi
C _T	Terskelverdi for deteksjon av signal i qPCR
OTU	Operational taxonomic units
AD	Anaerob nedbryting
PCA	Principal komponent analyse
MCR	Multivariate curve resolution
PRK	Generell probe for prokaryote
ARC	Generell probe for archaea
MMB	Spesifikk probe for <i>Methanomicrobiales</i>
Msc	Spesifikk probe for <i>Methanosarcinales</i>

1 Innledning

1.1 Historie og tidligere observasjoner

Interessen og forskningen for metan og mikroorganismer som produserer denne gassen har eksistert helt siden det 18. århundre. Den første beskrivelsen av gassen ble gjort av Volta i 1776, der han beskrev metan som kom opp av sumper (Barker 1956). Det tok nesten nye 100 år før Bécamp påviste at det var mikroorganismer som forårsaket dannelse av metan. Dette ble gjort i en reaktor ved bruk av etanol sammen med kaninavføring (Barker 1956). Betydelig forskning ble utført på 1800- og tidlig 1900-tallet, der forskere fastslo at metandannelse var knyttet til anaerob nedbryting. Men mangel på kunnskap gjorde at man ikke kunne fastslå om metanogener dannet metan direkte fra «polymerer». I 1906 tok Söhngen opp tråden fra Bécamp og demonstrerte at enkelte forbindelser som acetat, samt hydrogen og karbondioksid kunne omdannes til metan (Oremland 1988). Neste store begivenhet i forskningen kom på 1930-tallet med Barkers pionerarbeid. I 1936 rapporterte han om isolering av den første «renkulturen» av metanogener «*Methanobacillus omelianskii*» (Barker 1956). Utvikling av teknikker for kultivering av strikt anaerobe organismer ble gjort av Hungate og Macy (1973) og var ekstremt viktig for videre forskning på metanogener. Ved bruk av denne teknikken beviste Bryant *et al.* (1967), at *M. omelianskii* besto av to organismer. Der en av organismene var en ikke-metanogen (s-organismen) som oksiderte etanol til acetat og hydrogen, og den andre en metanogen (*Methanobacterium bryanii*) som reduserte bikarbonat, sammen med hydrogen, og dannet metan. Denne oppdagelsen sammen med Hungates forsøk på hydrogen som intermediat i vomma på storfe (Hungate 1967), førte til en bedre forståelse av konseptet ”interspecies hydrogen transfer”. Dette har også vært en nøkkel til videre forståelse rundt økologien av metanogener de siste tiår.

Det finnes mange usikre kilder når det kommer til utnyttning av biogass som varmekilde, men man tror at det kan ha vært benyttet i Assyria, allerede i det 10. århundre før Kristus, for oppvarming av badevann (He 2010). De første dokumenterte bioreaktorene ble konstruert på midten av 1800-tallet, eksempelvis ble biogass brukt som drivstoff i gatelampene i Exseter, Storbritannia, på 1890-tallet (Bond & Templeton 2011). Teknologi og kunnskap om biogass økte drastisk på 1970-tallet da oljeprisene steg, og med det økte interessen for alternativ energi (Bond & Templeton 2011). I dag utføres forskning på biogass med fokus på økt

effektivitet og lavere kostnader. Tyskland er lengst fremme på biogassteknologien i Europa (Djatkov *et al.* 2012), mens Kina er ledene i Asia (Chen *et al.* 2010).

1.2 Metanogener og deres habitat

Metanogeners habitat finnes i myrer, ferskvannssediment, oversvømte områder og den gastrointestinale trakt hos drøvtyggere (Ferry & Kastead 2007; Liu & Whitman 2008; Zinder 1993). I tillegg kan metan dannes ved for eksempel anaerob slambehandling av avløpsvann og i biogassreaktorer. Metanogeners habitat er i områder hvor elektronakseptorer som oksygen, nitrat og treverdige jern er begrenset (Thauer *et al.* 2008; Zinder 1993). Dette er fordi tilstedeværelsen av andre elektronakseptorer enn CO₂, vil føre til fullstendig utkonkurrering av metanogener, da andre elektronakseptorene er termodynamisk mer favorisert enn CO₂ (Batstone *et al.* 2000).

Metanogener går under domenet av mikroorganismer kalt archaea, (Ferry & Kastead 2007) og utgjør den største gruppen i fyllet *Euryarchaeota* (Ferry & Kastead 2007). Archaea har evnen til å overleve i ekstreme miljøer (høye temperaturer, saltkonsentrasjoner eller lav pH). De har en unik cellevegg sammenlignet med bakterier. De kan være aerobe, fakultativt anaerobe eller strikt anaerobe. Næringsmessig varierer de fra kjemolitoautotrofe til organotrofe. Domenet archaea inkluderer psykrofile, mesofile og hypertermofile (Roane *et al.* 2009; Willey *et al.* 2009a).

I lang tid ble det antatt at metanogener hørte til under riket bakterier. Dette var inntil Woese og Fox (1977) studerte fylogenetisk diversitet ved bruk av SSU 16S RNA, og konkluderte med at spesifikke mikroorganismer som metanogener hørte til et eget rike. Det var først på 1990-tallet at det offisielt ble fremlagt et forslag om at mikroorganismer skulle deles inn i to riker bakterier og archaea. Dette på bakgrunn av molekylære sammenligninger som blant annet 16S RNA likhet (Woese *et al.* 1990). Derfor refereres metanogener som archaea i hele denne oppgaven, også der det refereres til artikler før dette årstallet.

Metanogener er strikt anaerobe (Thauer *et al.* 2008). De deltar i siste steg i omdannelsen av komplekse organiske forbindelser til den mest oksiderte form (CO₂) og reduserte form (CH₄) av karbon (Angelidaki *et al.* 2003). Metanogene er klassifisert inn i fem veletablerte ordner og en nylig oppdaget orden av Sakai (2008).

Tabell 1.1 Oversikt over ulike grupper metanogener, og viser hovedkarakteristikk av de ulike ordenene, fysiologi og morfologi. (Karakashev *et al.* 2005; Sakai *et al.* 2008; Zinder 1993)

Orden	Celle morfologi	Fysiologi
<i>Methanobacteriales</i>	Stav eller filament	Hydrogenotrofe; mesofile eller termofile
<i>Methanococcales</i>	Irregulær kokk	Hydrogenotrofe; mesofile eller termofile
<i>Methanomicrobiales</i>	Små staver, irregulær kokk, flate ovalformet celler	Hydrogenotrofe; mesofile
<i>Methanosarcinales</i>	Staver eller filamenter (<i>Methanosataceae</i>) irregulær kokk, eller <i>Sarcinae</i> lignende celler (<i>Methanosarcinaceae</i>)	Strikt acetotrofe (<i>Methanosaetaceae</i>) acetotrof eller hydrogenotrofe (<i>Methanosarciaceae</i>) mesofile eller termofile
<i>Methanopyrales</i>		Hypertermofil, hydrogenotrof
<i>Methanocellales</i>	Stav	Hydrogenotrof, mesofil.

Methanomicrobiales er den største og mest diverse gruppen av metanogener.

Methanosarcinales er den mest "allsidige" og kan utnytte metylgrupper, acetat og reduksjon av CO₂ sammen med hydrogen (Ferry & Kastead 2007). De ulike gruppene i Tabell 1.1 har organismer med en 16S rRNA sekvenslikhet på mindre enn 82 %. Disse gruppene kalles ordner og deles inn etter utnyttelse av ulike substrater (acetat eller CO₂). Disse ordenene er videre delt inn i 10 familier og 31 slekter. Ulike familier av metanogener har en 16S rRNA likhet mindre enn 88-93 %. Metanogener med en 16S rRNA likhet på mindre enn 93-95 % deles inn i ulike slekter. (Zinder 1993).

1.3 Biogass

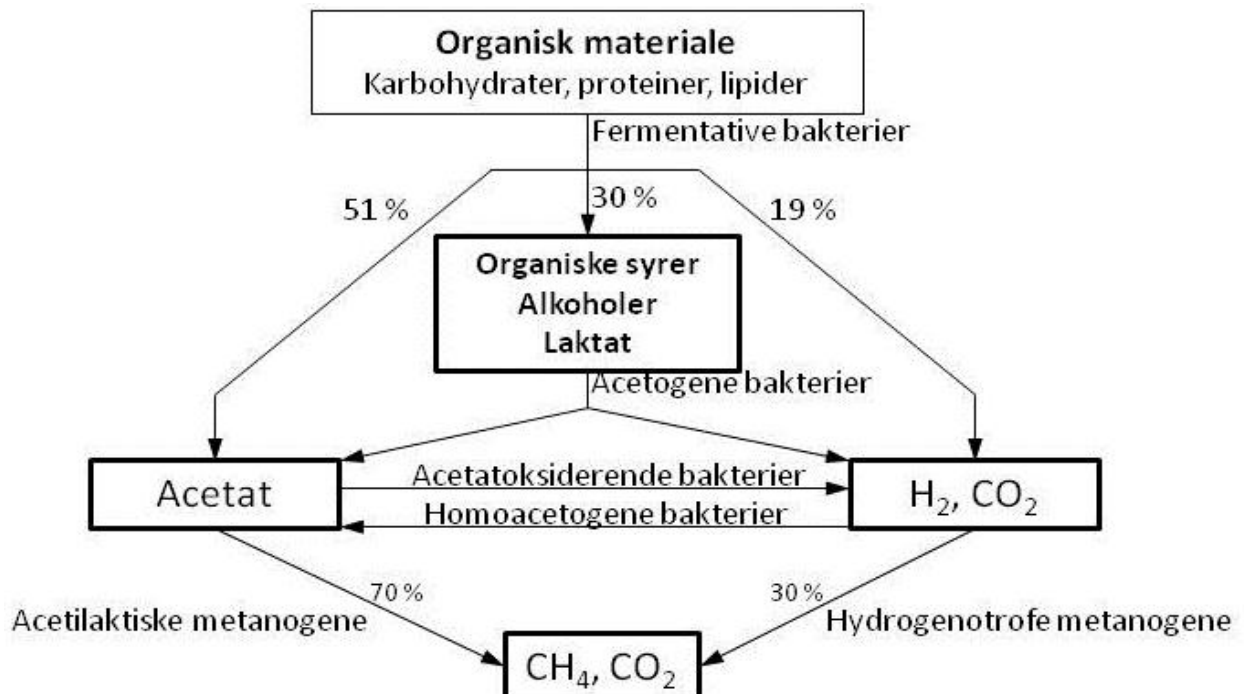
Biogass består av metan og karbondioksid, ammonium, vann og kan i tillegg inneholde spor av hydrogensulfid, og hydrogengass (Boe 2006; Vilniskis *et al.* 2011). Gassen dannes ved anaerob nedbryting eller anaerobic digestion (AD) (Kaparaju *et al.* 2009) av organisk materialet (Ahring *et al.* 1992). Organisk materialet betegnes som substrat og kan være: ulike typer husdyrgjødsel, matavfall, slam fra renseanlegg, hageavfall etc. (Schnurer & Jarvis 2010). Sammensetningen av gass som produseres avhenger av innholdet av ulike forbindelser i substratet. Som vist i Tabell 1.2 vil substrat med høyt fettinnhold gi størst avkastning og substrat med høyt proteininnhold vil gi minst avkastning (Schnurer & Jarvis 2010). En reaktor kan enten operere som kontinuerlige, semi-kontinuerlig eller batch. I en semi-kontinuerlig og kontinuerlig reaktor vil nytt substrat tilføres jevnlig, og prosessen vil gå kontinuerlig. I en batchreaktor vil ikke nytt substrat bli tilført, og reaktoren stopper når substratet er brukt opp. Produktet fra biogassprosessen, betegnes som biorest, og kan etter behandling brukes som gjødsel.

Tabell 1.2 Spesifikk gassproduksjon og sammensetning av metan og karbondioksid for karbohydrat, fett og protein (Schnurer & Jarvis 2010)

Substrat	Biogass (m ³ /kg VS)	Biogass komposisjon CH ₄ :CO ₂ (%)
Karbohydrat	0,38	50:50
Fett	1,0	70:30
Protein	0,53	60:40

1.3.1 Biokjemiske prosesser i dannelsen av metan.

Prosessen består av fire steg, (1) hydrolyse, (2) fermentering, (3) acetogenese og (4) metanogenese (Karakashev *et al.* 2005; Lozano *et al.* 2009; Weiland 2010). Hydrolyse og fermentering foregår ofte samtidig (men er valgt å fremstilles som to separate prosesser i denne oppgaven). Det er et kompleks samspill mellom mikroorganismer, der noen av mikroorganismene danner syntrofe mellom ulike steg i prosessen. Her er ulike grupper avhengige av hverandre for at prosessen skal fungere optimalt. Figur 1.1 viser en oversikt over hele prosessen (fra hydrolyse til metandannelse), der hydrolyse og fermenteringsmikroorganismer er ansvarlig for nedbrytning av polymerer og monomerer. De danner i hovedsak acetat og hydrogen og varierende mengder fettsyrer som propionat og smørsyre (Thauer *et al.* 2008; Weiland 2010). Resterende fettsyrer omgjøres til acetat og hydrogen. Deretter vil acetat eller CO₂ (sammen med H₂) reduseres til metan (Ferry & Kastead 2007; Karakashev *et al.* 2005).



Figur 1.1 Oversikt over karbonflyt i biogassprosessen. Prosessen består av et kompleks samspill mellom bakterier og arker. Av organisk materialet brytes 51 % direkte ned til acetat og 19 % til H₂ + CO₂ mens 30 % først brytes ned til ulike syrer og deretter til acetat og H₂+CO₂. Av metan som dannes så viser figuren at 70 % kommer fra reduksjon av acetat, mens resterende 30 % i hovedsak kommer fra reduksjon av karbondioksid med hydrogen som elektrondonor (Boe 2006).

1.3.2 Anaerob nedbryting til dannelselse av biogass

Hydrolyse

Hydrolyse er en ekstracellulær prosess der biopolymerer brytes ned til løselige oligomerer og monomerer. (Lozano *et al.* 2009; Schnurer & Jarvis 2010). Prosessen er viktig, for nedbryting av komplekse forbindelser, som bakteriene ikke direkte kan benytte seg av. Hydrolyse skjer ved at ulike ekstracellulære enzymer blir skilt ut av bakterier. Cellulase, amylase og xylanase bryter ned karbohydrater til sukker, lipase bryter ned lipider til glycerol og lange fettsyrer, og proteaser bryter ned proteiner til aminosyrer (Parawira *et al.* 2005). Ved å skille ut spesifikke enzymer, vil dette føre til en oppdeling av forbindelsene som gjør dem mer tilgjengelig (Schnurer & Jarvis 2010). Bakteriene kan skille ut flere typer enzymer eller være mer spesifikke og kun skille ut en type. Spesifikke bakterier som kun skiller ut cellulase kalles for cellulolytiske (Schnurer & Jarvis 2010). Enzymer som bryter ned proteiner betegnes proteolytiske. Hydrolysen påvirkes av type organisk startmateriale samt overflate areal, biomassekonsentrasjon, enzymproduksjon og adsorpsjon (Batstone *et al.* 2000). For eksempel vil en reaktor med høyt innhold av cellulose ha en mer langsom nedbrytningsprosess, enn en reaktor med stort innhold av proteiner.

Tabell 1.3 Ulike substrater og produkt som dannes under hydrolyse (Schnurer & Jarvis 2010)

Substrat	Nedbrytings produkt
Proteiner	Aminosyrer
Lipider	Fettsyrer og glyserol
Polysakkarider	Monosakkarider
Nukleinsyrer	Puriner og Pyrimidiner

Studier av ulike typer mikroorganismer som er aktive når ulike forbindelser er tilstede har vist at hydrolyse av karbohydrater utføres av bakteriegrupper som *Bacterioides*, *Clostridium* og *Acetivibrio*. Mange av disse bakteriene har kombinasjoner av enzymer lagret i cellusomer i celleveggen. De har også proteiner som kan binde seg til eksempelvis cellulose og gjøre nedbrytnings- prosessen raskere (Ding *et al.* 2008). *Clostridium* er aktiv under hydrolyse av proteiner og ulike aminosyrer dannes etter hvilke proteiner som brytes ned. I tillegg til *Clostridium* er også *Peptostreptococcus* og *Bifidbacterium* aktive under hydrolyse av proteiner. Fettsyrer brytes ned av *Clostridium*, og lipase som bryter ned fett produseres i hovedsak av aerobe eller fakultativt anaerobe bakterier.

Fermentering

Fermentering beskrives generelt som en prosess der deler av molekylet som oksideres opptrer som elektronakseptor. Produktet som dannes er enten mindre oksidert eller mer redusert enn substratet (Oremland 1988). For både hydrolyse og fermentering avhenger reaksjonen av hvilke organismer som er tilstede, samt hvilke substrat som er tilgjengelig. I tillegg vil pH eller løst hydrogenkonsentrasjon ha effekt på prosessen (Rodriguez *et al.* 2006). Foruten de bakteriene som er aktive ved hydrolyse er disse bakteriegruppene aktive ved fermentering: *Enterobacterium*, *Bacteriodes*, *Acetobacterium* og *Eubacterium*. Under fermentering benytter bakteriene substrater frigitt i hydrolyse (aminosyrer, sukkergrupper), dette gjelder alle forbindelser med unntak av fettsyrer som oksideres anaerobt i acetogenese. Hovedproduktene fra fermentering er eddiksyre, smørsyre og propionsyre.

Acetogenese

Fermenteringsprodukter som; fettsyrer lenger enn to karbon atomer, eller alkoholer lenger enn et karbonatom, samt aromatiske fettsyrer, kan ikke benyttes direkte i metanogenese. I acetogenese vil disse forbindelsene oksideres til acetat og H₂ av obligat protonreducerende bakterier i samspill med metanogener (Schnurer & Jarvis 2010; Stams & Caroline 2009). I prosessen benytter anaerobe mikroorganismer protoner som endelig elektronakseptor i oksidering av organiske molekyler i dannelsen av hydrogengass (Stams & Caroline 2009).

I forhold til termodynamikkens lover, vil hydrogengass kun dannes hvis den totale konsentrasjonen holdes lav (Bagi *et al.* 2007). Ved fravær av metanogener vil hydrogenproduserende bakterier ikke utføre oksidasjon, da det ikke er energetisk gunstig med høye hydrogenkonsentrasjoner (>10 Pa) og prosessen vil være endogern (Stams & Caroline 2009; Thauer *et al.* 2008; Zinder 1993).

Termodynamikkens lover defineres som $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$. Der ΔG er endring i fri energi, ΔH er endring i entropi som oppstår under en reaksjon, T er temperatur i kelvin og ΔS er endring i entropi under en reaksjon. ΔS beskriver, endring i entropi, og er et mål på andelen av den totale mengde fri energi et system som ikke kan bruke til arbeid. Om reaksjonen er energetisk gunstig defineres ut fra standard fri energi ΔG° . Standard fri energi måles ved konstant trykk og temperatur og vil være energetisk gunstig hvis ΔG° er negativ (Willey *et al.* 2009b).

En organisme er avhengig av at metabolismen den utfører er energetisk gunstig for å kunne generere ATP, noe som er helt nødvendig for å drive ulike prosesser i cellen (Madsen 2008). Ved dannelse av metan, forekommer et kontinuerlig forbruk av hydrogen som elektron-donor, og hydrogenkonsentrasjonene vil holdes lav til en hver tid. Denne prosessen kalles interspecies hydrogen transfer og er en syntrofi mellom hydrogenproduserende og hydrogenforbrukende organismer (Bagi *et al.* 2007).

I acetogenese er både hydrogen og formeat viktige elektrobærere i syntrofen mellom acetogener og metanogener. Begge forbindelsene forekommer i svært lave konsentrasjoner og det er derfor vanskelig og avgjøre hvilke av dem som er viktigst. Flere acetogener kan frigi elektroner både fra H₂ og formeat og mange metanogener er i stand til å utnytte begge (de Bok *et al.* 2004). Det finnes en rekke organismer som kan drive acetogenese, eksempler på disse er: *Clostridium*, *Syntrophomonas* og *Syntrobacter*.

Metanogenese

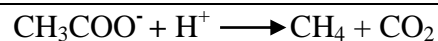
Metanogenese er det endelige steget i biogassprosessen. Her dannes metan og karbondioksid av ulike metanogener (Ding *et al.* 2008; Ferry & Kastead 2007; Liu & Whitman 2008). Substratene i prosessen er begrenset til karbondioksid, hydrogen, acetat og enkelte andre én-karbonforbindelser som metylaminer, alkoholer og formeat (Ferry 1997; Liu & Whitman 2008; Oremland 1988; Zinder 1993). Flere ulike mikroorganismer opptrer i metanproduksjonen, hvor alle hører til under domenet archaea. Metan dannes i størst grad (70 %) fra acetat (acetotrofe) eller ved reduksjon av karbondioksid og hydrogen (30 %) (hydrogenotrofe), jf. Figur 1.1. (Ferry & Kastead 2007; Liu & Whitman 2008). En tredje prosess opptrer der metan dannes fra metylgrupper (Liu & Whitman 2008).

Dannelse av metan fra acetat og CO₂ skjer på samme måte, ved at den metylerte gruppen av substratet festes til koenzymet CoM-S og danner CH₃-CoM-S, som er substratet for metylreduktase. Dette katalyserer den reductive demetyleringen av CH₃-CoM-S til metan (Ferry & Kastead 2007). Det andre koenzymet i denne prosessen er CoB som tilfører elektroner til reaksjonen. Prosessen kan observeres både i Figur 1.2 og 1.3. To steg er like i begge prosesser, den ene er binding av CoM-SH som fører til at THMPT slipper metyllgruppen ①, den andre er reduksjon av CoM-S-S-COB til HS-COB og HS-CoM ② (Ferry & Kastead 2007) (① og ② viser hvor på Figur 1.2 og 1.3 de ulike prosessene skjer.)

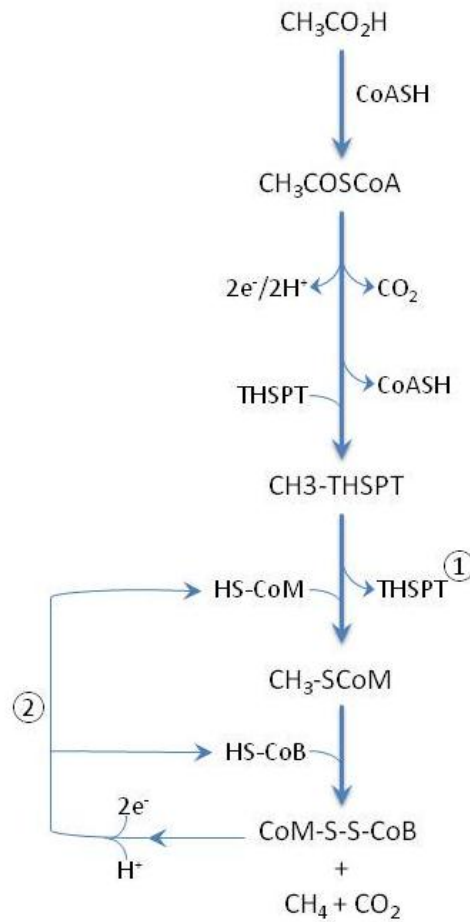
Prosessen er avhengig av flere ulike co-faktorer. I tillegg til CoB og CoM kreves tetrahydrometanoperin (THMPT), methanofuran (MF), coenzym-F₄₂₀ og coensym-F₄₃₀. De to førstnevnte co-faktorene bærer en enslig karbonenhet, -når CO₂ reduseres til metan (Ferry & Kastead 2007). F₄₂₀ bærer elektroner og protoner og F₄₃₀ er et nikkeltetrapyrrole som opptrer som en co-faktor for enzymet methyl-CoM (methylreduktase). Figur 1.3 (metansyntese) viser at ATP syntese er linket til metanogenese ved elektrontransport. Lite er kjent rundt ATP syntese ved metanogenese, men det er kjent at oksidasjon av H₂ på yttersiden av membranen er involvert i prosessen, for regenerering av CoM-S-S-CoB til CoM-SH og CoB-SH, ved F₄₂₀. Dette er en «exergonic» prosess som er koblet opp mot pumping av protoner over membranen som vil skape en proton motive force som vil drive ATP-syntese (Ferry & Kastead 2007; Madigan *et al.* 2009). I tillegg viser det seg at overføring av metylgrupper fra metyl-HMPT til HS-CoM frigjør mye energi ved opptak av natriumioner. Det har også blitt foreslått at natrium er drivkraften for ATP syntese som vist i Figur 1.3.

Acetotrof metanogenese

Acetotrof metanogenese gir en $\Delta G^\circ = -31$, og er derfor ikke favorisert med hydrogenotrofer tilstede, og denne prosessen fungerer derfor kun ved lav hydrogenkonsentrasjon (Willey *et al.* 2009b). Første steg i prosessen er aktivering ved acetyl-CoA (Ferry 1997; Madigan *et al.* 2009). Acetotrofe reaksjoner splitter acetat for metanogenese, deretter oksideres karboksylgrupper til CO₂ ved formeat dehydrogenase (Zinder 1993) og videre reduseres metylgruppen til metan (Figur 1.2).



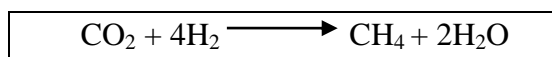
To slekter er kjent for å benytte acetat som substrat: *Methanosarcina* (kan også benytte andre forbindelser som substrat (Liu & Whitman 2008)) og *Methanosaetaceae* (acetat spesifikk).



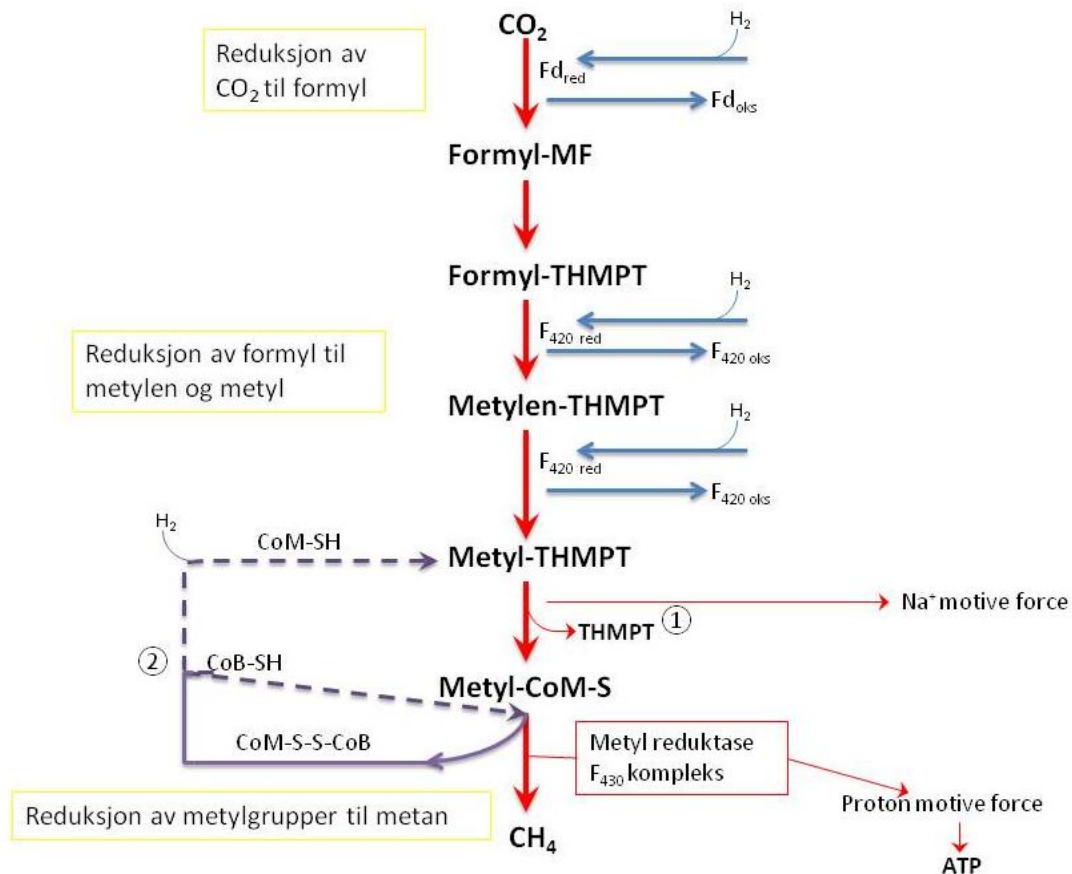
Figur 1.2 Oversikt over dannelse av metan ved reduksjon av acetat. Acetat aktiveres av CoA. Acetat kløves så av fem-subenheten CO dehydrogenase/acetyl CoA syntase. Metylgruppen overføres så til THMPT og karbonylgruppen oksideres så til CO_2 . Deretter går forbindelsen gjennom et CoM-mediert terminalt steg av metanogenese. På likt oksideres CO-gruppen som sammen danner de to endeproduktene i acetotrof metanogenese metan og karbondioksid. Figur basert på (Ferry 1997).

Hydrogenotrof metanogenese

Hydrogenotrofe metanogener reduserer CO_2 til metan med hydrogen som elektrondonor (her kan også formeat, CO og enkelte alkoholer opptre som elektrondonor) og CO_2 som elektronakseptor (Liu & Whitman 2008; Madigan *et al.* 2009).



Reaksjonen er energetisk mest gunstig med $\Delta G^\circ = -135 \text{ KJ/mol}$, og mer optimal ved høy konsentrasjon av hydrogen (Willey *et al.* 2009b). Prosessen virker ved at 4 CO molekyler oksideres til CO_2 ved CO-dehydrogenase, deretter reduseres et CO_2 molekyl til CH_4 . Selve metandannelsen starter ved at Fd_{red} donerer elektroner og reduserer CO_2 til formyl (Ferry & Kastead 2007). Hydrogen er et intermediat og opptre som direkte elektrondonor. Av metanogener er disse hydrogenotrofe; *Methanobacteriales*, *Methanococcale*, *Methanosarcina*, *Methanopyrale* og den nyopptagede *Methanocellales*. Figur 1.3 gir en detaljert beskrivelse av metandannelse ved hydrogenotrofe.

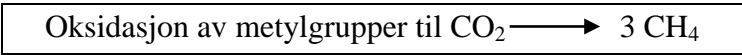


Figur 1.3 Metanogenese, metan dannet fra CO₂ og hydrogen ved hydrogenotrofe metanogener. CO₂ aktiveres via et enzym som inneholder methanofuran. Fra dette dannes CO₂ til formyl hvor den intermediate elektrondonor er ferrdoxin (Cardinali-Rezende *et al.*). Formyl forbindelsen omdannes så til et enzyminnholdene methanoprotein (Formyl-MF). Som igjen blir redusert til metylen og metyl i to separate steg, hvor F₄₂₀ opptrer som intermediat elektrondonor og THMPT som elektron bærer. Metylgruppen får så binding av CoM som fører til at THMPT løsner ①. Metyl CoM-S vil så omdannes til metan ved metyl reductase. Metan dannes ved at coenzymet F₄₃₀ reduserer metylgruppen fra CoM, og danner Na⁺. Den resterende forbindelsen reduseres igjen av CoB og danner metan samt et disulfid kompleks mellom CoM-S-S-CoB. CoM og CoB regenereres ved redusering av CoM-S-S-CoB med H₂ ②. Denne reduksjonen fører til dannelsen av en elektrokjemisk gradient som driver ATP syntese (Ferry & Kastead 2007; Madigan *et al.* 2009). Figur: F. Jordhøy, basert på figurer fra (Ferry & Kastead 2007; Madigan *et al.* 2009).

Metanogenese med metylgrupper

Det er kun ordenen *Methanosarcinales* med unntak av *Methanosphaera* (orden *Methanobacteriales*) som kan benytte metylerte grupper i sin respirasjon (Zinder 1993).

Under metanogenese vil metylerte grupper fra metylerte forbindelser bli overført til beslektede korrinoid proteiner og deretter til CoM. Metylt-CoM vil straks entre metanogenese og bli redusert til metan på samme måte som beskrevet i Figur 1.3 (Madigan *et al.* 2009). Denne reaksjonen krever blant annet enzymet metylltransferase.



1.4 Fysiologiske forutsetninger for generering av metan

Faktorer som avgjør hvorvidt metan dannes er tilgang på substrat, pH, temperatur (Wijekoon *et al.* 2011), oksygen, overføringshastighet, og oppholdstid (Komemoto *et al.* 2009).

Metanogener danner metan i et forholdsvis snevert område mellom pH 6,5-8,5 med en optimal pH på 7-8 (Weiland 2010; Zinder 1993). Ved fall i pH < 6 eventuell økning i pH > 8 vil dette ha stor innvirkning på selve metandannelsen, som vil synke drastisk. pH økning kan skyldes akkumulering av ammonium. Senkning i pH kan skyldes dannelse av organiske fettsyrer (VFA)

Temperatur kan ha stor innvirkning på produksjon av biogass. Prosessen foregår oftest ved to temperaturer: 37 °C (mesofilt) eller ved 55 °C (termofilt). Valg av temperatur avgjøres etter type startmateriale og erfaring med prosessen. Ved bruk av termofil reaktor, er det demonstrert at diversiteten av metanogener er lavere enn i en mesofil reaktor (Karakashev *et al.* 2005). Det er også demonstrert at termofile har en raskere generasjonstid enn mesofile (Weiland 2010; Zinder 1993), men er også mer følsomme for temperaturendringer. Dette innebærer da at mikrobefolkningen er mer sårbart for temperaturendringer, men at vekstraten av metanogener er adskillig høyere i en stabil reaktor. I forhold til termofiles følsomhet ovenfor temperaturendringer, kan mesofile utsettes for en temperatursvingning på ± 3 grader uten utslag på selve gassproduksjonen, men den totale gassproduksjonen vil være lavere, enn i en stabil termofil reaktor. I termofile reaktorer, opereres det med høyere inn- og ut- rate av substrat, eller lavere oppholdstid. Dette kan skape større ubalanse i nedbrytningsprosessen og øke risikoen for ammoniuminhibering (Weiland 2010).

Metanogens nulltoleranse for oksygen gjør dette til en viktig faktor i prosessen. (Zinder 1993). Metanogener kan ikke produsere metan eller vokse ved tilstedeværelse av oksygen, men kan være oksygentolerante og forholde seg i et og samme stadium under tilstedeværelse av O₂. Eksempelvis har *Metanocarsinae* blitt utsatt for oksygen i 24 timer (Zinder 1993) og vært levedyktig etter dette, grunnet sin spesielle "pseudosarcinale" struktur.

1.5 Inhibering og forebygging av inhibering i biogassprosessen

1.5.1 Forbindelser som forårsaker inhibering

Flere forbindelser kan bidra til hemming av gassproduksjon, og store ressurser er lagt ned for å hindre at dette skjer. En av forbindelsene som er kjent for å kunne bidra til å hemme prosessen er den reduserte formen av nitrogen (ammonium), som dannes i nedbrytningsprosessen før selve metandannelsen. NH₄ frigjøres ved nedbryting av store

mengder proteiner (Boe 2006). Ammonium er et viktig næringsstoff som trengs for at bakteriene skal kunne vokse ved anaerob nedbryting, men det er rapportert ved flere tilfeller at ammonium kan være med å hemme metanproduksjon ved for høye konsentrasjoner (Nakakubo *et al.* 2008; Yabu *et al.* 2011). VFA kan her være en god indikator på høy ammoniumkonsentrasjon, da fermentative mikroorganismer er mer tolerante ovenfor ammonium inhibering, sammenlignet med metanogener. Dette fører til at VFA som dannes av fermentative bakterier vil akkumulere når metanogener hemmes av ammonium inhibering.

VFA kan direkte bidra til å hemme dannelsen av metan, men er også viktige substrater for metandannelse der eddiksyre og smørsyre er mest favorisert som substrat (Wijekoon *et al.* 2011). Propionsyre er en viktig VFA både i oppstartsperioden og for stabilisering av reaktoren, men har også vist seg å være den mest giftige av alle syrene. Inhibering av prosessen kan skje ved svært lave konsentrasjoner av propionsyre, grunnet lavt krav til partialtrykk av H₂. (Wijekoon *et al.* 2011). Påvirkning av fettsyrer avhenger av bufferkapasiteten til reaktorblandingen (Weiland 2010). Bufferen som forekommer mest i en bioreaktor er bikarbonat (HCO₃⁻) med en pKa på 6,3. Ofte har dyregjødsel høy bufferkapasitet som fører til en stabil pH mellom 7,5 -8 (Boe 2006).

For store konsentrasjoner av VFA kan bidra til en forsuring av reaktorer, selv med høy bufferkapasitet. Høy rate av VFA kan oppstå ved for stor belastning av organisk material og/eller kort oppholdstid og/eller inhibitorer. Da vil en akkumulering av VFA føre til et dropp i pH og hemming av metandannelse (Weiland 2010). Kloroform og 2-bromoethanesulfonate er to nyoppdagede inhibitorer i metanogenese, og lite er kjent rundt deres inhiberingsfunksjon (Evans *et al.* 2011).

1.5.2 Forebygging av inhibering

Få metoder er utviklet eller optimalisert for forebygging av inhibering. Dette er fordi det er få enheter/ parametere som kan måles når reaktoren er i gang. Kompleksiteten av prosessen gjør det vanskelig å finne enkeltparametere som kan reflektere den metabolske prosessen ved anaerob nedbryting. Metandannelse er en av få parametere som kan indikere prosessens gang, men ikke hva som eventuelt fører til nedgang av metanproduksjon (Boe 2006). Det er foreslått at hydrogenkonsentrasjon og redokspotensialet kan være en kontroll over hele prosessen. Her gjør komplisert dynamikk og varians i ulike reaktorer og substrat tolkning av resultat vanskelig. Syrer er en god indikasjon på hvorfor biogassprosessen ikke fungerer optimalt. pH-meter er ofte benyttet direkte i reaktoren, men blant annet dannelse av biofilm på

elektroden har gjort metoden lite gunstig. Ved høy bufferkapasitet på blandingen, kan et fall i pH ofte først detekteres når reaktoren allerede er i stor ubalanse.(Nielsen 2006).

Den vanligste metoden per i dag er kontroll av VFA-konsentrasjon, men prosessen er tidkrevende, da analysen må skje via gasskromatografi (GC) eller høytytelse væskrokromatografi (HPLC) (Boe *et al.* 2005). Ulike konsentrasjoner av VFA er forslått som en indikasjon på om reaktoren vil lide av inhibering som en følge av VFA. Weiland (2010) har foreslått at en konsentrasjon på mer enn 1000 mg/l av propionsyre vil hindre metanproduksjon, mens Ahring *et al.* (1995) har foreslått at konsentrasjonen av både smørsyre og isobutyrat vil kunne indikere inhibering.

1.6 Identifisering av mikrobielle samfunn i anaerob nedbryting

Å studere et komplekst mikrobielt samfunn er en utfordring, da det kun er < 1 % av alle mikroorganismer som lar seg dyrke med tradisjonelle dyrkningsmetoder (Ferrer *et al.* 2005). Få metoder er utviklet direkte for analyse av mikrobielle samfunn ved anaerob nedbryting. Men metoder er blitt tatt i bruk ved å adaptere teknikker fra tilsvarende komplekse miljø, som for eksempel i jord. Metodene er molekylærbiologiske og baserer seg på bruk av gener som koder for 16S rRNA. En oversikt over molekylære metoder til analyse av komplekse mikrobielle samfunn er vist i Figur 1.4. 16S rRNA finnes i alle prokaryote og består både av høyt konserverte og variable domener med en total lengde på ca. 1500 nukleotider (Zimonja *et al.* 2008). Dette har gitt innsikt i det mikrobielle samfunnets dynamikk og struktur. Hovedverktøyene som benyttes er DNA ekstraksjon, 16S rRNA gensekvensering med polymerase kjede reaksjon (PCR), Kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR), klonbibliotek, Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) og Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Evans *et al.* 2011).

FISH, kombinerer presisjonen av molekylær genetikk med visuell informasjon fra mikroskopi. Metoden detekterer nukleinsyrer med fluorescens-merkede prober, som hybridiserer spesielt til en komplementær målsekvens i en intakt celle. FISH benytter seg av 16S rRNA som målmolekyl på grunn av dets genetiske stabilitet, domenets struktur med konserverte og variable regioner og dets høye kopinummer(Moter & Gobel 2000)

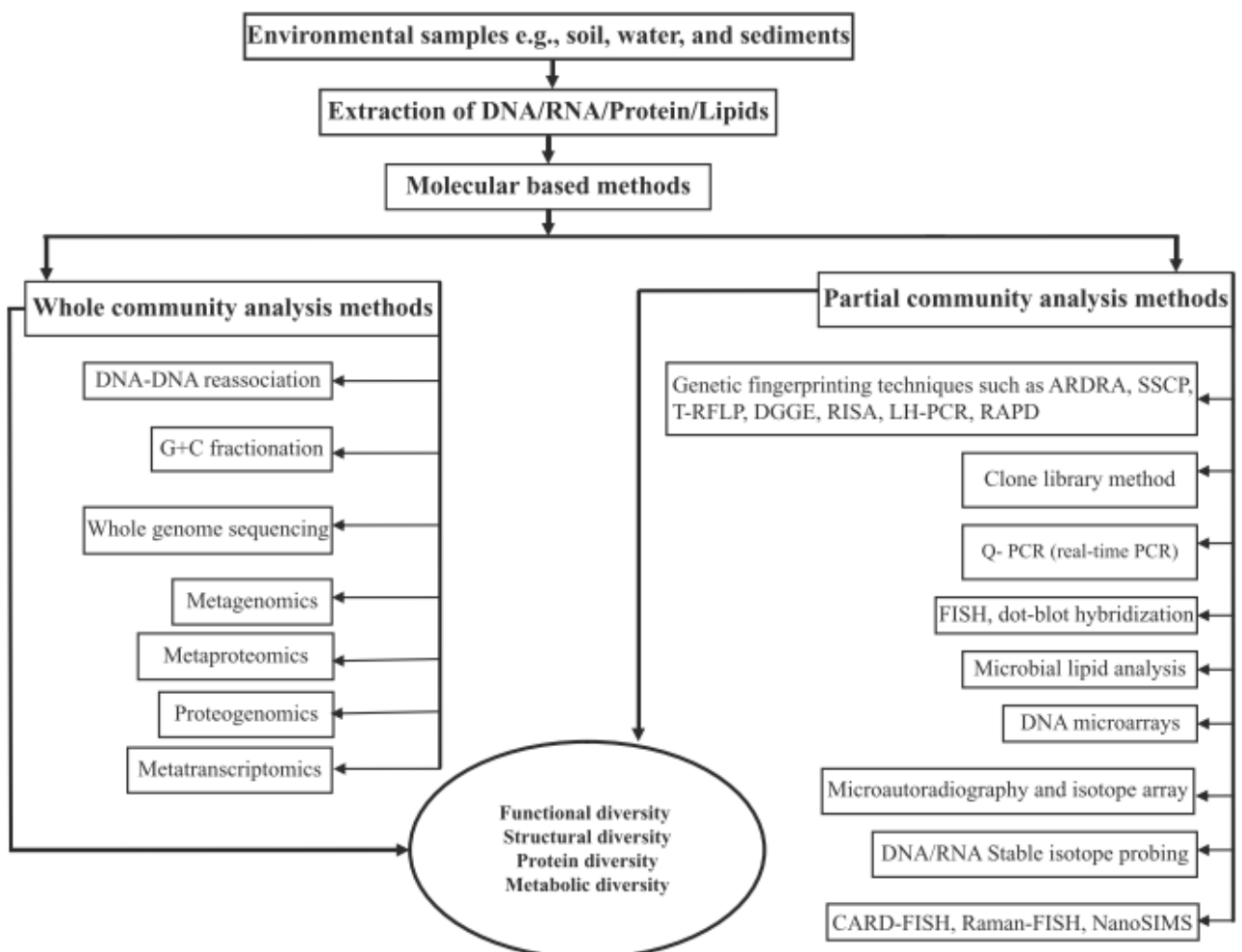
In situ hybridisering (Yabu *et al.*) ble uavhengig utviklet av to forskergrupper (John *et al.* 1969; Pardue & Gall 1969). Radiomerket DNA (28S RNA) ble hybridisert fra *Xenopus* oocytter og observert med ³²P-mikroautoradiography. Metoden ble første gang introdusert i bakteriologi av Giovannoni *et al.* (1988), som var den første til å bruke radiomerket rRNA direkte merket for mikroskopidetektering av bakterier. Med utvikling av fluorescens merkede prober av blant annet Pinkel *et al.* (1986) ble metoden FISH første gang brukt for deteksjon, av enkle mikrobiologiske celler, i 1989. Fluorescens-prober var adskillig bedre sammenlignet med radiomerkede prober, de var tryggere, ga bedre oppløsning og ingen behov for ekstra deteksjonssteg.

qPCR er basert på PCR, oppfunnet av Mullins K. og Fobona F i 1983 (Kubista *et al.* 2006). Metodens funksjon var å oppformere DNA-fragment fra en ikke-detektbar konsentrasjon. Resultatet kunne kontrolleres med gelelektroforese. Kvantifisering lot seg ikke gjøre med PCR, da kun sluttproduktet av oppformeringen ble observert på agarosegelen (Kubista *et al.* 2006). Dette ble løst ved å videreutvikle metoden til Real Time PCR (Higuchi *et al.* 1992). Med RT-PCR var det mulig å detektere akkumulering av ampikon for hver syklus i direkte (real-time) ved bruk av et fluoriserende signal. Dette kombinert med amplifiseringseffektiviteten ga mulighet for kvantifisering av antall mikroorganismer (Kubista *et al.* 2006). Metoden benyttet SYBR® Green som fluoriserende signal. I starten av det 21. århundre kom én qPCR- metode som tok i bruk prober (TaqMan®). Teknikken innebar bruk av to primere og en probe hvor alle tre måtte feste seg til mål-DNAet for at proben skulle avgi signal. Dette gjorde qPCR med prober mer spesifikk en qPCR med SYBR® Green (Wittwer *et al.* 2001; Yu *et al.* 2005).

Ulike fingerprint-metoder som DGGE og Temperatur Gradient Gel elektroforese (TGGE) kan benyttes for å studere et mikrobielt samfunn. Metodene er basert på direkte analyse av PCR produkt og er enten basert på sekvens- lengde polymorfi eller sekvens polymorfi. Dette er generelt en rask metode som kan analysere flere prøver samtidig (Rastogi & Sani 2011).

Sekvensering har i stor grad bidratt til å oppnå større grad av informasjon i et mikrobielt samfunn. Metoden er basert på sammenligning av nukleinsyresammensetning, og krever ikke oppdyrking forhånd.

Sekvenseringsteknikken ble utviklet av F. Sanger på 1960-tallet (Zwolinski 2007) og metoden hadde sitt ”gjennombrudd” på 1990-tallet med konstrueringen av kappilær array elektroforese og relevante delekerings systemer. Det siste 10-året har utviklingen av ”high-throughput sequencing” økt, og flere metoder eksisterer i dag. Eksempler på dette er Roche, 454 pyrosekvensering, Illumina og Solexa. Metodene utkonkurrer Sangersekvensering med en faktor på 100 – 1000 ganger antall avlesinger, samtidig som kostnaden per 1 MB nukleotider er redusert. Metodene har tillatt forskningen til å gå dypere i det mikrobielle samfunnet, og gitt ny informasjon om fylogenetisk sammensetning og funksjonell diversitet (Zwolinski 2007). Sekvensering utføres ved avlesing av korte ”reads” i hypervariable områder(V1-V6) på 16S rRNA genet.



Figur 1.4 Oversikt over alle molekulære metoder tilgjengelig for deteksjon og videre identifisering av komplekse mikrobielle samfunn. Figuren viser en oversikt over metoder for delvis analyse av et samfunn og analyse av hele det mikrobielle samfunnet samtidig (Rastogi & Sani 2011).

1.7 Aktuelle metoder for analyse i forbindelse med biogass

I dette avsnittet omtales aktuelle dyrkningsmetoder og teknikker for analyse av gass og fettsyresammensetning som ble brukt i denne oppgaven.

1.7.1 Dyrkningsmetoder

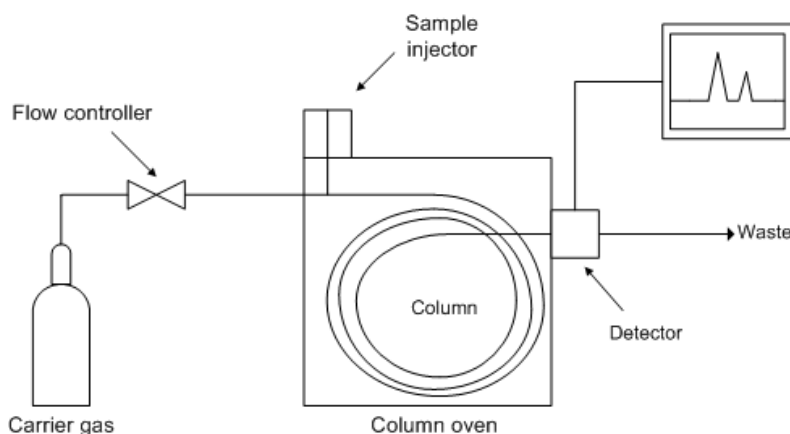
Serumflasker er optimale for dyrkning av organismer i anaerobe miljø. Ved forsegling av flaskene vil det etter kort tid dannes et anaerobt miljø. Flasken forsegles med et septum og en aluminiumskappe. Septumet kan stikkes gjennom mange ganger uten at dette forårsaker lekkasje. I tillegg er dette svært tolerant ovenfor store mengder gass som demonstrert på Figur 2.2.

1.7.2 Gasskromatografi (GC)

En gasskromatograf et instrument for analyse av gass-sammensetningen i en prøve. Prøven vil gå gjennom en kolonne og detekteres av en detektor (Figur 1.5). I kolonnen finnes en mobil og en stasjonær fase. Der den mobile fasen består av en bærerergass som er svært lite reaktiv (helium) eller ikke- reaktiv (nitrogen). Den stasjonære fasen består av et mikroskopisk lag med væske, eller polymerer, tilsatt på en liten reaktiv overflate som laget av metall eller glass (kolonnen). Når bærerergassen sender molekylene gjennom kolonnen vil disse bevege seg i ulik hastighet. Raten på progresjonen av molekylenes bevegelse i kolonnen avhenger av styrken på adsorpsjon, som igjen avhenger av type molekyl og materialet i den stasjonære fasen. Siden molekylene har ulik rate av progresjon, vil de ulike analysekomponentene separeres ettersom de passerer kolonnen og kommer ut i ulike tidsrom. Det er oppholdstiden til ulike forbindelser som gjør GC analysen nyttig til deteksjon av gass-sammensetning.

Deteksjon skjer via en detektor i enden av kolonnen. Av ulike detektorer finnes ikke-selektive detektor som thermal conductivity detector (TCD), og selektive detektorer som flammeioniseringsdetektor (FID) og fotoioniseringsdetektor (PID). FID er sensitiv ovenfor hydrokarboner, og detekterer er som navnet tilsier ioner.

TCD er en kjemisk spesifikk detektor, ofte brukt i væske/fase kromatografi. Detektoren detekterer endringer i den terminale ledningsevnen i kolonnens utløp, og sammenligner denne med referansen til bærerergassen. De fleste forbindelsene har en mye mindre lederevne enn bærerergassen (helium). Når en analytt elueres fra kolonnen vil varme-ledningsevnen i avløpet reduseres, og et detekterbart signal vil dannes. Når analysen er fullført, oppgis resultatet i et kromatogram, i et dataprogram, koblet opp mot kromatografen (Figur 1.5).

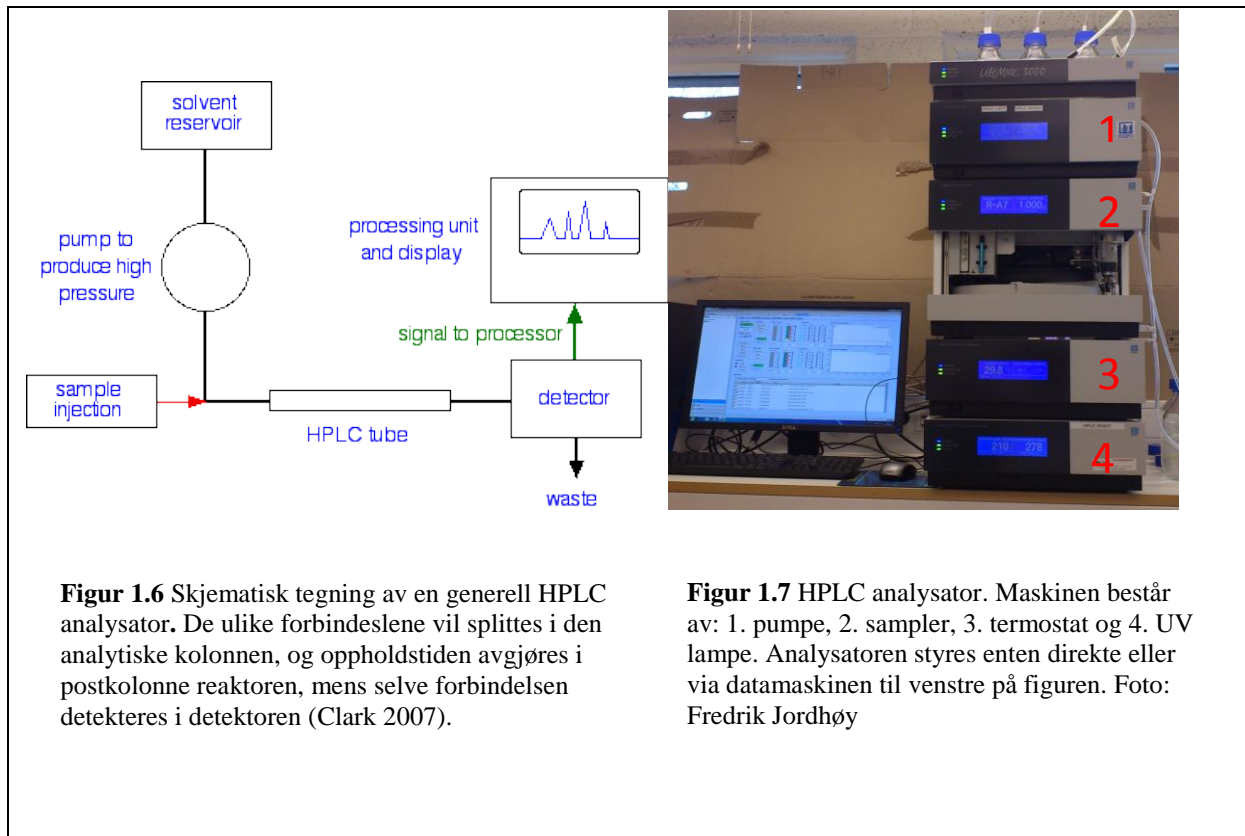


Figur 1.5 Skisse over gasskromatograf og dens funksjon. I en GC blir et kjent volum med gass sprøytet inn i injektoren (Sample injektor). Prøven vil så bli med i kolonnen via en gasstrøm som kalles bærer-gassen (carrier gas). Hvor raskt de ulike forbindelsene i prøven passerer kolonnen avhenger av kjemiske og fysiske egenskaper og ”infraksjoner” i kolonnen kalt den stasjonære fasen. Når gassen forlater kolonnen vil en detektor analysere gassen elektronisk. Oppgaven til den stasjonære fasen er å separere ulike forbindelser, som fører til at de forlater kolonnen i ulike tidsrom. Andre enheter som kan benyttes istedenfor oppholdstid, er trykk, hastighet på bærer-gass, kolonnenlengde og temperatur (Urban 2009).

1.7.3 Høytytelse væskkromatografi (HPLC).

HPLC er et verktøy for separering av forbindelser i en væske og videre analyse av disse forbindelsene. Figur 1.6 viser en skjematisk tegning av et generelt HPLC-system. Ulike HPLC-metoder baseres på relativ polaritet og løsemiddel som benyttes i den stasjonære fasen. En pumpe vil sørge for høyt trykk som fører til at væsken presses gjennom kolonnen. Avhengig av trykk og kjemisk sammensetning vil ulike komponenter komme ut av kolonnen til ulik tid. En detektor vil detektere organiske komponenter ettersom de passerer.

Ved deteksjon av VFA, vil metoden baseres på revers fase kromatografi (mest vanlig å bruke). Denne separerer ulike forbindelser med hensyn på hydrofobisitet, der den stasjonære fasen består av silica med en modifisert overflate. Oppholdstiden vil være lang for ikke-polare forbindelser, og kort for polare forbindelser. Hvor polar eller ikke polar kolonnen er, avgjøres med hvilken forbindelse som tilsettes i kolonnen. En viktig faktor i denne kolonnen er pH, da den påvirker hydrofobisiteten i kolonnen.



1.8 Identifisering ved bruk av molekylære metoder

Dette avsnittet inneholder molekylærbiologiske analysemetoder benyttet i forbindelse med analyse av det mikrobiologiske miljøet i denne oppgaven.

1.8.1 Fluorescence *in situ* hybridisering (FISH)

Prinsippet for metoden er å merke ønsket sekvens med et fluoriserende signal ved først og permabilisere cellen for at proben skal kunne trenge inn og hybridiseres til RNA, samtidig som organismen forblir intakt. I selve FISH prosessen er flere steg viktige for å oppnå godt resultat. Ved fiksering permabiliseres cellene for penetrering av fluorescens inn i cellen. I tillegg beskyttes RNA fra nedbryting av endogene RNAsen. Effektiv fiksering er avgjørende for et tilfredsstillende resultat, men er også vanskeligst å optimalisere. Formamid benyttes i dette steget, og % volum kan ofte være med i en optimaliseringsprosess. Hybridisering må gjøres under bestemte forhold for korrekt hybridisering. Formamid kan bidra til at hybridiseringstemperaturen senkes. Vanlig temperatur ligger mellom 37-50 °C. Hvor lang tid hybridiseringen tar, kan variere mellom 30 min og flere timer. Vasking er viktig for å unngå autofluorescens. Det er også viktig å unngå direkte lys på preparatet som kan føre til eksitasjon av fluorescens og svakere signal ved mikroskopering (Moter & Gobel 2000).

1.8.2 DNA ekstraksjon

Ekstraksjon av DNA frigjør organismens nukleinsyrer. Ekstraherte nukleinsyrer kan brukes til en rekke molekylære teknikker for identifisering, kvantifisering etc. Ekstraksjon innebærer; (1) oppsamling av materialet, (2) knusing av celler (homogenisering) enten fysisk/mekanisk (bead beating), kjemisk (natrium dodesyl sulfat SDS) eller enzymatisk (lysosymer) eller i en kombinasjon av disse (Robe *et al.* 2003).

Det eksisterer ulike prinsipper for selve ekstraheringen. Ved kolonnebasert isolering kan silicapartikler brukes for å binde DNA til et filter. Kolonnen, vil holde på DNAet til forholdene endres, og DNA elueres (Robe *et al.*). Fenol-kloroform benyttes for å danne en to-fase væske, hvor ekstrahert DNA vil ligge i den organiske fasen.

Bruk av magnetiske kuler (magnetic silica particles) er en tredje metode for ekstraksjon av DNA. Ved isolering med magnetiske kuler vil DNA tiltrekkes paramagnetiske kuler. Bruken av magnet vil holde kulene i ro mens væske pipetteres ut og inn av røret. Prinsippet for binding av DNA til paramagnetiske kuler, skjer ved at saltkonsentrasjonen øker drastisk som igjen fører til frigjøring av H₂O, ved at natrium bryter hydrogenbindingen. Natrium fester seg til det negativt ladde oksygenet i H₂O å opptre som et kation. Det negativt ladde oksygenet i fosfatgruppen på DNAet vil trekkes mot kulene, og binding oppstår. Ved å senke saltkonsentrasjonen drastisk i elueringsbufferen vil vann igjen danne binding med magnetiske kuler, og DNA vil elueres.

King Fisher FLEX ekstraksjonsrobot Bakgrunnen for ekstraksjon av med denne metoden er å øke kvaliteten og effektiviteten. Roboten anvender magnetiske kuler for ekstraksjon, men teknologien er basert på å flytte kulene og ikke væsken. Dette kalles Inverse Magnetic Particle Processing (IMPP). For å opprettholde sterile forhold benytter magneten seg av en ”tipplate” som skiftes for hver kjøring.



Figur 1.8 King Fisher FLEX ekstraksjonsrobot. Roboten kan ekstrahere DNA fra opp til 96 prøver á gangen. Kort beskrevet styres roboten med knapper og LCD skjerm til venstre på bildet (1). Hjulet (farget grått) er basen hvor de ulike platene plasseres, og dette beveger på seg ettersom prosessen går (2). Roboten har et deksel, som hindrer kontaminering under kjøring, ved 2-tallet på figuren er ladestasjonen, hvor alle plater settes inn og tas ut. Samling av korte ”stenger”, hevet over basen er magnetene. Magneten holder samme posisjon under hele prosessen (3). I tillegg finnes en beskyttelses plate under magnetene som er med å hindre kontaminering. Plattformen under magnetene har en varmeblokk (4). Under ekstraksjon vil hjulet gå rundt, og ulike buffere plasseres under magnetene i riktig rekkefølge. Foto Fredrik Jordhøy

1.8.3 Polymerase kjede reaksjon (PCR)

PCR består av tre steg; denaturering, hybridisering (annealing) og polymerisering.

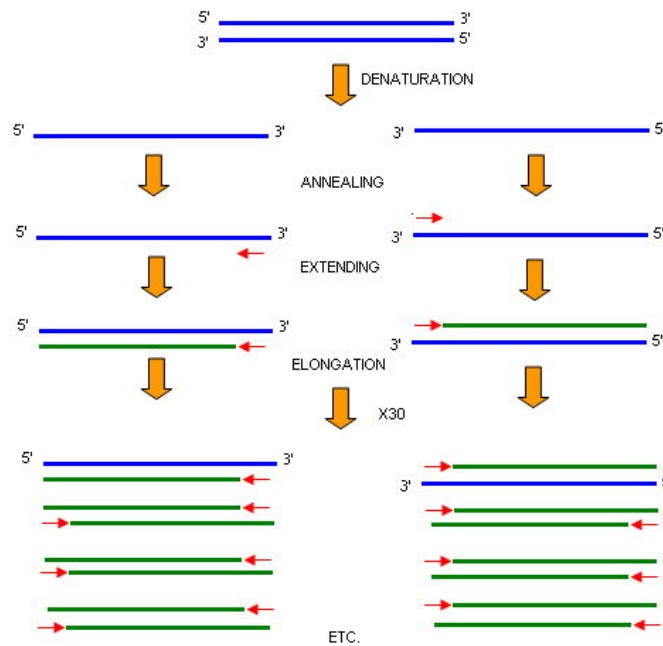
Denaturering skjer ved at dobbeltråden separeres slik at proben/primeren kan binde seg. I hybridiseringssteget binder primeren seg til en av de separerte trådene ved prinsippet

komplimenter baseparring. I polymeriseringssteget vil nukleotider festes ved hjelp av polymerase for å gjøre de to separerte trådene komplette. I hybridiseringssteget benyttes primere som starter i hver sin ende, en forward, og en revers, for å øke antall kopier.

Temperaturen i hybridiseringssteget er et kritisk, og avhengig av størrelsen på primeren (antall bp) og GC-innhold. Temperaturer mellom 55-65 °C benyttes ofte i dette steget.

Polymerasen er et varmestabilt enzym, noe som gjør at tilsetning av nytt enzym for hver syklus ikke er nødvendig. Et bestemt antall sykluser vil gi ønsket konsentrasjon av fragment, men for mange sykluser kan føre til dannelse av primer-dimere. Figur 6 viser en forenklet skisse over en PCR reaksjon.

Primere som benyttes er varierende etter spesifisiteten man ønsker. Binding til ulike områder på 16S rRNA-genet kan bidra til økt eller senket spesifisitet. Spesifisiteten kan være generell for oppformering av en gruppe mikroorganismer eller spesifikk, der kun en art eller slekt oppformerer.



Figur 1.9 Forenklet skisse over en PCR reaksjon med dens tre steg, denaturering, hybridisering og polymerisering. Den blå tråden indikerer starttråden. Ved denaturering deles denne i to. Polymerase vil da amplifisere en primer til tråden (merket grønt). dNTP vil så festet på, for å gjøre tråden komplett og produktet er gått fra 1 til to tråder. Prosessen gjentas så på nytt (Warwik, PCR 2009).

1.8.4 Kvantitativ polymerase kjede reaksjon (qPCR)

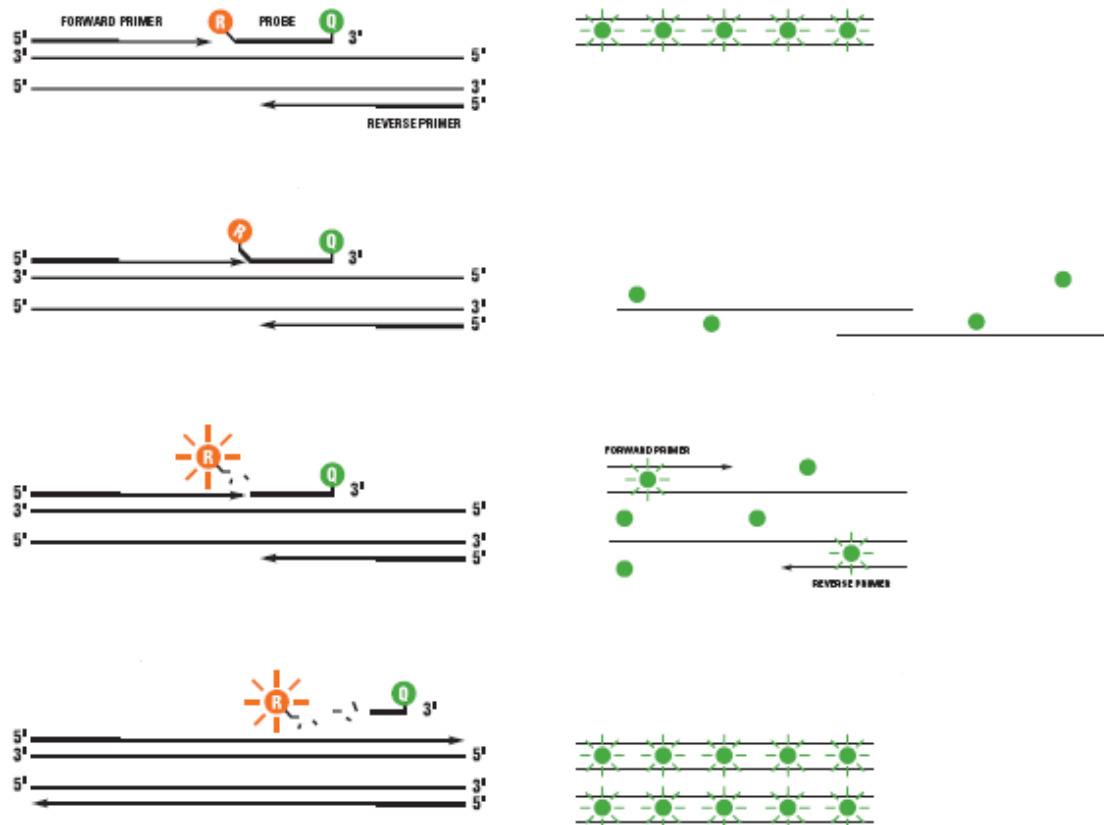
qPCR er et kraftig verktøy for kvantifisering. Grunnen til dette er at metoden har evne til å kvantifisere et startmateriale med minimal konsentrasjon (Heid *et al.* 2008). Et signal må eksistere for kvantifisering av det oppformerte produktet. Signal avgitt av prober eller SYBR® green er oftest brukt (Wittwer *et al.* 2001). Prober (TaqMan®) er utstyrt med fluoriserende signaler -en reporter og en quencher, se Figur 1.10.

Det finnes to typer quencher; (1) FRET vil avgi et fluoriserende signal, og i fravær av quencheren vil dette bli avgitt som lys, (2) proksimale quencher -signalet fanges opp av quencheren og blir avgitt som varme, ikke som fluoriserende signal. Nedbrytning av nuklease i den hybridiserte proben frigjør quenching av FAM fluorescensemisjonen. Dette vil føre til en økende topp i fluorescens emisjon ved 518nm. Signalet detekteres så av et dataprogram (Heid *et al.* 2008).

SYBR® green er et alternativ for deteksjon av fluorescerende signal. Dette er en asymmetrisk cyanin-merking, som ikke er fluoriserende i fri form, men aktiveres ved binding til dobbeltrådet DNA (Kubista *et al.* 2006). Ulikheten mellom probe og SYBR® green er spesifisiteten som er betraktelig høyere ved bruk av probe. Grunnen til dette er at denne krever komplementær binding, mens SYBR® green bindes spesifikk til all dobbeltrådet-DNA.

Terskelverdien (C_T) er antall sykluser som må til for å komme over en terskelverdi, satt manuelt eller ved hjelp av et dataprogram, der fluorescenssignalet blir sterkere enn bakgrunnsstøyen. C_T -verdien beskriver hvor mange sykluser som må til for å få et signal (Kubista et al. 2006; Yu et al. 2005), og er faktoren for kvantifisering. Dette tilsier at lav verdi tyder på store mengder DNA i prøven, som gjør at amplifisering skjer raskere. Ved høy C_T -verdi vil det motsatte inntreffe, altså lav konsentrasjon.

Kvantifisering kan skje ved å benytte en ekstern kontroll/standardkurve, eller ved bruk av intern kontroll. Ved bruk av standardkurve, vil absolutt kvantifisering skje via standardkurven, som er basert på en fortynningsrekke. Ved bruk av intern kontroll vil måling skje separat fra prøvene.



Figur 1.10 TaqMan® probe og SYBR® Green. Figuren illustrerer bruk av TaqMan (høyre) og SYBR® Green I (venstre) i qPCR. TaqMan® er utstyrt med reporter R og quencher Q. Når proben er intakt, blir emisjonen dempet av Q. Under forlengelsen av syklusen vil DNA polymerasen kløyve reportermerket fra Q. Når R separeres fra Q vil den avgi et fluoriserende signal. Når SYBR green I er bundet til dobbeltrådet DNA vil det avgi et fluoriserende signal. Når DNA denatureres vil dette signalet reduseres kraftig. Ved dannelse av PCR produkt, og polymeriseringen blir komplett, vil SYBR® Green igjen binde seg og avgi et signal. Dette signalet øker proporsjonalt med antall produkt dannet. Figur endret av F. Jordhøy hentet fra (*TaqMan® and SYBR® Green AB 2011*).

1.8.5 Kvantifisering av PCR produkt

PicoGreen® benyttes for kvantifisering av DNA-konsentrasjon. Den mest brukte teknikken for kvantifisering av DNA er absorpsjon av nukleinsyrer ved 260nm. Forstyrrelser og ulemper kan være tilstedeværelse av enkelttrådet DNA og nukleotider. Dette vil ha en innvirkning på resultatet. Ved å bruke PicoGreen® vil dette minske drastisk, og kvantifisering av dobbeltrådet DNA i prøvene vil skje uten særlig grad av påvirkning fra RNA og enkelttrådet DNA.

Årsaken til dette er at PicoGreen® skal være selektiv for dobbeltrådet DNA. Ved binding av PicoGreen® vil fluorescens øke 100 ganger proporsjonalt med DNA-mengden som er tilstede i blandingen(kilde). PicoGreen® er meget sensitiv og kan måle DNA-konsentrasjoner helt ned til 500pg/ml i et 2ml volum. Grunnen til at PicoGreen® er sensitiv, er dens evnen til å binde seg til både til store polymere DNA-kompleks, men også til små duplekse DNA biter <20bp (kilde).

1.8.6 Sangersekvensering

Sangersekvensering baserer seg på metoden revers- trådsyntese. Her benyttes en kjent sekvens oppstrøms for sekvensen man ønsker å identifisere, sammen med en blanding av dNTP og ddNTP. ddNTP er en modifisert nukleotid som mangler hydroksylgruppen i det tredje karbonet på sukkermolekylet. Disse nukleotidene (dNTP/ddNTP) vil forårsake tilfeldig ikke-reversibel terminering av forlengingen av fragmentet. Nukleotider vil ikke la seg binde på grunn av den manglende OH gruppen. Termineringen vil skape fragment med varierte sekvens- lengder. Dette etterfølges av denaturering og opprensing av frie nukleotider, enzymer og primere. Molekylene sorteres så etter molekylvekt (samsvarer med tid for terminering) Merket festet til ddNTPen avleses sekvensielt i et sorteringssteg (Kircher & Kelso 2010).

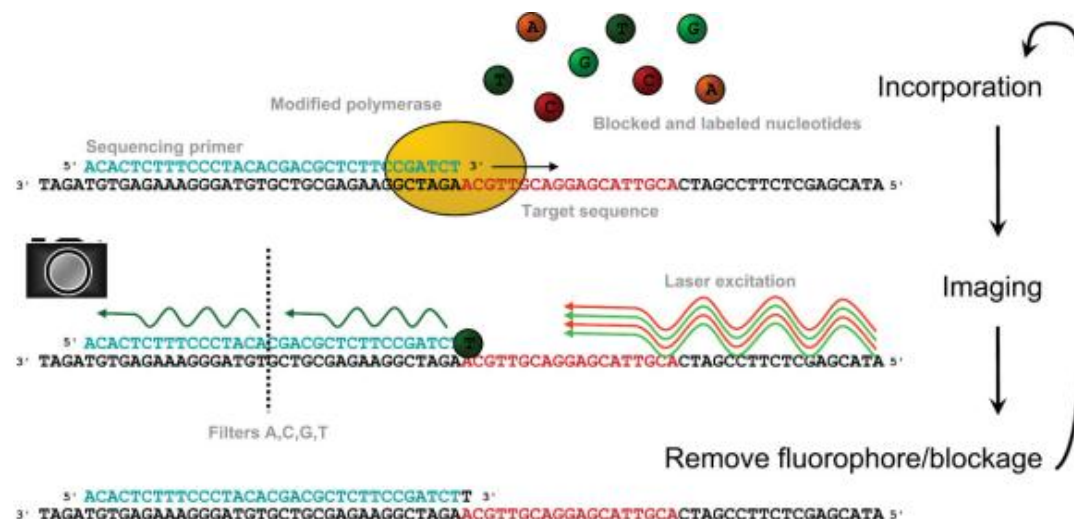
Sorteringen skjer ved hjelp av kappeler gelelektroforese. Merket som er festet til terminatorene er et fluoriserende signal, og inneholder fire ulike farger, en for hver nukleotid (A,T,C og G).

Ved sekvensering vil feil kunne oppstå. I Sangersekvensering er feil observert ved; feil i amplifiseringssteget, naturlig variasjon og kontaminering av prøven. Andre ting som at polymerasen ”glipper” ved lav komplekse sekvenser eller homopolymerer kan forekomme. Til tross for at feil kan oppstå, er feilraten ved Sangersekvensering svært lav med feil per 10 000- 100 000 avleste nukleotid (Kircher & Kelso 2010).

1.8.7 «Next generation» Illumina sekvensering

Illumina-sekvensering er en av de nyeste high throughput «next-generation» sekvenseringsmetodene som har kommet ut. Dette er et rimeligere alternativ for 454-pyrosekvensering, men har til gjengjeld et mye kortere avlesningsfelt på ca. 100 bp. En ny metode er imidlertid utviklet, Illumina MiSeq, som har en avlesningsfelt på 150 bp. Maskinen kan kjøre et run på 7 timer og har en kapasitet på 7 GB per «run».

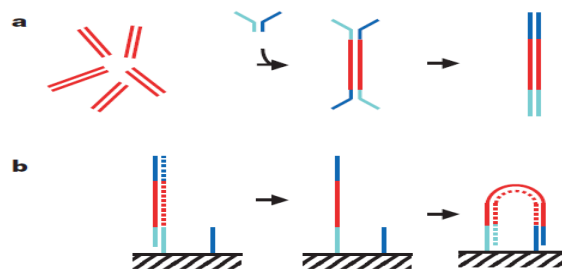
Før sekvenseringen kreves et opprensingssteg der overflødig polymerase, og dNTP fjernes. Prinsippet for Illumina kalles revers terminator teknologi. Denne teknologien benytter et sekvenseringssyntesekonsept (sekvensering ved syntese) som ligner på det benyttet i Sangersekvensering, hvor inkorporeringsreaksjonen stoppes etter hver base. Merking av den inkorporerte basen avleses med fluorescensmerke. Sekvenseringsreaksjonen fortsetter deretter med inkorporering av neste base (Figur 1.11).



Figur 1.11 Skisse over Illumina sekvensering. Etter hvert som den spesiallagde polymerasen følger templatet, vil en komplimenter oligonukleotid feste seg, dette vil avgi et fluoriserende signal, med fra basens tilhørende farge. Dette blir så avbildet. Den reversible terminatoren kan så fjernes og hele prosessen vil så gå på nytt til ca 100 bp er fotografert (Kircher & Kelso 2010).

Illuminasekvensering krever at sekvensen som skal bestemmes konverteres inn i spesifikke sekvensbibliotek som tillater dem å bli amplifisert og immobilisert før sekvensering. Dette skjer ved at to ulike adaptore tilsettes til 5' og 3' ende av alle molekyler, ved å benytte liggerende såkalte "gaffel-adaptore" (Figur 1.12). Biblioteket amplifiseres deretter ved bruk av forlengingsprimere, som forlenger og gjør adapterer mer diverse. Dette for å danne de endelige sekvensene som trengs for sub-sekvensering. Biblioteket, bestående av dobbeltrådet DNA smeltes ved bruk av natrium-hydroksid for å oppnå enkeltrådet DNA, som pumpes ved lav konsentrasjon gjennom en kanal i "flytcellen". Disse "flytcellene" har to populasjoner av immobiliserte oligonukleotider på overflaten, som er komplementære til de to enkeltrådet

adapterendene i sekvensbiblioteket. Disse oligonukleotidene hybridiseres til enkeltrådet bibliotekmolekylene.



Figur 1.12 Modifisering og broamplifisering. A: modifisering av primere kreves før Illuminasekvensering. Dette skjer ved ligering av to adaptere til primeren, en på hver side. B: broamplifisering skjer ved at tråden bøyer seg og bindes kovalent til adapterets komplementære oligonukleotide i flytcellen. Dette initierer hybridisering, merket som en stiplet linje (Bentley *et al.* 2008).

Ved revers ”trådsyntese”, vil den nyhybridiserte tråden kovalent bindes til flytcellen. Hvis denne tråden igjen bøyer seg til en annen oligonukleotid, komplementær til det andre adapteret i den frie enden av tråden, vil dette danne et sekundært kovalent bånd. Denne bøyingen og revers ”trådsyntese” kalles broamplifisering, og repeteres flere ganger. Noe som skaper clusterer med mange 1000 kopier av det originale templatet. Disse tilfeldig fordelte clusterne inneholder molekyler som representerer både F- og R-tråden av den originale sekvensen. Før sekvensen bestemmes må en av tråden fjernes for å hindre at forlengelse skjer sterisk, eller ved komplementær baseparing. Tråder kløves selektivt ved basemodifikasjon av oligonukleotider i flytcellen. Etter fjerning av den ene tråden vil alle clusterer inneholde enkeltråder, som er identiske orienterte kopier av samme sekvens. Disse kan sekvenseres ved å hybridisere sekvenseringsprimer inn i de adapterte sekvensene, og for å starte revers terminator kjemi.

Illumina er en effektiv metode, men ved bruk av modifiserte polymeraser og reversible terminatorer substitusjon har feil blitt oppdaget i avlesing av sekvens. Illumina-bibliotek og flytcellepreparering, inkludert flere *in vitro* amplifiseringssteg, som kan øke bakgrunnsfeilraten til $10^{-2} - 10^{-3}$. Som andre plattformer øker feilraten med økt posisjon av bestemte sekvenser. Dette er i hovedsak på grunn av ”phasing” som øker bakgrunnsstøy når sekvensen utvikler seg.

1.9 Målet med oppgaven

Mangel på kunnskap og få publiserte artikler rundt utvikling og beskrivelse av det mikrobielle samfunnet i anaerob nedbryting ved produksjon av biogass, var bakgrunn for planlegging og gjennomføring av denne oppgave.

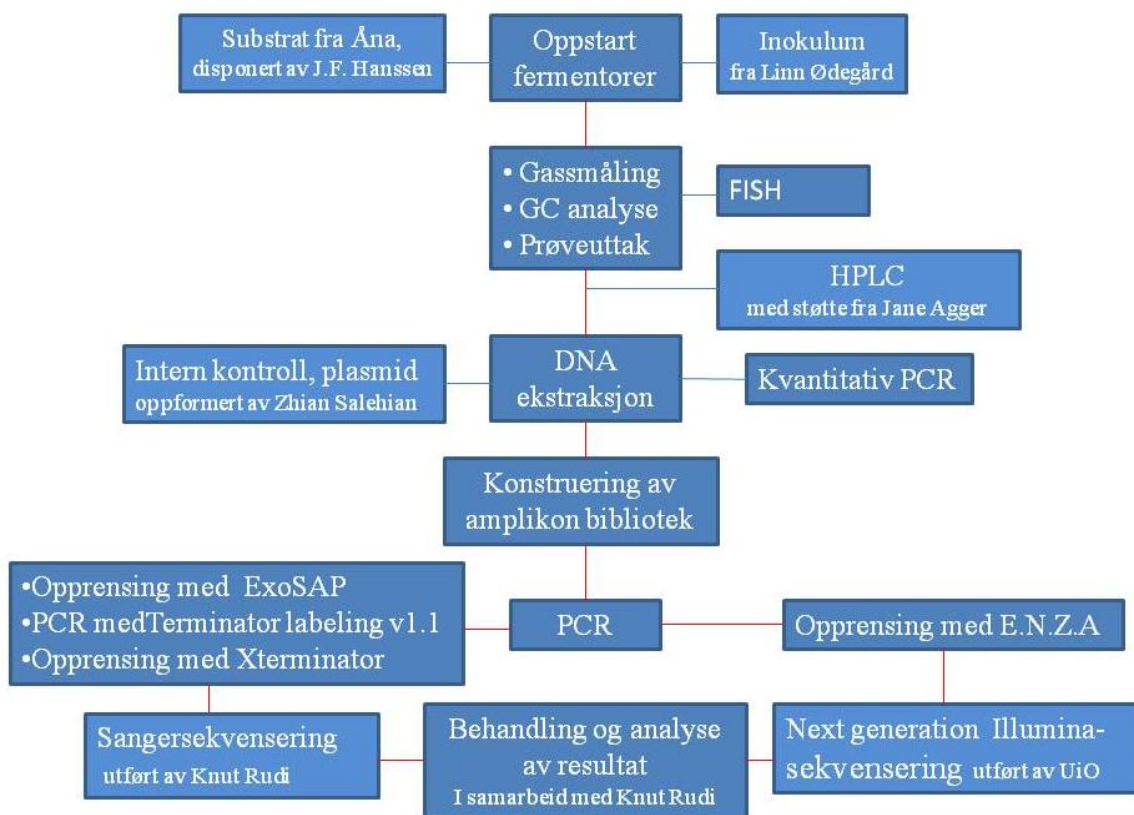
Hovedmålet med oppgaven var å få et innsyn i det mikrobielle samfunnet i laboratorieskala biogassreaktorer med substrat fra fiskeensilasje og storfegjødsel, ved Illumina sekvensering. Hvor målet var å se hvilke grupper av archaea og bakterier som hadde størst grad av dominans. Ved å gjennomføre en dybdesekvensering ville dette både gi et dypere innsyn i det mikrobielle samfunnet, samt det ville gi kunnskap i de mest moderne metodene som benyttes for analyse og studering av komplekse mikrobiologiske miljø.

Som delmål ville oppgaven se på gassproduksjon og analysere innhold av CH₄ og CO₂ i produsert gass. Forsøke å se på forhold mellom forekomst av archaea og bakterier ved bruk av qPCR og FISH, se på mikroorganismenes utvikling over tid, samt gjennomføre en direkte sekvensering for å oppnå et enda større innsyn i det mikrobielle samfunnet og se om disse resultatene samsvarte med resultat fra Illuminasekvensering.

2 Materialer og metoder

2.1 Rammene rundt prosjektet

Hovedrammen for oppgaven var å kombinere mikrobiologisk og molekylære metoder. Da det er benyttet mange ulike metoder er det laget et flytskjema for å gi en sammenhengende oversikt over hvordan hele oppgaven er blitt gjennomført (Figur 2.1).



Figur 2.1 Flytskjema for masteroppgaven. Skjemaet inneholder alle forsøk som ble gjennomført i oppgaven. Røde linjer angir hovedgangen eller hoveddelen i forsøket mens blå linjer viser ulike delforsøk. Alle bokser med en lysere blåfarge indikerer hvor andre enn undertegnede har hjulpet til eller utført forsøket. En kort forklaring av flytskjemaet er gitt i teksten under.

Oppgaven startet med oppstart av fermentorer hvor substrat og inokulum ble blandet i ulike konsentrasjoner. Forsøket gikk over 101 dager, der fermentorene ble kontrollert i 30 dager ved måling av gassproduksjon, GC analyse, samt utføring av FISH og prøveuttak. Prøveuttak, GC og gassmåling ble utført annen hver dag i hele perioden, mens FISH ble utført en gang per 7. dag. Etter 30 dager ble kun gassmåling og GC utført. Alle prøver ble ekstrahert i samme tidsperiode. Annenhver prøve fikk tilsatt et plasmid for kontroll av ekstraksjonen. qPCR ble

kjørt med primer og prober. Primere var konstruert for amplifisering av prokaryote og archaea, samt 2 prober for ulike grupper metanogener.

Før PCR, ble et amplikonbibliotek konstruert for bruk i Illuminasekvensering. Etter PCR ble det foretatt en opprensingsprosess med E.Z.N.A.TM Cycle Pure Kit, før Illuminasekvensering (UiO). Før Sangersekvensering (K. Rudi) ble det gjennomført en opprensing (ExoSAP) en sekvenserings PCR (Terminator labeling v1.1) og en ny opprensing. Analyse av sekvenseringsresultatene ble gjort med ulike analyseverktøy på datamaskin. Av andre kromatograf metoder foruten GC, ble HPLC gjennomført av start, midt og sluttkultur for analyse av VFA ved ulike tidspunkt i prosessen.

Under følger en beskrivelse av alle metoder benyttet i oppgaven. For DNA ekstraksjon ble metodetesting og optimalisering gjort som en del av forsøket. Metodene som ble utprøvd, men ikke brukt i oppgaven, er heller ikke nevnt, i denne seksjonen (kan ses i vedlegg 3). En komplett liste over alt utstyr kan ses i vedlegg 1.

2.2 Mikrobiologiske metoder

2.2.1 Oppsett og oppstart reaktorer

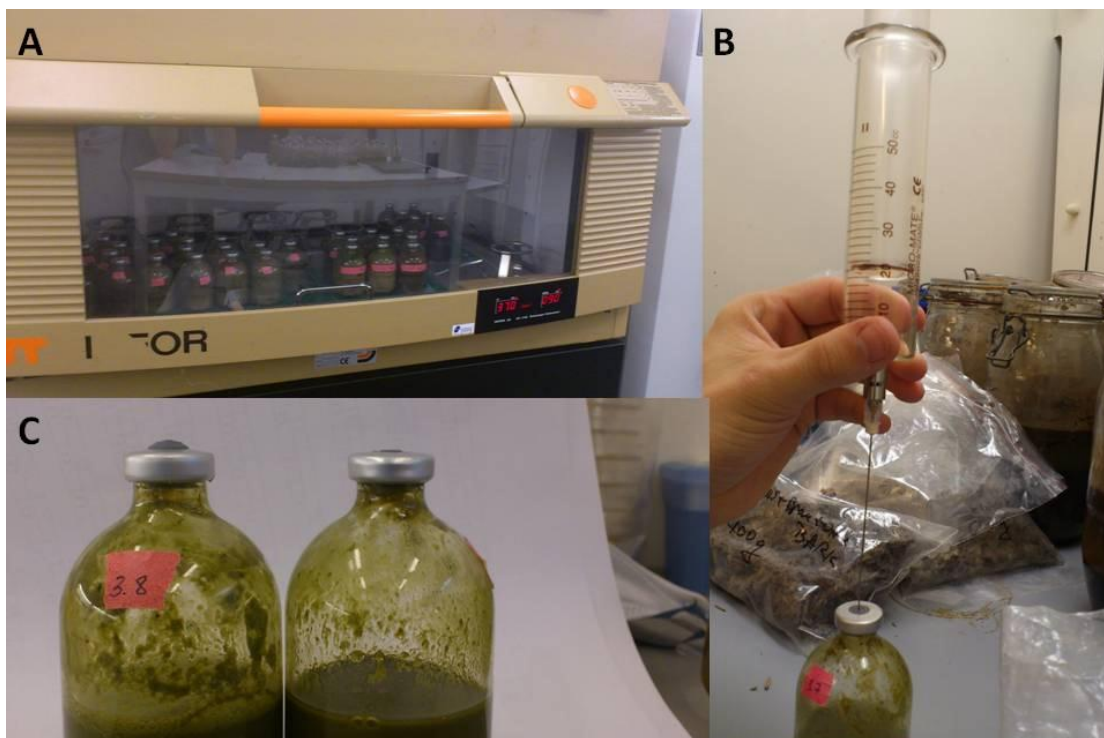
Reaktorer ble tilsatt substrat av fiskeensilasje (FE) og storfegjødsel (CM) i ulike blandingsforhold. Som inokulum ble en biorest bestående av storfegjødsel og fiskeensilasje (ukjent konsentrasjon) anvendt. Substratet ble hentet fra et kjølelager (4 °C) fra Åna biogassanlegg (oktober 2010). For hver blanding ble 8 paralleller satt opp, tre paralleller til prøveuttak og fem reaktorer som kontrollreaktorer (kontroll på mikrobefunn i åpne og uåpne reaktorer). De fire blandinger som ble benyttet i forsøket var som følger:

- 20/30:** 33,33 % CM og 50 % FE
- 30/20:** 50 % CM og 33,33 % FE
- 40/10:** 66,67 % CM og 16,76 % FE
- 50/0:** 83 % CM
- INOK:** 16,67 % (alle reaktorer)

Før oppstart ble storfegjødsel homogenisert med en blender (Waring), for å fjerne store partikler. Substratene ble blandet i forskjellige konsentrasjoner som var bestemt på forhånd. Ensilering gjorde fiskeensilasjen sur (lav pH), noe som skapte stor gassdannelse ved blanding med storfegjødsel. For å unngå dette, ble blanding foretatt veldig langsom. I tillegg ble den ferdige blandingen overført mellom to begerglass for å fjerne gass og skum. pH i blandingen

ble målt, og eksakt volum (60ml), målt opp i målesylindre og tømmt over på 120 ml serumsflasker (Grace). Flaskene (fra nå av reaktorer) ble så forseglet med membran septum og aluminiumskappe som vist på Figur 2.2 og Figur 2.3. Reaktorene ble satt til inkubering ved 37 °C og omrøring ved 90 RPM (CH4103, Infor HT) (Figur 2.2).

Hovedforsøket ble satt i gang 15. september 2011, og avsluttet 24. februar 2012. Frem til 15. desember ble gassmålinger, GC analyse og prøveuttak gjort annenhver dag i hele perioden. Analyse ved bruk av FISH ble utført 4 ganger (1 gang per uke i perioden 15.11-15.12). pH ble målt samtidig som uttak til FISH; pH målt med pH strips. Prøveuttak til sekvensering ble utført likt med gass og GC måling. Etter 15. desember ble prøveuttak avsluttet, men måling av gassproduksjon ble utført frem til 24.2.12. I perioden mellom 15. desember og 24. februar var det ingen bestemte tidsintervaller for gassmåling. Fra 20.1.2012 ble GC analyse utført hver fredag frem til forsøket ble avsluttet. Prøvematerialet ble frosset ned etter 0 dager (startkultur) 59 dager (midtkultur) og 101 dager (sluttkultur), for HPLC analyse av fettsyrer.



Figur 2.2 Inkubator for fermentorer, gassmåling og septum toleranse. (A) Alle fermentorer ble inkubert ved 37 °C med omrøring på 90 RPM. (B) Måling av gassproduksjon med glassprøyte utført i et avtrekkskap. (C) Bilde demonstrerer toleransen til et septum, og viser hvor mye gass som kunne produseres uten at lekkasje oppsto, eller at septumet sprakk. Foto Fredrik Jordhøy

2.2.2 Beregning VS, TS og Spesifikk gassproduksjon

Ved oppstart av reaktorer ble TS og VS beregnet av prøvematerialet, for deretter å kunne beregne spesifikk gassproduksjon av blandingen.

TS (tørrstoff) defineres som tørrstoffmengden til materialet, mens VS (volatile solids) defineres som innhold av organisktørrstoff i materialet. TS beregnes ved at et kjent volum settes i varmeskap (100 °C) i 24 timer. Beholderen med blandingen veies før og etter, og TS beregnes som vist i ligningen.

$$\text{Total solids \%} = \frac{(\text{Brutto TS-tara})}{(\text{Brutto våtprøve-tara})} \times 100 \%$$

Brutto TS: vekt av skål + tørket prøve i gram

Tara: vekt av skål i gram

Brutto våtprøve: vekt av skål + våtprøve i gram

VS beregnes ved å ta beholderen med tørrstoffprøven og sette denne i en glødeovn på 500 °C i 24 timer. Etter 24 timer veies den resterende asken, og VS kan beregnes som gitt under:

$$\text{Volatile slides \%} = \frac{(\text{Brutto TS-Brutto askeprøve})}{(\text{Brutto TS-tara})} \times 100 \%$$

Brutto TS: vekt av skål + tørket prøve i gram

Tara: vekt av skål i gram

Brutto askeprøve: vekt av skål + aske i gram

Spesifikk gassproduksjon beregnes ut fra innhold VS i reaktoren og mengde gass produsert. Dette er gitt i formelen under. Spesifikk gassproduksjon er mengde gass produsert (m³), for hver kg substrat tilsatt.

$$\frac{\left(\frac{\text{Akkumulert gass (ml)}}{\text{Total g VS (g)}} \right)}{1000} = \text{Spesifikk gassproduksjon} \left(\text{m}^3 / \text{kg VS} \right)$$

2.2.3 Gassmåling fra reaktorene

Gassuttak ble utført for beregning av akkumulert gass i reaktorene. Gassproduksjon kan gi en indikasjon på metabolsk aktivitet, der gass vil være sluttproduktet i prosessen. Men kan også være med å fortelle hvor bra substrat er, ved å se på mengde gass som produseres.

Gass ble målt ved å sette en kanyle ned i membranen (Figur 2.2), deretter avlese mengde gass produsert i ml. Hvis mengde gass oversteg maksimumsvolumet i sprøyten, ble den målt i flere omganger. I første del av forsøket (20 dager) ble plastiksprøyter (Plastipak) med tre ulike volum (10, 30 og 60 ml) benyttet. I andre del av forsøket ble en glassprøyte (Interchang eable) benyttet. Reaktorene ble forsøkt målt ved samme temperatur (37 °C).

2.2.4 Prøveuttak fra reaktorene

Prøveuttak ble gjort av tre paralleller for hver blanding. Uttaket ble gjort ved 37 °C, for å unngå undertrykk i flaskene og innsug av oksygen. Fra hver parallell ble 0,5 ml prøve tatt ut, pelletert ned (7 min ved 13400 RPM) og lagret ved -80 °C. Etter prøveuttak ble nytt septum og aluminiumskappe satt på. Deretter ble alle flaskene flushet med 100 % nitrogengass (N₂) for evakuering av oksygen, og opprettholdelse av anaerobt miljø. Ved flushing ble to kanyler (BD Microlance™ 3) satt ned i membranen, hvorav en kanyle hadde en inngående strøm av N₂ og den andre ledet gass ut av reaktoren. Ved å sette kanylen med inngående gass lenger ned enn kanylen med utgående gass, var hensikten å sørge for at N₂ la seg nederst, mens O₂ da ville bli tvunget ut via kanylen med utgående gass (Figur 2.3).



Figur 2.3 Reaktor benyttet i forsøket. Figuren viser en skisse over reaktorene som ble benyttet i (serumflasker 120 ml). Flaskene til høyre viser serumflasken med septum (lysegrå) og aluminiumskappe (mørkegrå). Til venstre demonstreres evakuering av, hvor kanyle merket rødt har en inngående strøm av N₂, og kanyle merket blå, fører gass ut av flasken. Figur laget av Fredrik Jordhøy

2.2.5 Beregning av antall organismer i reaktorer, totaltall

Totaltall ble benyttet for beregning av antall mikroorganismer i en reaktor ved bruk av et vekstmedium favorisert for vekst av metanogener. Hensikten var å studere total antall mikroorganismer som forekom i bioreaktoren. Metoden er basert på (Noble & Fuhrman 1998)

Prosedyre

I korte trekk ble prosedyren utført ved og filtrerer prøver ved bruk av Andisk filter (Wathman) (0,2µm). Før prøve ble tilsatt, ble filterene vasket med milliQ. Når filterene var frie for vann ble fortyninger av reaktorprøvene satt på filterene. En brønn ble benyttet som negativ kontroll og fikk tilsatt milliQ. Etter filtrering ble filteret farget med SYBR® Green (10 X) avsatt på filteret i en petriskål (mørkerom, i 20 min). Etter farging ble filteret overført til en ny petriskål og tørket ved 40 °C i 12 timer. Beregning av total antall ble gjort ved å ta gjennomsnitt av

antall organismer observert i en B-C-Z rute multiplisert med omregningsfaktoren for B-C-Z ruten dividert på mengde reaktormaterialet tilsatt på filteret. Gjennomsnitt antall mikroorganismer ble beregnet fra 30 tellinger; omregningsfaktoren tok hensyn til B-C-Z rutens areal i forhold til filteret areal. Mikroskopering ble gjort med et epifluorescens mikroskop (100 X objektiv, PL fluotar). For å opprettholde et sterkt signal over lengre tid ble monteringsløsning (1:1 PBS buffer og glyserol og 0,01 % p-phenylendiamine PPD) tilsatt før mikroskopering ble satt i gang.

2.3 Kjemiske analysemetoder

2.3.1 Gass kromatograf (GC) for beregning av % CH₄ og CO₂

Prosedyre

Gass kromatografen ble anvendt for analyse av andel CO₂ og CH₄ i en prøve. Analysatoren (Autosystem, Perkin elmer) hadde en kolonnetemperatur på 60 °C, deteksjonstemperatur på 250 °C, injeksjonstemperatur på 200 °C og en kolonnestørrelse på 6,35mm (ytre) og 3,175mm (indre). Bæregass for TCD var helium klasse 5 og for FID oksygen og hydrogen. En standard (60,6 % CH₄, 34,5 % CO₂, YARA) ble i løpet av et ”run” kjørt 4 ganger totalt. Hver prøve ble initiert med en glassprøyte (A2, Pressure lok®) Resultat av prøvene ble oppgitt i et dataprogram (Turbochrom Navigator), knyttet opp mot GC maskinen. Maskinen oppga arealet under kurven på hver enkelt forbindelse. Ved å sammenligne dette arealet opp mot kjent areal fra standard kunne % innhold av CO₂ og CH₄ beregnes som anvist under.

$$\frac{\text{Kjent prosent} \times \text{ukjent areal}}{\text{Kjent areal}} = \% \text{ metan i prøven}$$

Hvor ukjent areal er arealet under kurven på den ukjente prøven; kjent prosent er prosent innhold av gassen i standarden og kjent areal er areal under kurven for standarden analysert på GC. Prosent metan ble omregnet til ml metan:

$$\% \text{ metan} \times \text{mengde målt gass (ml)} / 100 = \text{ml metan}$$

% metan ble beregnet ut fra GC målinger og mengde gass målt. Mengde gass målt = antall ml gass målt samme dag som GC ble utført. Akkumulert metan (ml) ble beregnet, og spesifikk

metanproduksjon ble beregnet med samme ligning for beregning av spesifikk gassproduksjon beskrevet i avsnitt 2.2.2.

2.3.2 Høy ytelse væskechromatografi HPLC, for analyse av VFA

HPLC ble brukt for analyse av mengde VFA tilstede i reaktorer med ulike blandinger. Hele metoden er basert på følgende protokoll: *HPLC analysis of VFAs and HMF Standard operational Procedure*, J. Agger; 2012 Analysen ble utført ved bruk av Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific), deteksjon med UV ved 210nm og et trykk på 140 bar.

Prosedyre

Prøvene ble sentrifugert ved maksimum hastighet. Væskefasen ble overført til nytt eppendorfrør og sentrifugert på nytt ved maksimum hastighet. Etter sentrifugering ble en et lite volum pipettert ut, og tilsatt svovelsyre (72 %) i et forhold 1:100 med syre:prøve. Prøvene ble inkubert i noen minutt ved RT og sentrifugert på nytt ved maksimum hastighet. En partikkelfri væske ble pipettert over i HPLC rør og analysert. Kalibrering ble gjort med kjente syrer med ulik konsentrasjon. Prøver ble avlest automatisk og resultat vist i et dataprogram (Chromeleon, Thermo Scientific) tilknyttet HPLC maskinen.

2.4 Molekylære metoder

2.4.1 Fluorescens *in situ* hybridisering FISH

FISH ble brukt for kvantifisering og identifisering av arker og bakterier ved bruk av fluoriserende prober og fluorescensmikroskop. Protokollen er utviklet av blant annet Jon Fredrik Hanssen og basert på (Giovannoni *et al.* 1988) og (Bomo *et al.* 2004).

Tabell 2.1 Spesifikasjoner for primere benyttet i FISH. Oversikten inneholder primere benyttet ved metodetesting og under hovedforsøket.

Navn	Målgruppe	Sekvens (5'→3')	T _m (°C)	Amplikon størrelse	Referanse
AERO	<i>Aeromonas sp</i>	CTA-CTT-TCC-CGC-TGC-CGC	60,0		(Tay <i>et al.</i> 2001)
ARC915	Archaea	TGC-TCC-CCC-GCC-AAT-TCC-T	62,0		
EUB338	Bakterier	CTG-CCT-CCC-GTA-GGA-GT	56,0		

Prosedyre

Før cellefiksering ble 500µl prøve tatt ut og fortynnet i 10 ml vann. Etter 2-3 min ble 1ml fra toppsjiktet overført til et nytt rør i et forsøk på å unngå store mengder bakgrunnsstøy.

Cellefiksering

Prøvene ble pelletert ved sentrifugering med maksimums hastighet. Supernatant ble fjernet og prøvene fiksert med 3 % paraformaldehyd (4 °C i 3 timer). Etter fiksering ble prøvene på nytt pelletert ved sentrifugering (maksimums hastighet), og supernatant fjernet. Pelleten ble deretter resuspendert i 1 ml 1:1 mengde med 1xPBS og 96 % etanol, og enten benyttet direkte eller lagret ved -20 °C.

Hybridisering

Prøver ble pipettert på en "slide" og tørket ved 37 °C og deretter dehydrert i etanol (50, 80 og 96 %). Oligonukleotide løsning ble laget av probe (20mM) blandet med hybridiseringsbuffer (formamid 35 %, NaCl 0,9M, Tris pH 7.2, 29mM og SDS 0,01 % i et total volum på 1ml), og tilsatt samtlige prøver. Preparatet ble lagt i et fuktammer (lysfritt rør med resterende hybridiseringsbuffer) og hybridisert ved 46 °C. Ved endt hybridisering (3t) ble preparatet vasket med vaskebuffer (NaCl 40mM, Tris pH 7.2 20mM, EDTA 5mM, SDS 10 % i et totalvolum på 50ml) som på forhånd var varmet opp. Etter vask, ble overflødig buffer fjernet med milliQ og preparatet tørket før bruk eller lagring (-20 °C). Preparatet ble mikroskopert ved bruk av et konfokalmikroskop (Zeiss 518F), med laser deteksjon av fluorescens. For å dekke hele sliden ble et stort dekkglass (55 x 25mm) brukt. Preparatet ble studert ved 63X okulalet, Immersol™ ble anvendt for å oppnå ønsket lysbryting. Monteringsløsning ((1:1 PBS buffer og glyserol og 0,01 % p-phenylendiamine PPD.), ble brukt for å opprettholde et godt signal.

2.4.2 DNA ekstraksjon

DNA ekstraksjon ble gjort for isolering av genomisk DNA, for videre bruk i qPCR og sekvensering. Under utprøving av ulike ekstraksjonsmetoder ble tre metoder benyttet, GA Stool Bacteria DNA extraction (magnetiske kuler), FastDNA® SPIN for Soil Kit (MP biomedical)(kolonnebasert) og MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit *Bead-Based Sample Disruption*(Ambion, Inc)(magnetiske kuler). Metodene ble prøvd ut på to ulike dyrkingsmedier, favorisert for vekst av metanogener. Ett dyrkingsmedium er kun blitt kalt standardmediet for vekst av metanogener og er hentet fra (Cooney *et al.* 2007) det andre er kalt Barkermediet og hentet fra (Atlas 1993), se vedlegg 3.

Prosedyre for MagMAX™ Nucleic Acid Isolation Kit Bead-Based Sample Disruption

Protokollen benyttet for denne metoden kan leses i vedlegg 2. Endringer og valg som ble gjort i forhold til opprinnelig protokoll er gitt under.

- Under punkt "Sample Disruption" ble metode for "Solid Samples"(B.I.) brukt. 1ml PBS ble tilsatt til hver prøve, og homogenisert ved risting i 2-3 minutter.
- Under punkt *Bead-beat* ble prosedyren for FastPrep®-24 instrument benyttet. (speed: 6,5m/s i 2 x 1min, med 5 minutt hvile mellom hver runde).
- Det ble bestemt et elueringsvolum på 50µl.
- Sentrifuge hastigheter ble oppgitt i G-krefter. Alle sentrifuger på laboratoriet oppga hastighet i RPM. Derfor ble RPM for følgende hastigheter ble benyttet: $100 \times g = 1500 \text{ RPM}$ $16\,000 \times g = 13\,400 \text{ RPM}$ (maksimum RPM for sentrifugen).
- For hvert "run" ble det inkludert en negativ kontroll (milliQ), for kontroll av kontaminering
- For hver ekstraksjon ble det kjørt duplikater av hver prøve hvorav ett av duplikatene fikk tilsatt en intern kontroll (plasmid) med kjent konsentrasjon (1,7ng i ekstraksjonsprøver for å oppnå en konsentrasjon på 0,017ng i qPCR).
- Ved DNA ekstraksjon ble en King Fisher FLEX (Thermo Scientific) ekstraheringsrobot anvendt (Figur 1.8). Roboten ble tatt i bruk for å effektivisere ekstraheringsprosessen, og hadde en kapasitet på 96 prøver per kjøring. Ønsket program ble forhåndsprogrammert på en datamaskin koblet opp mot roboten. Før ekstraksjon måtte prøver på forhånd homogeniseres, og alle buffere tilsettes i separate plater.

2.4.3 Kvantitativ polymerase kjede reaksjon qPCR

qPCR ble benyttet for en (relativ) kvantifisering av raten mellom antall bakterier og antall arker i reaktoren. Kvantifisering kan skje ved bruk SYBR® green eller prober som reportermolekyl. Proben er mer spesifikk, men er noe vanskeligere å bruke, mens SYBR® green er mer anvendelig men er mindre spesifikk og kan bindes til alt dobbeltrådet DNA.

Prosedyre for begge metodene er gitt under. For alle PCR og qPCR kjøring, ble et volum på 1,5µl templat brukt. qPCR ble utført av Step One Plus (Applied biosystem).

Tabell 2.2 Spesifikasjoner for prober og primere benyttet for intern kontroll.

Navn	Sekvens (5'→3')	T _m (°C)
DNAspike F	TACCT CTAAA ATGGA TGC GC AAA	56 °C
DNApsike R	CACAT TCTCC TTTCG CACGT T	54 °C
DNAspike P	AGCCG CGCTT GCGAT TTAGA CC	66 °C

Tabell 2.3 spesifikasjoner for prober og primere benyttet ved kjøring av qPCR.

Navn	Sekvens (5'→3')	Amplikon størrelse	Referanse
MMB282F, primer	ATCGR TACGG GTTGT GGG	506	(Yu <i>et al.</i> 2005)
MMB832R, primer	CACCT AACGC RCATH GTTTA C		
MMB749 F, probe	TYCGA CAGTG AGGRA CGAAA GCTG		
Msc380 F, primer	ATCGR TACGG GTTGT GGG	408	
Msc828R, primer	TAGCG ARCAT CGTTT ACG		
Msc749 probe	TTAGC AAGGG CCGGG CAA		
ARC915F probe	AGGAA TTGGC GGGGG AGCAC	273	
BAC516F probe	TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C	468	
PRK516F probe	TGYCA GCMGC CGCGG TAA	466	

2.4.3.1 qPCR kjørt med probe.

Prosedyre

Metoden er basert på (Yu *et al.* 2005), følgende endringer ble gjort: Aktivering av polymerase ved 95 °C i 15 min, oppskrift mastermiks utgitt av K. Rudi. Alle qPCR reaksjoner ble kjørt med et totalvolum på 25 µl. Mastermiks besto av HOT FIREpol®DNA polymerase 1,25U, HOT FIREpol® buffer B2 1x, Magnesium-diklorid, (MgCl₂) 2,5mM, dNTP 0,2mM, primer F og R 0,2uM og probe med en sluttkonsentrasjon på 0,125uM. Selve qPCR reaksjonen ble kjørt med aktivering av polymerase ved 95 °C i 15 min, denaturering ved 95 °C i 30 sekunder og kombinert hybridisering og elongering ved 60 °C i ett minutt. Antall sykluser ble satt til 40. Ved kjøring ble FAM benyttet som reportert, det ble ikke brukt intern kontroll og en mørk quencher. qPCR med intern kontroll ble kjørt med hensyn på kontroll av ekstraksjonsprosess. Prosessen ble gjort med samme betingelser som for probe basert qPCR, men med forskjellig probe og primere (Tabell 2.2).

2.4.3.2 qPCR kjørt med EvaGreen®

Prosedyre

Metoden er basert på protokoll fra leverandøren av EvaGreen® (Solis BioDyne). Metoden ble kjørt med samme betingelser ved valg av SYBR green i qPCR programmet. Alle reaksjoner ble kjørt med en totalkonsentrasjon på 25 µl. mastermiksen besto av 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus i en sluttkonsentrasjon på 1 x, og F og R primer med sluttkonsentrasjon på 250 nM. Følgende program ble benyttet: Aktivering av polymerase 95 °C i 15 min, denaturering 95 °C i 15 sekund, hybridisering 60 °C i 20 sekund, og elongering ved 72 °C, det ble kjørt 40 sykluser totalt. Etter dette ble det kjørt en smeltekurve med følgende trinn: 95 °C i 15 sekund, 60 °C for 1 minutt og 95 °C i 15 sekund. Egenskaper ved kjøring med Evagreen® var som følger: Reporter: SYBR Green, Quencher: ingen og internkontroll: ROX.

2.4.3.3 Beregning av antall mikroorganismer

Beregning av mengde mikroorganismer i reaktoren ble gjort med et dataprogram LinRegPCR utviklet av Ruijter *et al.* (2009). Programmet var uavhengig av qPCR maskinen. Programmet benyttet en algoritme som rekonstruerte den log – lineære fasen fra den tidligste platåfasen i PCR reaksjonen. For deretter å beregne effektiviteten, individuelt for hver prøve i reaksjonen. Resultatet ble eksportert til en Excel-fil og beregning av startkonsentrasjonen for hver prøve ble utført på følgende måte:

$$\log_{\text{relativ mengde}} = - \left(\frac{C_T(\text{andel})}{\text{Slope}_{\text{andel}}} - \frac{C_T(\text{total})}{\text{Slope}_{\text{total}}} \right)$$

C_T andel = en andel av organismer i en prøve eks. arker eller bakterier

Slope andel = stigningstall for ligningen beregnet av LinReg og tilsvarer relativ PCR effektivitet for en andel mikroorganismer

C_T total = total mengde mikroorganismer i en prøve

Slope total = stigningstall for ligningen beregnet av LinReg og tilsvarer relativ PCR effektivitet for totalantall mikroorganismer

C_T verdien benyttet i beregningen, er fra rådata filen, som tilsvarer C_T verdien oppgitt fra dataprogrammet knyttet opp til qPCR maskinen.

2.4.3.4 Polymerase kjede reaksjon, PCR

PCR ble anvendt for oppformering av archaealt og bakterielt DNA. Prosessen ble gjennomført for oppformering av fragment for videre bruk til sekvensering. Følgende to PCR maskiner ble benyttet: Master Cycler Nexus Gradient (Eppendorf) og 270S1040227 (Applied Biosystems)

Tabell 2.4 Spesifikasjoner for primere for PCR. Primerparet for ARC og PRK ble også anvendt i kjøring av qPCR.

Navn	Målgruppe	Sekvens (5'→3')	T _m ^C (°C)	Amplikon størrelse	Referanse
ARC787F	Archaea	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC	61,0	273	(Yu et al. 2005)
ARC1059R		GCCAT GCACC WCCTC T	62,3		
BAC338F	Bakterier	ACTCC TAGG GGAGGC AG	63,4	468	
BAC805R		GACTA CCAGG GTATC TAATC C	60,7		
PRK341F	Prokaryote	CCTAC GGGRB GCASC AG	61,0	466	
PRK806R		GGACT ACYVG GGTAT CTAAT	59,4		

Prosedyre

Alle PCR reagenser ble blandet til et totalvolum på 25 µl. Mastermiks innehold følgende: HOT FIREpol®DNA polymerase 1,25 U, HOT FIREpol® buffer B2 1 X, Magnesium-diklorid, (MgCl₂) 2,5mM, dNTP 0,2mM og F og R primer med sluttkonsentrasjon på 0,2mM. PCR ble kjørt med 30 sykler, ved følgende program: aktivering av polymerase, 95 °C i 15 min, denaturering 95 °C i 30 sekund, hybridisering 50 °C i 30 sekund, elongering ved 72 °C 45 sekund og deretter 72 °C i 7 min.

2.4.5 Kvantifisering av PCR produkt ved bruk av PicoGreen

Metoden ble anvendt med Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) for å detektere konsentrasjonen til det oppformert PCR produktet. PicoGreen® beregnet konsentrasjonen ved å bestemme absorbans ved 260nm (A₂₆₀), metodegangen ble modifisert av K. Rudi. Absorbans ble bestemt ved bruk av Spektrofluorimeter (FLX800cSE, CamBrex).

Prosedyre

Alle reagenser ble blandet, med følgende sluttkonsentrasjoner; Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent, 1X og 20x TE- buffer 1 X. For templat ble et volum på 2µl brukt. Totalvolum per prøve var 100 µl. Blandingen ble så fordelt i en svart 96-brønns plate. Prøvene ble avlest i FLX800se og mengde ble beregnet i et dataprogram (KC4). Egenskaper for deteksjon var: Ekssitasjon:485, Emisjon 525 og sensitivitet: 50. Standardkurve ble laget med Lambda DNA (fulgte med kit). Fem ulike konsentrasjoner ble laget og målt sammen med ukjente prøver (fortynningsfaktor: ½). Fra målt standard ble konsentrasjonen til hver prøve beregnet, ved å løse ligning med hensyn på X:

$$\frac{y + 69,667}{60,248} = x \text{ (ng/}\mu\text{l)}$$

2.4.6 Forbehandling PCR produkt før Illumina sekvensering

PCR produkt ble rensset ved bruk av E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek, Inc).

Metoden benytter seg av HiBind® teknologi for å fjerne oligonuklotider, nukleotider og polymerase etter en PCR reaksjon. Rensing av PCR produkt ble gjort før Illumina-sekvensering. Et kort sammendrag av hva som ble gjort er vist under.

Prosedyre

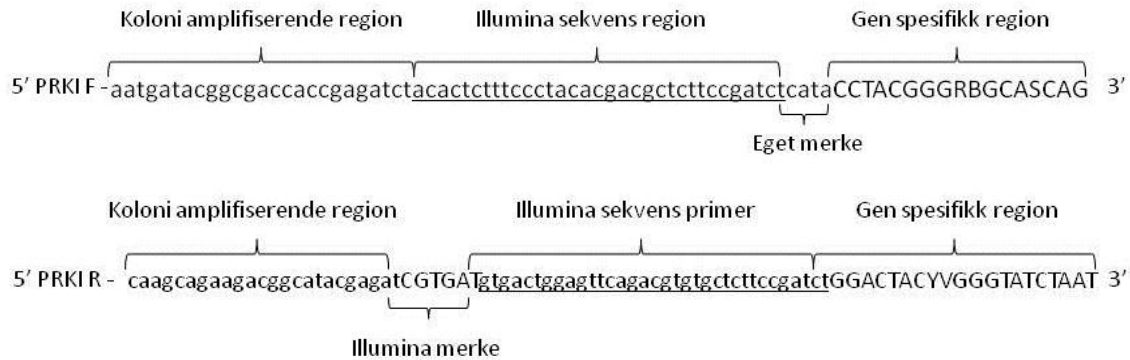
Prosedyren ble utført som beskrevet i protokollen, i korte trekk innebar dette: Etter kvantifisering av PCR produkt i samtlige prøver ble lik konsentrasjon tilsatt i et rør, hvor sluttkonsentrasjonen skulle tilsvare 2000ng. Til dette ble CP buffer tilsatt i et volum som tilsvarte 4 ganger volumet til prøvene. Blandingen ble så overført på HiBind kolonnen og sentrifugert ved maksimum hastighet i 1 min. Kolonnen ble vasket i to ulike vaskesteg og deretter sentrifugert ved maksimums hastighet, for å tørke kolonnen. (steget var kritisk for å oppnå størst mengde eluat). Kolonnen ble plassert i et nytt 1,5 µl eppendorfrør og elueringsbuffer ble tilsatt og deretter sentrifugert i 1 min på maksimum hastighet. Gjennomstrømte væsker fra alle steg ble tatt vare på med tanke på eventuelt uhell. Produktet ble kvantifisert både med PicoGreen® og NanoDrop (Termo Scientific) før det ble sendt til sekvensering.

2.4.7 "Next generation" Illumina sekvensering

2.4.7.1 Konstruksjon av PRKI Illumina-primer bibliotek

Prosedyre

Konstruksjon av amplikonbibliotek ble gjort ved modifisering av en universell primer for prokaryote (PRK 341F og 806R, vedlegg 5) med et Illuminaadapter i 3' ende og en koloniamplifiserende region i 5' ende, for binding til flytcellen i selve sekvenseringen (Figur 2.4). 16 forward primere og 12 revers primere ble bestilt og primerne ble konstruert fra en gitt indeks (TruSeq Index Sequencer, se vedlegg 4). 12 revers primere ble konstruert ved å ta den revers komplementære sekvensen til primer fra indeksen (1-12), som Illumina merke. Forward primer ble kun modifisert direkte med eget merke hentet fra gitt indeks (13-28).



Figur 2.4 Illuminaprimere, PRKI F og R. Konstruksjon av primersett brukt i Illumina sekvensering. Begge primerne inneholdt et område for koloniampifisering og en genspesifikk region. Forskjellen på primerne er som følger: revers primer hadde et område med et Illuminamerke som var med på å skille prøvene fra hverandre i selve sekvenseringen, mens forward primer hadde et eget (unikt) merke for å skille prøvene fra hverandre i etterbehandling og analyse av prøvene. Figuren er konstruert av Fredrik Jordhøy

Konstruering av selve biblioteket ble gjort ved å fordele forward og revers primere i ett system som ga et unikt primerpar for hver sekvenseringsprøve. Dette ble gjort ved at; 12 revers primere ble fordelt på radene 1-12 på hver plate (96 brønns mikroplate) mens forward primerne ble fordelt på kolonne A-H 1-8 på første plate og 9-16 på andre plate. Dette ga alle 192 brønner et unikt primersett hver. Alle 12 x 16 primere kan ses i vedlegg 5. Prøver med modifisert Illuminaprimere ble sendt til Universitetet i Oslo for sekvensering.

2.4.8 Forbehandling av PCR produkt for Sangersekvensering

2.4.8.1 ExoSAP behandling

ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit (Applied Biosystems®) ble brukt for klargjøring av PCR produkt til direkte sekvensering (Sangersekvensering). Eksonuklease 1 bryter ned overflødig enkelttrådet primer og DNA mens Shrimp Alkaline Phosphatase hydrolyserer overflødig dNTP.

Prosedyre

Fortynnet templat ble tilsatt en mastermiks som inneholdt; ExoSap 1 µl, BigDye buffer 5X med sluttkonsentrasjon på 1 X og templat i en konsentrasjon på 5 ng i et totalvolum på 5 µl per prøve. Prøvene ble så satt på varmebakk og inkubert ved 37 °C i 1 time. Enzymene ble inaktivert ved 80 °C i 15 min.

2.4.8.2 Big Dye Terminator labeling kit v1.1

BigDye® Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems®) gjør prøvene klare til fluorescens basert syklussekvensering ved hjelp av PCR. Kitet skal være optimalisert opp mot alle reagenser som benyttes.

Tabell 2.5 Primer benyttet for sekvenserings PCR med BigDye Terminator v1.1

Navn	Målgruppe	Sekvens (5' → 3')	T _m ^C (°C)
ForwardSeq	Prokaryote	ACACT CTTTC CCTAC ACGAC GCTCT TCCGA TCT	71 °C

Prosedyre

Et totalvolum på 10µl var 5µl fra ExoSAP behandlingen, foruten dette besto mastermiksen av BigDye buffer 5X i en sluttkonsentrasjon på 1 X, Bigdye v 1.1, og sekvensprimer med en sluttkonsentrasjon på 3,2 µM. PCR ble kjørt med følgende betingelser: aktivering av polymerase 96 °C i et min, denaturering 96 °C i 15 sekunder, hybridisering, 50 °C i 5 sekund, elongering 60 °C i 4 minutt.

2.4.8.3 Xterminator opprensings prosedyre

BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied biosystem®) er konstruert for å binde PCR komponenter (saltioner, uinkorporert terminator farge, og dNTP), for ikke å forstyrre inkorporert merket produkt i sekvensering. Xterminator fanger opp uinkorporerte komponenter gjennom kraftig risting over tid. Sentrifugering gjør at alle overfløydige komponenter vil legge seg på bunnen. Sluttkonsentrasjoner er ikke tilgjengelige fra produsent men følgende volum ble brukt i prosedyren: 45 med SAM og 10 med XTerminator.

Prosedyre

Nedspunnet prøve ble blandet med Xterminator og SAM. (viktig med jevnlig vorteksing av XTerminator for å oppnå en homogen blanding). Platen med et totalvolum på 65 µl ble satt til risting (30 min ved 1500 RPM). Prøvene ble så spunnet ned (2500 RPM i 2 min) og lagret ved 4 °C

2.5 Behandling av sekvenserings resultat

2.5.1 Direkte sekvensering

For resultatene fra Sangersekvensering, ble to analyser gjennomført; Prinsippal komponent analyse (PCA) og multivariate curve resolution (MCR).

PCA benyttes for å studere varians av ulike grupper i et datasett. Det er en nyttig metode for å analysere store datasett. Metoden klassifiserer subgrupper ut i fra variasjon mellom komponenter, for så å kunne fremvise mønstre av likhet fremstilt som punkter i et scoreplot.

MCR benyttes for å kunne skille et datasett bestående av en blanding av informasjon (eksempel PCA), og skille ut disse til enkeltkomponenter, som kan gi informasjon. I denne oppgaven ble MCR benyttet for skille resultat fra direktesequensering. Og finne enkeltkomponenter for identifisering og sammenstilling mot Illuminasequensering for å studere sammenheng mellom metodene.

2.5.2 Illuminasequensering

Resultatene fra Illuminasequensering ble behandlet med MATLAB. Følgende prosedyre ble utført. 5 millioner sekvenser ble sortert på grunnlag mønsteret til to tilfeldig valgte nukleotider (Adenin og Cytosin). Dette genererte store mengder med operational taxonomic units (OTU). For å senke dette antallet ble en terskelverdi satt til å kun vise OTUer som forekom i en størrelsesorden på ≥ 100 .

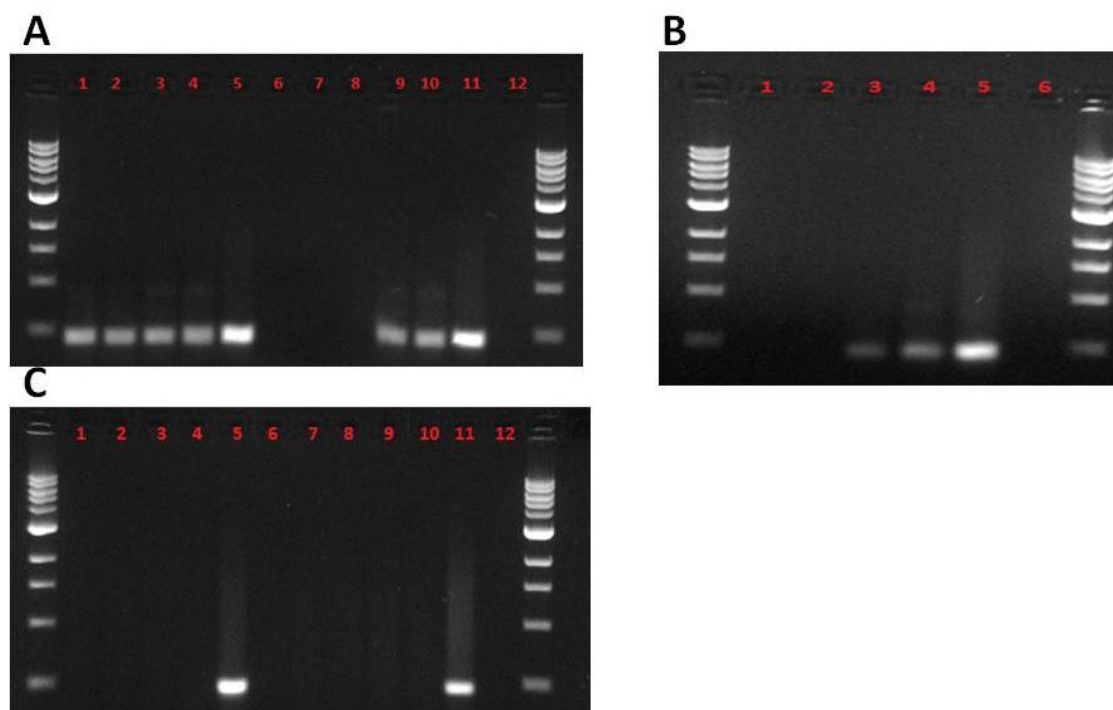
En konsensus sekvens ble så laget for hver OTU. Av ette ble alle OTUer parvis sammenstilt med referansesekvensen (en for archaea og en for bakterier) for å skille støy fra reelle sekvenser. Av dette ble resultatene sortert på en måte som viste forekomst av hver OTU, for hver enkelt av 192 prøver. Det ble gjort en normalisering av resultatene. Analysen ble så utført på grunnlag av disse resultatene samt en oversikt over total forekomst av sekvenser, per OTU.

3 Resultater

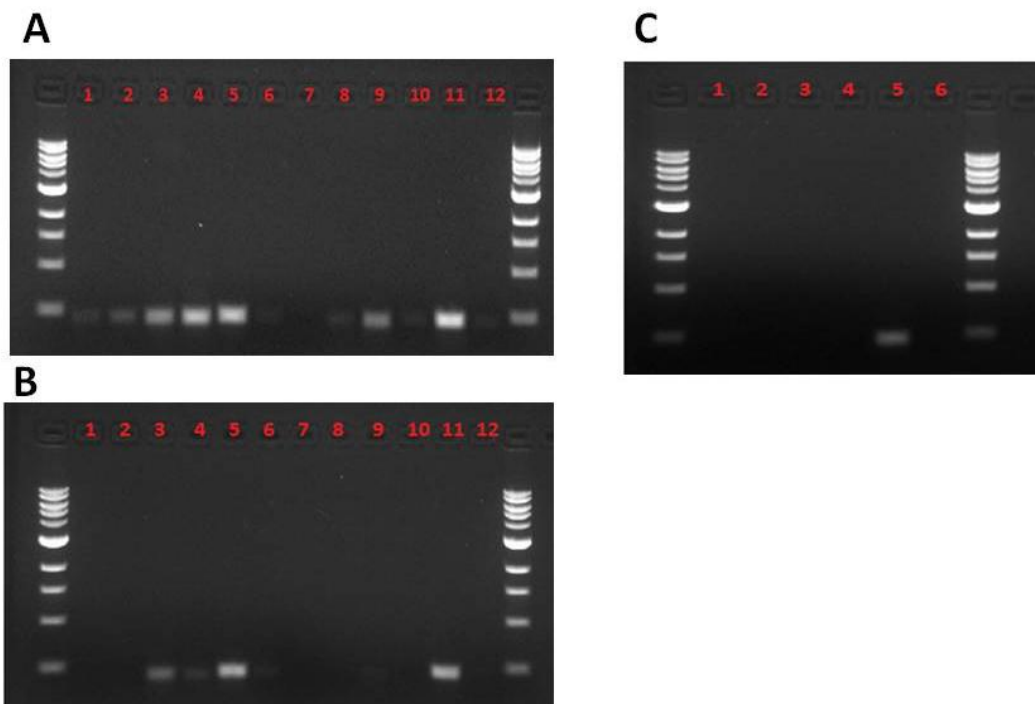
Denne delen tar for seg resultat oppnådd i oppgaven. I tillegg er enkelte resultat fra metodetesting blitt inkludert, dersom de har hatt betydning for de metoder som er brukt i forbindelse med hoveddelen av forsøket.

3.1 Metodetesting og optimalisering

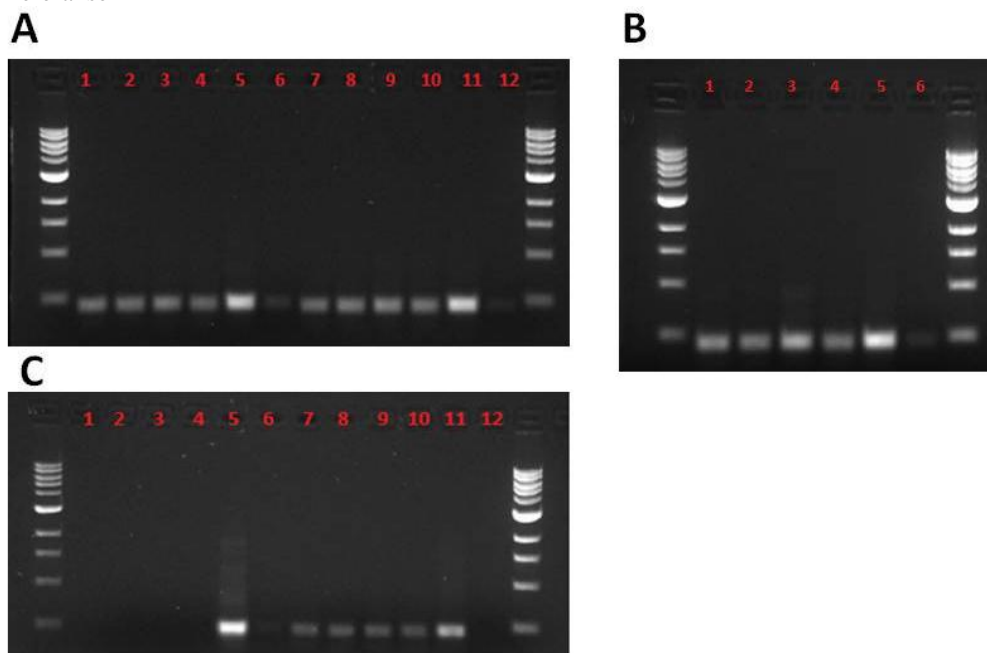
Valg av ekstraksjonsmetode for hovedforsøket ble gjort på bakgrunn av ekstraksjon med tre ulike metoder; FastDNA® SPIN for Soil Kit, GA Stool Bacteria DNA extraction SOP2-011 og MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit *Bead-Based Sample Disruption* med organismer grodd i to medier favorisert for metanogener (Standardmediet og Barkermediet). Samtlige gelelektroforeser er kjørt med 1 kb ladder som referanse (New England Biolabs)



Figur 3.1 Gelelektroforese av PCR produkt etter ekstraksjon med FastDNA kit. Prøvene ble amplifisert med PRK 341F og 806F. Det ble benyttet fem ulike fortyninger ved amplifisering; (A) 0,5 og 1 μ l templat, (B) 1,5 μ l templat og (C) 3 og 5 μ l templat. For gel A og C er brønn 1-4 og 6-10 prøver, 5 og 11 er positiv kontroll mens 6 og 12 er negativ kontroll. I Gel B er brønn 1-4 prøver og 5-6 positiv og negativ kontroll. Ladder 1kb som referanse.



Figur 3.2 Gelelektroforese av PCR produkt, etter ekstraksjon med GA-Stool protokoll. Prøvene ble amplifisert med PRK 342F og 806R. Det ble benyttet fem ulike fortynninger ved amplifiseringer: (A) 0,5 og 1 μ l templat, (B) 1,5 og 3 μ l templat og (C) 5 μ l templat. For gel A og C er brønn 1-4 og 6-10 prøver, 5 og 11 er positiv kontroll mens 6 og 12 er negativ kontroll. Gel B er brønn 1-4 prøver og 5-6 positiv og negativ kontroll. Ladder: 1kb som referanse



Figur 3.3 Gelelektroforese av PCR produkt etter ekstraksjon med MagMAX kit. Resultatet ble amplifisert med PRK 341F og 806F. Det ble benyttet fem ulike fortynninger ved amplifisering: (A) 0,5 og 1 μ l templat, (B) 1,5 μ l templat og (C) 3 og 5 μ l templat. For gel A og C er brønn 1-4 og 6-10 prøver, 5 og 11 er positiv kontroll mens 6 og 12 er negativ kontroll. I Gel B er brønn 1-4 prøver og 5-6 positiv og negativ kontroll. Ladder 1kb, som referanse

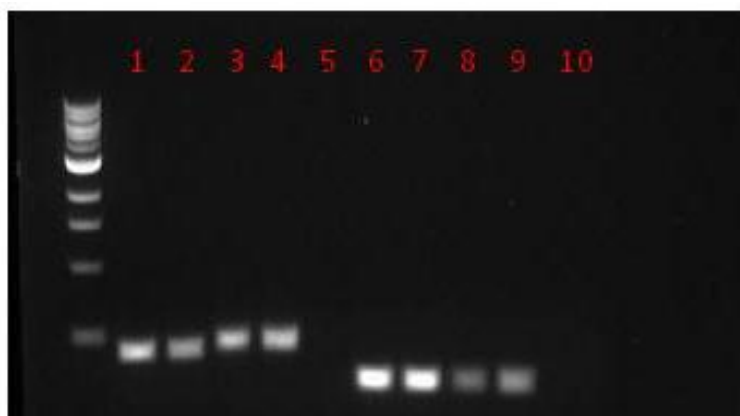
Figur 3.1, 3.2 og 3.3 viser resultatet fra PCR med en generell primer (341F og 806R) kjørt på 1 % agarose gel. Resultatet viser at Figur 3.3 (MagMAX) hadde markert sterkere bånd og et mer stabilt resultat, enn de to andre metodene (3.1 og 3.2), som viste variasjon i båndstyrke, og i påvisning av PCR resultat. Med bakgrunn i disse opplysningene ble det konkludert med, å bruke MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit videre i oppgaven.

Tabell 3.1 viser beregning av totaltall fra to ulike reaktorer. Telling ble gjort fra væskefasen (suspensjon) og bunnsedimentet (grums). Resultatet viser ingen stor forskjell på forekomst av antall mikroorganismer mellom de to ulike sjiktene. Resultatet ble brukt i optimaliseringsprosessen av DNA ekstraksjonen.

Tabell 3.1 Antall celler per ml. Totaltall er beregnet for to ulike fortyninger fra henholdsvis suspensjon og grums.

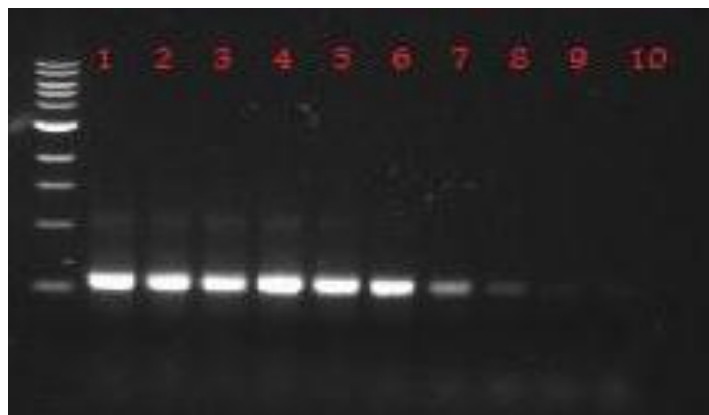
Sjikt	Fortynning	Antall celler per ml
Suspensjon	10-4	$2,62 \times 10^{10}$
	10-6	$4,27 \times 10^{11}$
Grums	10-4	$2,37 \times 10^{10}$
	10-6	$3,77 \times 10^{11}$

Verifisering av primere (Figur 3.4) ble gjort med genomisk DNA fra renkultur med *Haloferox denitrificans*, og to ulike reaktorprøver (storfe og storfe + fiskeensilasje, oppdyrket i henholdsvis Barkermediet og standardmediet). De to primerne som ble verifisert var følgende: PRK (generell primer for prokaryote) og ARC (generell primer for arker). Hensikten var å undersøke om begge primerne var i stand til å amplifisere genomisk DNA fra archaea.



Figur 3.4 Verifisering av ARC primer. Brønn 1,2,6 og 7 er isolert renkultur av *H. denitrificans*, brønn 3,4,8,9 er ekstrahert DNA fra reaktorprøver, brønn 5 og 10 er negativ kontroll. Amplifisering er gjort ved bruk av PRK 341F og 806 F (1-4) og ARC 787F og 1059R (6 til og med 9).

Optimalisering av hybridiseringstemperatur for en Illumina-modifisert universal primer ble gjort ved T_m Gradient PCR (Figur 3.5). Resultatet ble fremstilt på 1 % agarose gel, og viste at hybridiseringstemperaturen for primeren var mellom 47 °C – 65.1 °C med en optimal temperatur mellom 47 °C – 60,5 °C.



Figur 3.5 T_m -Gradient PCR Gelelektroforesen er kjørt av genomisk DNA amplifisert med illumina modifisert PRK primer. Temperatur i de ulike brønnene er: brønn 1; 47 °C, brønn 2; 48,4 °C, brønn 3; 52,5 °C, brønn 4; 55,1 °C, brønn 5; 57,8 °C, brønn 6; 60,5 °C, brønn 7; 63,0 °C, brønn 8; 65,1 °C, brønn 9; 66,7 °C, brønn 10; 67,5 °C. Ladder 1kb

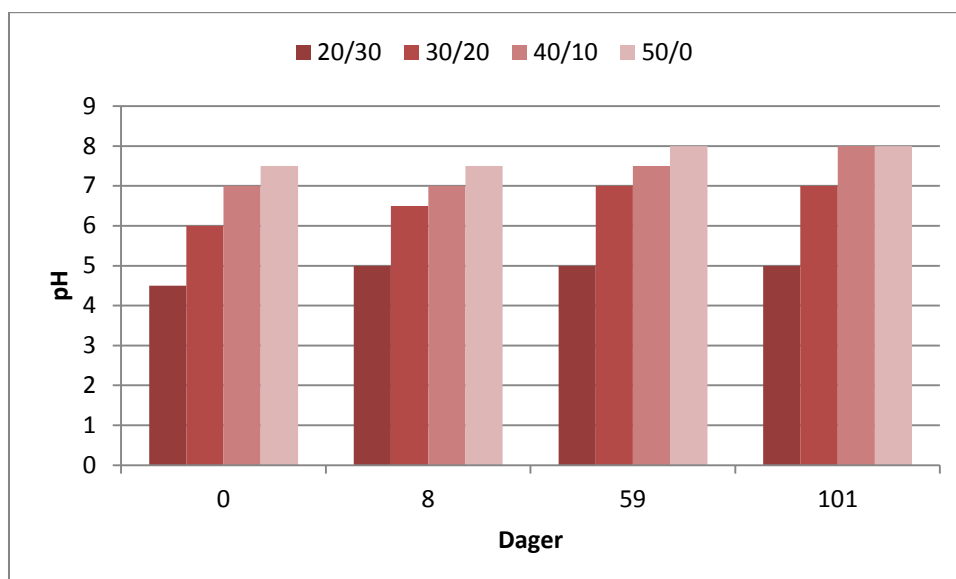
3.2 Identifisering av det mikrobiologiske samfunnet i en bioreaktor

Bestemmelse av TS og VS. Ved oppstart av reaktorene, ble innhold TS og mengde VS beregnet i prosent. I tillegg ble totalt innhold av TS og VS i hver reaktor beregnet i gram. Beregningene er fremstilt i tabell 3.2, og viser at tørrstoffinnholdet i fiskeensilasje var markert høyere enn i storfe gjødsel. Beregninger som ble gjort, er beskrevet i materialer og metoder seksjon 2.2.2.

Tabell 3.2 Beregning av tørrstoff, og organisk innhold samt % organisk innhold av tørrstoff av inokulum og substrat separat. Samt de ulike blandingsene benyttet i reaktorene. Tabellen viser også totalinnhold i reaktorene oppgitt i gram. De ulike reaktorene hadde følgende blandingsforhold i prosent; 20/30 (33,33 % CM/50 % FE), 30/20 (50 % CM/33,33 % FE), 40/10 (66,67 % CM/16,76 % FE), 50/0 (83 % CM) i tillegg inneholdt alle blandingsene 16,67 % inokulum.

Substrat	% TS	% VS	% VS av TS	g TS i 60 ml	g VS i 60 ml
INOC	3,305	5,8	67,606	1,983	1,341
CM	5,677	5,79	77,193	3,406	2,629
FE	32,670	6,07	92,390	19,602	18,110
20/30	19,067	5,87	89,323	11,440	10,218
30/20	14,165	5,87	87,719	8,499	7,455
40/10	10,154	5,81	84,834	6,092	5,168
50/0	5,808	5,74	80,435	3,485	2,803

Måling av pH. pH ble målt for de fire ulike blandingene som ble brukt i oppgaven og er fremstilt i Figur 3.6. Alle målinger ble gjort med pH strips og pH ble målt i forbindelse med uttak av prøve til henholdsvis FISH og HPLC analyse. I tillegg til hver blanding ble inokulumet og substratet målt separat ved oppstart av forsøket. Disse målingene er fremstilt i Tabell 3.3. pH er målt av ulike paralleller, og derfor kan utvikling over tid ses på som en generell utvikling for hver blanding. Målingene viser at pH øker utover i prøveperiode for samtlige blandinger.



Figur 3.6 Utvikling av pH i de fire ulike blandingene benyttet. Samtlige målinger av pH er gjort med pH-strips i forbindelse med prøveuttak til FISH og midt- og Sluttkultur. pH er gjort av ulike reaktorer og pH representerer en generell utvikling. Midt og sluttkultur ble målt kjøring av HPLC (17.4.12).

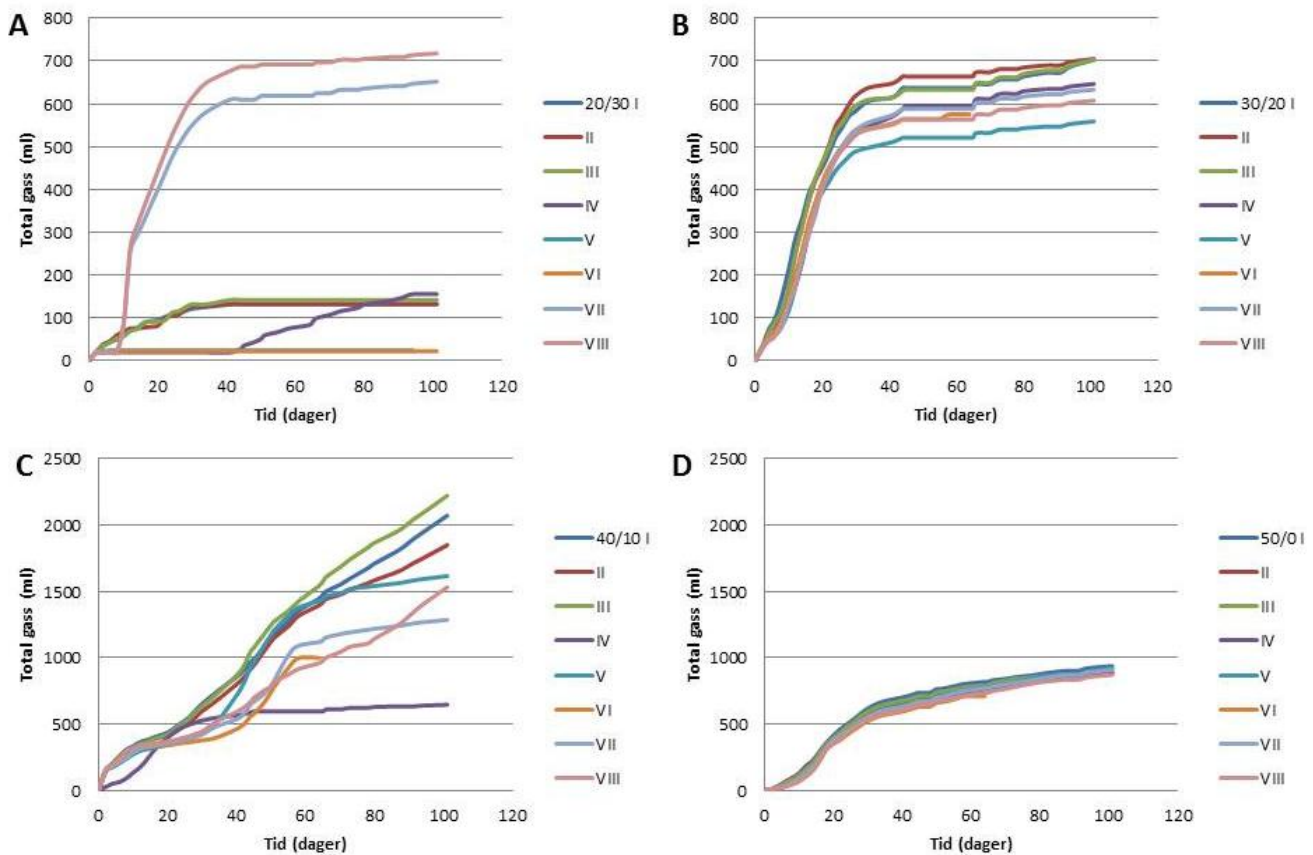
Tabell 3.3 pH av inokulum og substrat målt hver for seg, før ulike reaktorblandinger ble laget.

Blanding	pH
Inokulum (Fiskeensilasje + Storfegjødse)	8,00
Storfegjødse (CM)	7,5
Fiskeensilasje (FE)	4,0

Gassproduksjon. Figur 3.7 viser total, akkumulert gass, for den totale forsøksperioden (101 dager). Resultatet er fremstilt i fire diagrammer, hvor hver blandingstype brukt i de ulike reaktorene er som følger: (20CM/30FE; 30CM/20FE; 40CM/10FE og 50CM/0 CM= storfegjødse og FE= fiskeensilasje). Akkumulert gass er beskrevet som "total gass" på Y-aksen og er målt i ml.

Resultat i Figur 3.7 viser at blanding 3 (40CM/10FE) hadde en markert høyere gassproduksjon enn de andre reaktorene, og at blanding 1 hadde den klart minste gassproduksjonen. Figur 3.7 viser også at blanding 3 hadde en mye større spredning på total

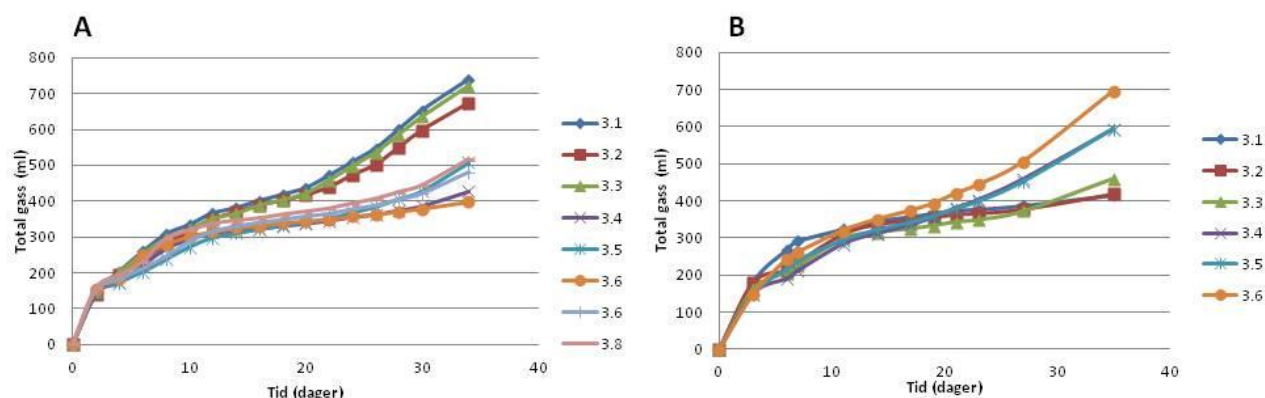
gassproduksjon innad i parallellene i forhold til de andre blandingene. To paralleller skiller seg markert ut i blanding 20/30 på grunn av tilsetning av NaOH (parallell VII og VIII).



Figur 3.7 Total gassproduksjon for (A) 33,33 % storfegjødsel og 50 % fiskeensilasje (B) 50 % storfegjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (C) 66,67 % storfegjødsel og 16,67 % fiskeensilasje og (D) 83 % storfegjødsel. Blandingen 20/30 10 dager tilsatt lut i parallell 7 og 8. I alle blandinger har parallell 1,2 og 3 blitt benyttet til prøveuttak i perioden 0-30 dager.

Figur 3.8 viser resultat fra et kontrollforsøk gjort i februar og mars. Forsøket ville undersøke om den observerte spredningen av gassproduksjon for 40/10 fremstilt i Figur 3.7, var tilfeldig. Resultatet kan ses i Figur 3.8 og er sammenlignet mot forsøk startet 15.11.2011.

Kontrollforsøket ble startet 3.2.2012 og avsluttet 35 dager senere. Målingene for de to forsøkene er sammenlignet over 35 dager.



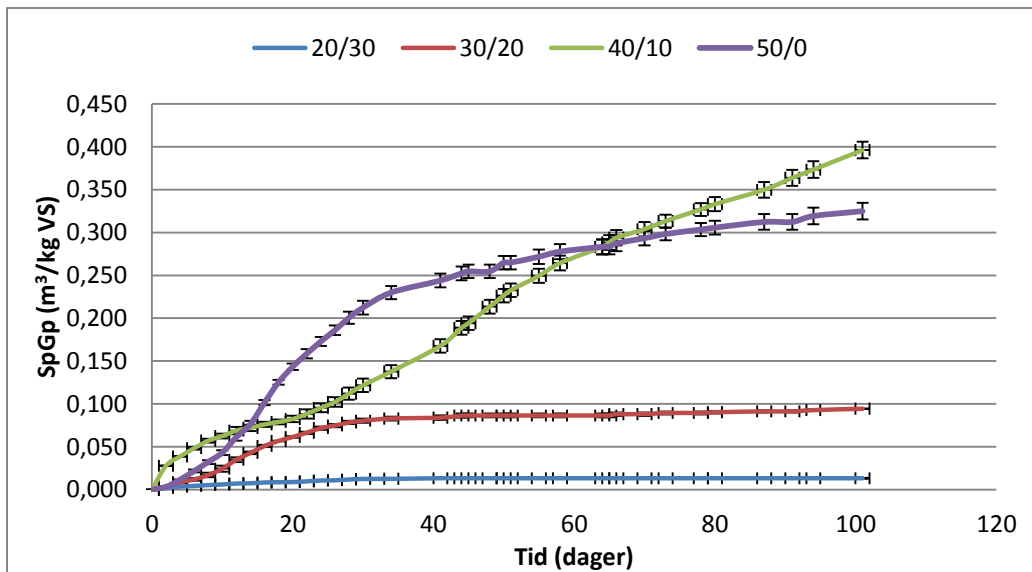
Figur 3.8 Figuren viser akkumulert gass for (A) hovedforsøk (15.11.2011 – 15.12.2011) og (B) kontrollforsøk (3.2.2012–9.3.2012). Forsøket er utført over en tidsperiode på 30 dager for å kontrollere om forskjell gassproduksjon for parallellene var tilfeldig.

Spesifikk gass- og metanproduksjon. Spesifikk gassproduksjon er fremstilt som gjennomsnittlig akkumulert gass av tre paralleller for alle reaktorblandinger. Resultat for beregning av spesifikk gassproduksjon (Figur 3.9) viser at blanding 3 hadde den høyeste spesifikke gassproduksjonen på ca. $0,4\text{m}^3/\text{kg VS}$, og blanding 1 den minste spesifikke gassproduksjonen på ca. $0,014\text{m}^3/\text{kg VS}$.

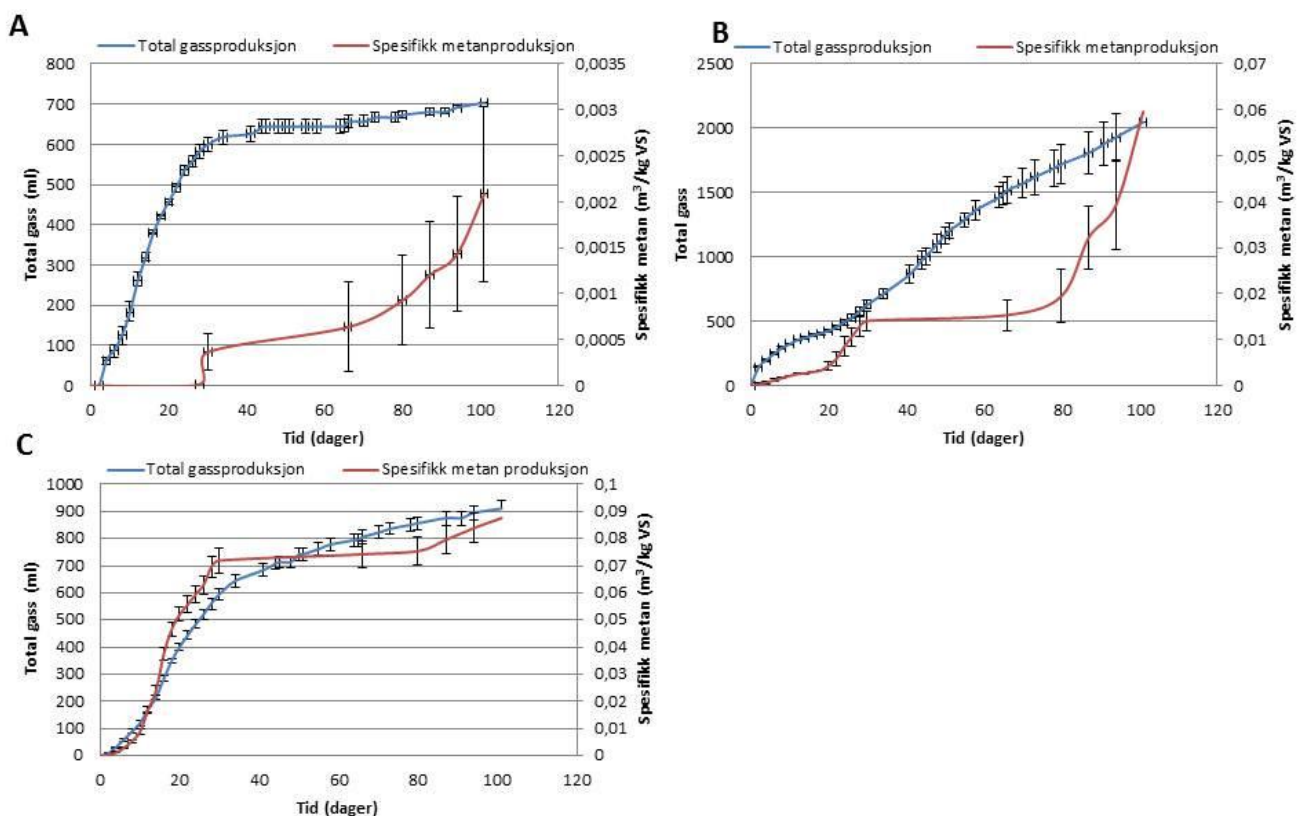
I tillegg til spesifikk gassproduksjon ble spesifikk metanproduksjon beregnet og er fremstilt i tre grafer (Figur 3.10). Fremstilling av resultatene er gjort som et gjennomsnitt av akkumulert gass for hver av de fire reaktorblandingene. Mengde metan er beregnet ut fra ml gass produsert den dagen GC ble gjennomført, og viser kun metan produsert per $\text{VS}_{\text{tilsatt}}$ de dagene hvor GC ble gjennomført. Resultatet viste høyest spesifikk metanproduksjon for blanding 4 og lavest spesifikk metanproduksjon for blanding 2. Spesifikk metanproduksjon ble beregnet i $\text{m}^3/\text{kg VS}$ og er satt opp mot total gassproduksjon (total gass) for reaktoren.

Standardavvik for total gassproduksjon, spesifikk gassproduksjon og spesifikk metanproduksjon ble beregnet og er fremstilt som en del av Figur 3.9 og 3.10.

Standardavviket ble beregnet ved først å ta gjennomsnitt av parallell 1-3 for akkumulert gass og spesifikk gassproduksjon og deretter ble gjennomsnitt standardavvik beregnet individuelt for hver måling. Samme beregning ble gjort for spesifikk metanproduksjon.

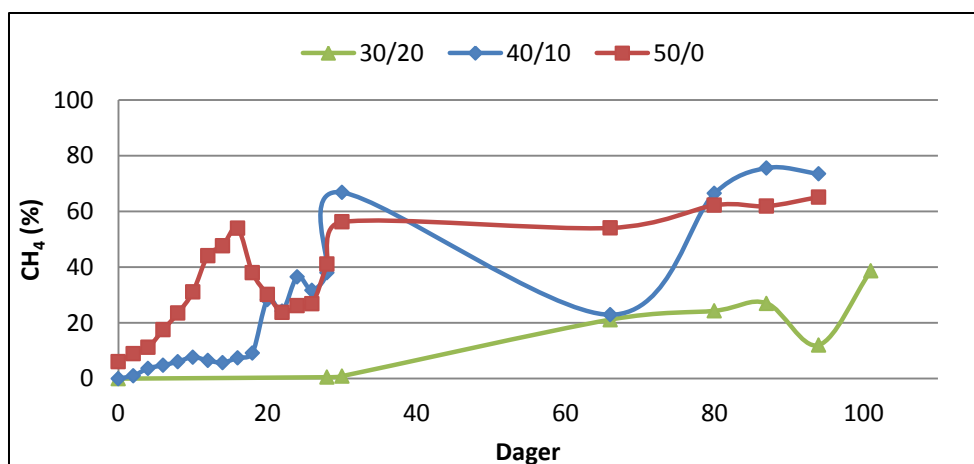


Figur 3.9 Spesifikk gass produksjon $\text{m}^3/\text{kg VS}$ og standardavvik for 33,33 % storfe gjødsel og 50 % fiskeensilasje (20/30), 50 % storfe gjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (30/20), 66,67 % storfe gjødsel og 16,67 % fiskeensilasje (40/10) og 83 % storfe gjødsel (50/0). Grafene er beregnet ved å ta gjennomsnitt av parallell 1-3 for hver blanding og fremstille resultatet i en graf. Beregningene er gjort ut fra en periode på 105 dager og viser en sammenligning mellom de fire ulike blandingene benyttet i oppgaven.

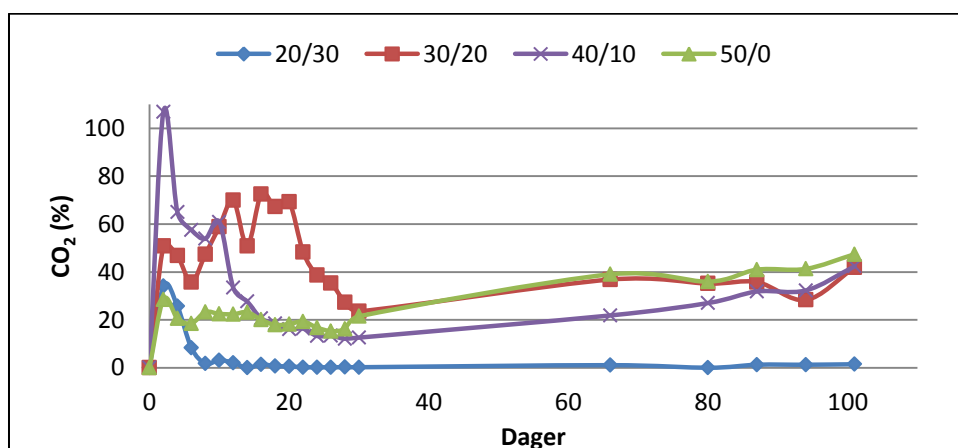


Figur 3.10 Spesifikk metan produksjon og standardavvik for 50 % storfe gjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (30/20), 66,67 % storfe gjødsel og 16,67 % fiskeensilasje (40/10) og 83 % storfe gjødsel (50/0). Resultatet er beregnet ved å ta gjennomsnittet av parallell 1-3 for hver blanding. Beregningene er gjort over en tidsperiode på 105 dager. Spesifikk metanproduksjon (sekundær Y-akse) er plottet mot beregnet akkumulert gass (primær Y-akse) for å demonstrere i hvilket tidsrom metan ble produsert.

For uten spesifikk gass- og metanproduksjon ble forekomst av metan og karbondioksid beregnet i prosent (3.11 og 3.12). Resultatet er beregnet ved å ta gjennomsnitt av parallell 1-3, fra de ulike blandingene og indikerer derfor en generell tilstedeværelse av metan og karbondioksid for reaktorer som har blitt åpnet. Blandingen 40/10 har det største innhold av metan gjort ved enkeltmåling, mens 50/0 har de mest stabile konsentrasjonene av metan gjennom hele forsøksperioden.

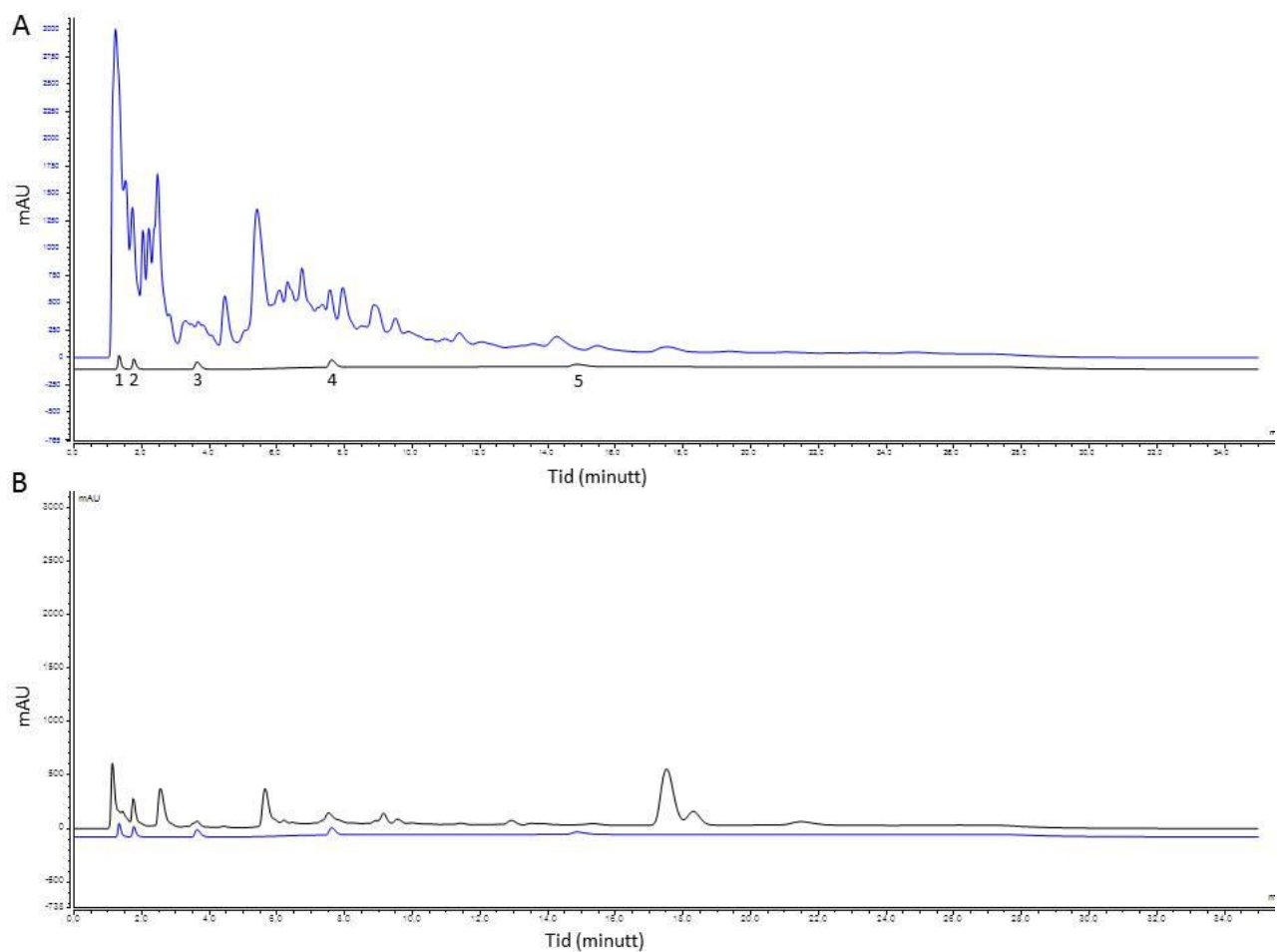


Figur 3.11 Prosent innhold av metan i de ulike reaktorene over tid for følgende reaktorblandinger; 50 % storfegjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (30/20) 66,67 % storfegjødsel og 16,67 % fiskeensilasje (40/10) og 83 % storfegjødsel (50/0). Prosent metan er målt i hele oppgaveperioden (101 dager). Innhold metan er beregnet ved å ta gjennomsnittet av prosent metan tilstede i de tre reaktorene som har blitt åpnet i forbindelse med prøveuttak.



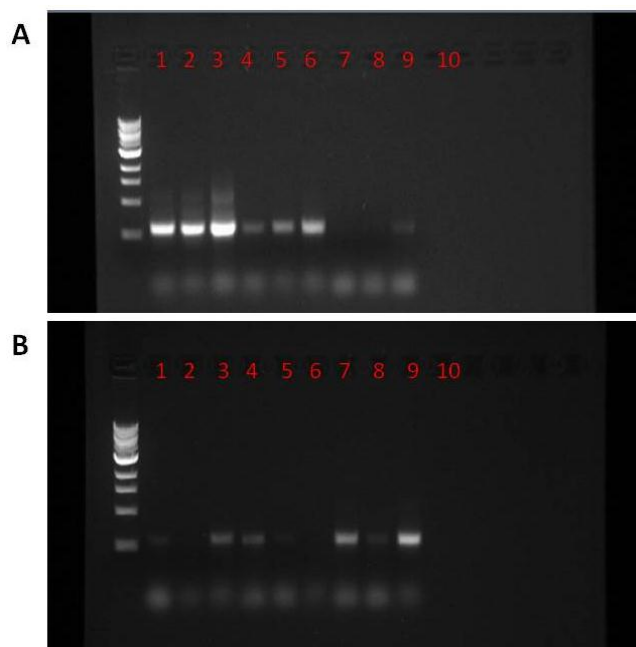
Figur 3.12 Prosent CO₂ i de ulike reaktorene over tid i følgende reaktorer: 33,33 % storfegjødsel og 50 % fiskeensilasje (20/30), 50 % storfegjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (30/20) 66,67 % storfegjødsel og 16,67 % fiskeensilasje (40/10) og 83 % storfegjødsel (50/0). under hele forsøksperioden (101 dager). Innhold CO₂ er beregnet ved å ta gjennomsnittet av tre reaktorer for hver blanding. Reaktorene representerer reaktorene som har blitt åpnet i forbindelse med prøveuttak.

HPLC analyse. HPLC analyse ble gjort med start, midt- og sluttkultur. Figur 3.13 viser analyse av ren fiskeensilasje (A) og sluttkultur for blanding 50/0 (B). Fiskeensilasje (blå kurve) er satt opp mot en standard som tilsvarer 5 ulike syrer (propionsyre, eddiksyre, smørtsyre, valeriansyre og lavilnsyre) i en konsentrasjon på 100nM for hver syre. Det er ikke mulig å tolke hvilke syrer som er tilstede på grunn av høy bakgrunnsstøy. 50/0 er satt opp mot samme standard, (blå kurve) og demonstrerer hvordan prøvene skulle se ut, uten store mengder bakgrunnsstøy. HPLC analysen av 50/0 viser innhold av maursyre, eddiksyre, propionsyre og lavilnsyre, hvor maursyre forekommer is tørst grad. For uten disse viser kromatografen deteksjon av to ukjente forbindelser.



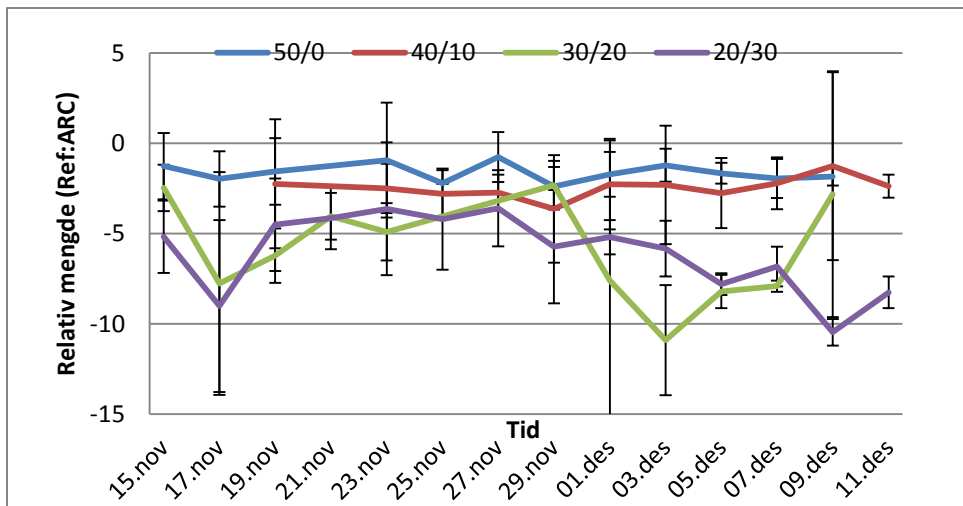
Figur 3.13 Analyse av HPLC resultat og viser analyse av fettsyrer i A Fiskeensilasje og B reaktorblanding med 83 % storfegjødsel (50/0). Diagrammet viser deteksjon av organiske komponenter detektert ved 210nm. Diagrammet inneholder en standard med fem ulike syrer detektert i følgende rekkefølge: 1 maursyre, 2 eddiksyre, 3 propionsyre, 4 smørtsyre og 5 valeriansyre (nummerering fra øverste figur). Standarden er merket med svart for A og blått for B og har en konsentrasjon på 100nM.

PCR. Etter DNA ekstraksjon med MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit ble et amplikon bibliotek konstruert med Illuminamodifiserte PRK primere. Til sammen ble 192 prøver amplifisert med unike primere Figur 3.14 viser resultat av 8 tilfeldig valgte prøver fra hver PCR. Resultatet viser at 6 av 8 prøver for både plate 1 (A) og 2 (B) har blitt amplifisert i en konsentrasjon som gjør disse synlig på gelen.

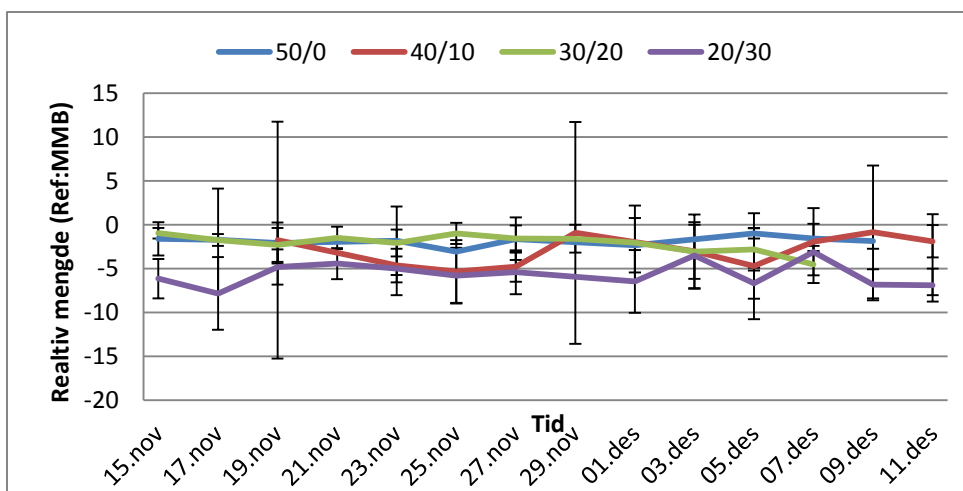


Figur 3.14 Kontroll av PCR produkt. Gelelektroforese av PCR produkt amplifisert med PRK primer modifisert med Illuminaadapter PRKI F og R. A representerer amplifisering av plate 1 og B amplifisering av plate 2. Brønn 1.9 viser tilfeldig valgte prøver, mens brønn 10 er negativ kontroll. Gelen er kjørt med 1kb ladder som referanse.

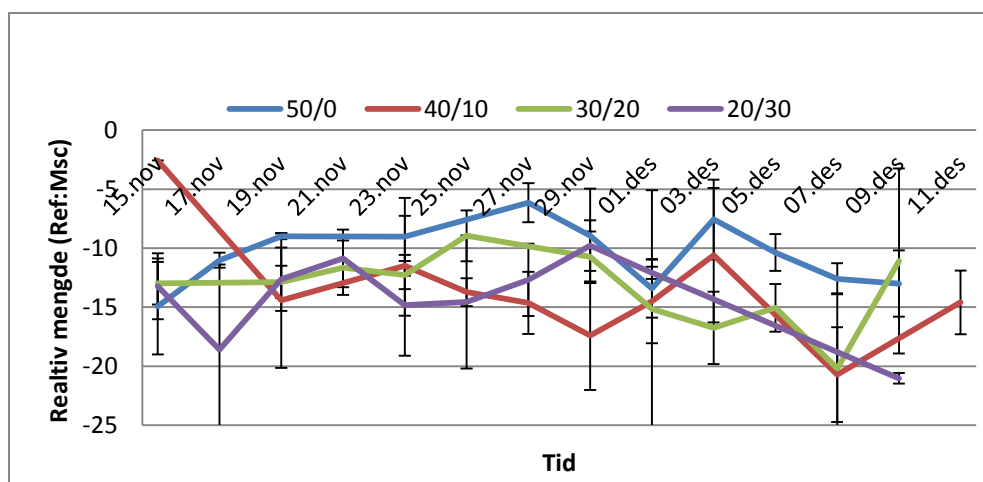
Kvantitativ PCR. Kvantifisering av ulike mengder i de ulike blandingene, ble gjort ved å se på relativ mengde i forhold til intern kontroll. Resultatet ble beregnet ved bruk av LinRegPCR og ligningen som beskrevet i avsnitt 2.4.3.3. Hvor resultatet som fremstilles (Log_2) viser mengden av archaea, *Methanomicrobiales* og *Methanosarcinales*, i forhold til intern kontroll basert på C_T verdi. Resultatet kan ses i Figur 3.15, Figur 3.16 og Figur 3.17. Figuren viser en generell utvikling av mengde archaea (ARC), *Methanomicrobiales* (MMB) og *Methanosarcinales* (Msc) over tid. De tre diagrammene vier større mengder av archaea og MMB for blandingene 40/10 og 50/0. Msc viser generelt mindre kvanta i samtlige blandinger. En svak nedgang av den totale mengden av archaea kan ses mot slutten av prøveperioden.



Figur 3.15 Mengde archaea for 33,33 % storfevjødsel og 50 % fiskeensilasje (20/30), 50 % storfevjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (30/20) 66,67 % storfevjødsel og 16,67 % fiskeensilasje (40/10) og 83 % storfevjødsel (50/0) vist over tid. Prøvene er amplifisert med ARC 878F og 1059 R Mengden er beregnet ut fra intern kontroll. Beregningene er gjort ved å ta gjennomsnitt av tre paralleller for hver reaktorblending, fra hvert prøveuttak.

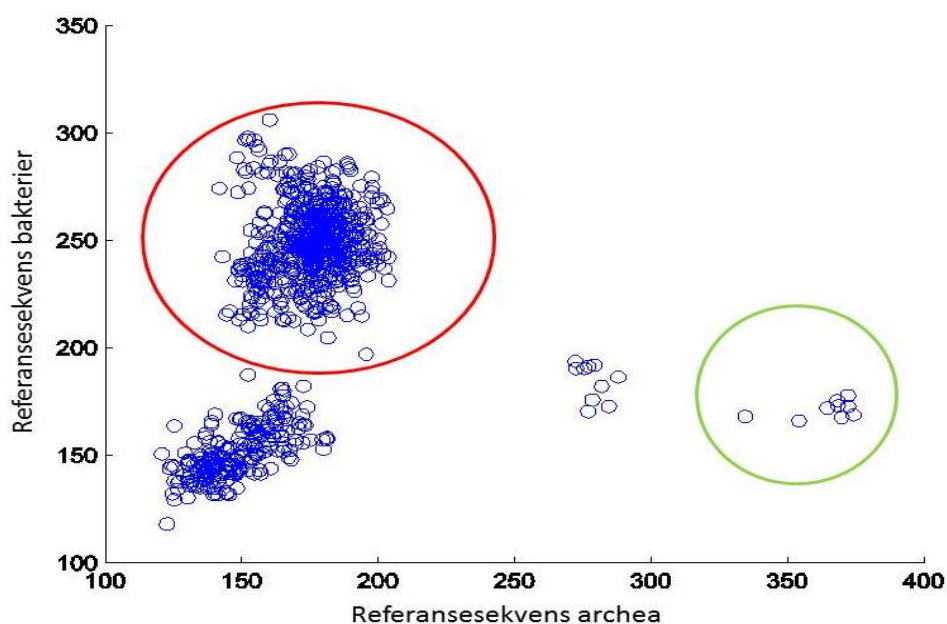


Figur 3.16 Mengde *Methanomicrobiales* for 33,33 % storfevjødsel og 50 % fiskeensilasje (20/30), 50 % storfevjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (30/20) 66,67 % storfevjødsel og 16,67 % fiskeensilasje (40/10) og 83 % storfevjødsel (50/0) vist over tid. Prøvene er amplifisert med MMB 282F og 832R samt MMB 749 probe. Mengden er beregnet ut fra intern kontroll. Beregningene er gjort ved å ta gjennomsnitt av tre paralleller for hver reaktorblending, fra hvert prøveuttak.



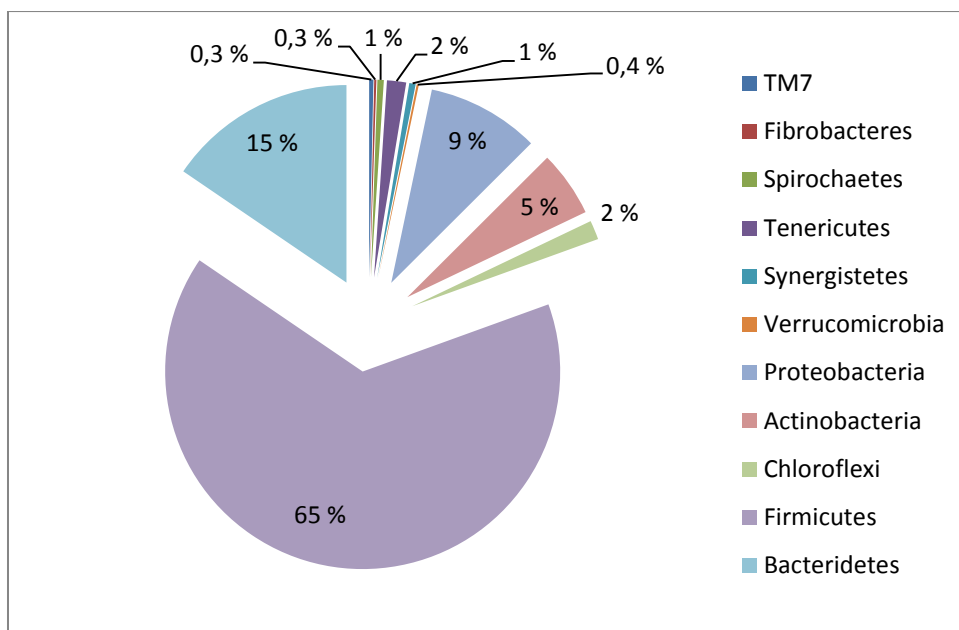
Figur 3.17 Mengde *Methanosarcinales* for 33,33 % storfegjødsel og 50 % fiskeensilasje (20/30), 50 % storfegjødsel og 33,33 % fiskeensilasje (30/20) 66,67 % storfegjødsel og 16,67 % fiskeensilasje (40/10) og 83 % storfegjødsel (50/0) vist over tid. Prøvene er amplifisert med Msc 380F og 828R samt 749 probe. Mengden er beregnet ut fra intern kontroll. Beregningene er gjort ved å ta gjennomsnitt av tre paralleller for hver reaktorblending, fra hvert prøveuttak.

Scatterplottet (Figur 3.18) viser sammenstilling mellom referanse sekvens (en for archaea og en for bakterier) og detekterte OTU, og er benyttet i forbindelse med analyse av resultat fra Illuminasekvensering. Resultatet av sammenstillingen tilsvarer avstand mellom referansesekvensen og en tilfeldig OTU. Kortere avstand vil gi høyere score og ses på som en faktisk OTU, som representerer en archaea eller en bakterie (markert med henholdsvis grønn og rød sirkel). En feil ble gjort da terskelverdi for archaea ble satt og derfor antas det at grupperingen tett opp til archaea trolig er bakterier OTUer.

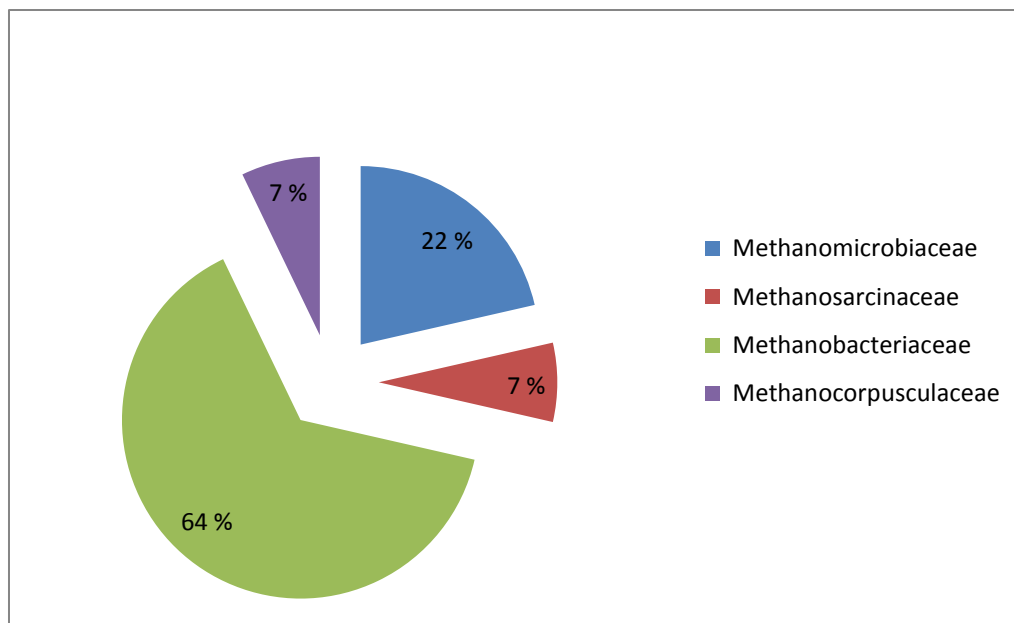


Figur 3.18 Scatterplott for alle archaea (x-akse) og bakterie OTUer (y-akse) parvis sammenstilt mot en referanse- sekvens for henholdsvis bakterie og archaea. Punktene i grønn sirkel indikerer høy score for archaea OTUer mens punkter i rød sirkel indikerer høy score bakterie OTUer. Samling av punkter med lav score er støy. På grunn av feil terskelverdi antas det at grupperingen tett opp mot archaea OTUer er bakterier.

Forekomst. Forekomst ble detektert ut fra OTUer og ble analysert ved bruk av et ribosomal database prosjekt (RDP) søk. Søket ble utført med en terskelverdi på 50 %. Resultatet av søket er fremstilt i to sektordiagram (Figur 3.19 og Figur 3.20). Figurene fremstiller forekomst blant fylum av bakterier og familier av ulike archaea. Av et totalantall på 869 OTUer ble 689 av disse identifisert som bakterier og 19 som archaea. Resultatet viste tre dominante fyli blant bakterier; *Firmicutes* (65 %), *Bacteroidetes* (15 %) og *Proteobacteria* (9 %), den resterende forekomsten var fordelt over en rekke fyli. I tillegg viste resultatet at 16,5 % av OTUene ikke lot seg identifisere. For archaea ble 17 av 19 sekvenser identifisert, mens to ikke lot seg identifisere. Blant de ulike familiene var *Methanobacteriaceae* den mest dominante (64 %). Tabell av RDP søk for bakterier som hadde en forekomst av ≥ 1000 sekvenser kan ses i vedlegg 7.

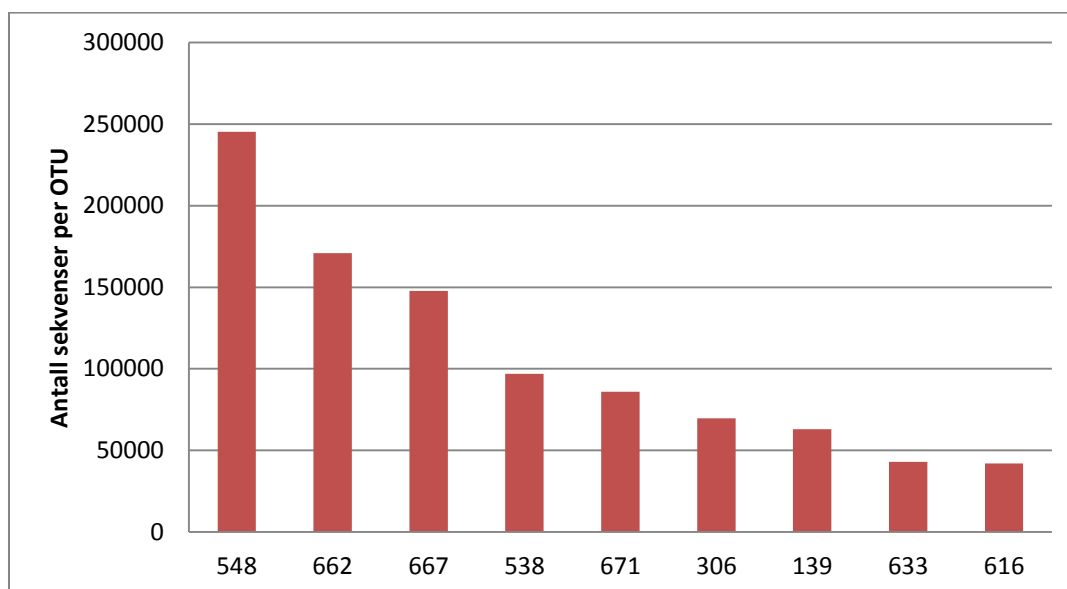


Figur 3.19 Forekomst av ulike bakterie OTUer basert på Illumina sekvenseringsresultat. Sortering er gjort etter forekomst av OTU for hvert fylum, og er basert på resultat oppnådd med RDP søk med en terskelverdi på 50 %. Terskelverdien for søket ble satt til 50 %. 7

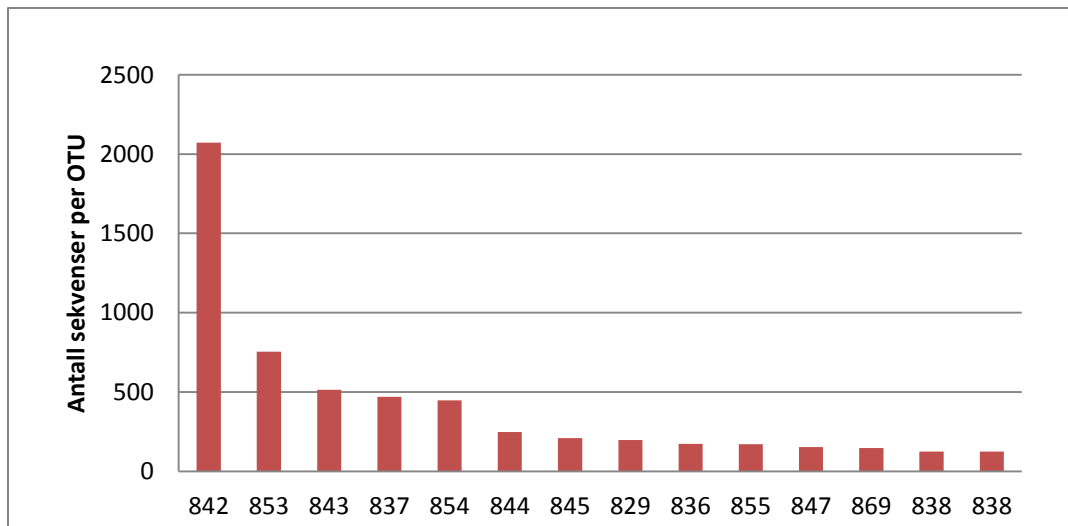


Figur 3.20 Forekomst av ulike archaea OTUer, basert på Illumina sekvenseringsresultat. Sortering er gjort etter forekomst av OTU for hver familie, og er basert på resultat oppnådd med RDP søk med en terskelverdi satt til 50 %. Terskelverdien for søket ble satt til 50 %.

I tillegg til å studere forekomst for total antall OTUer tilstede, ble total forekomst (antall sekvenser) for hver OTU fremstilt i Figur 3.21 og 3.22. Figuren fremstiller total forekomst av hver OTU for archaea, mens kun de mest dominante (de som forekommer i størst grad) vises for bakterier. Figurene viser at noen OTUer forekommer i stor grad, mens de resterende forekommer i mindre antall. Resultatet er enda mere synlig blant archaea enn bakterier.



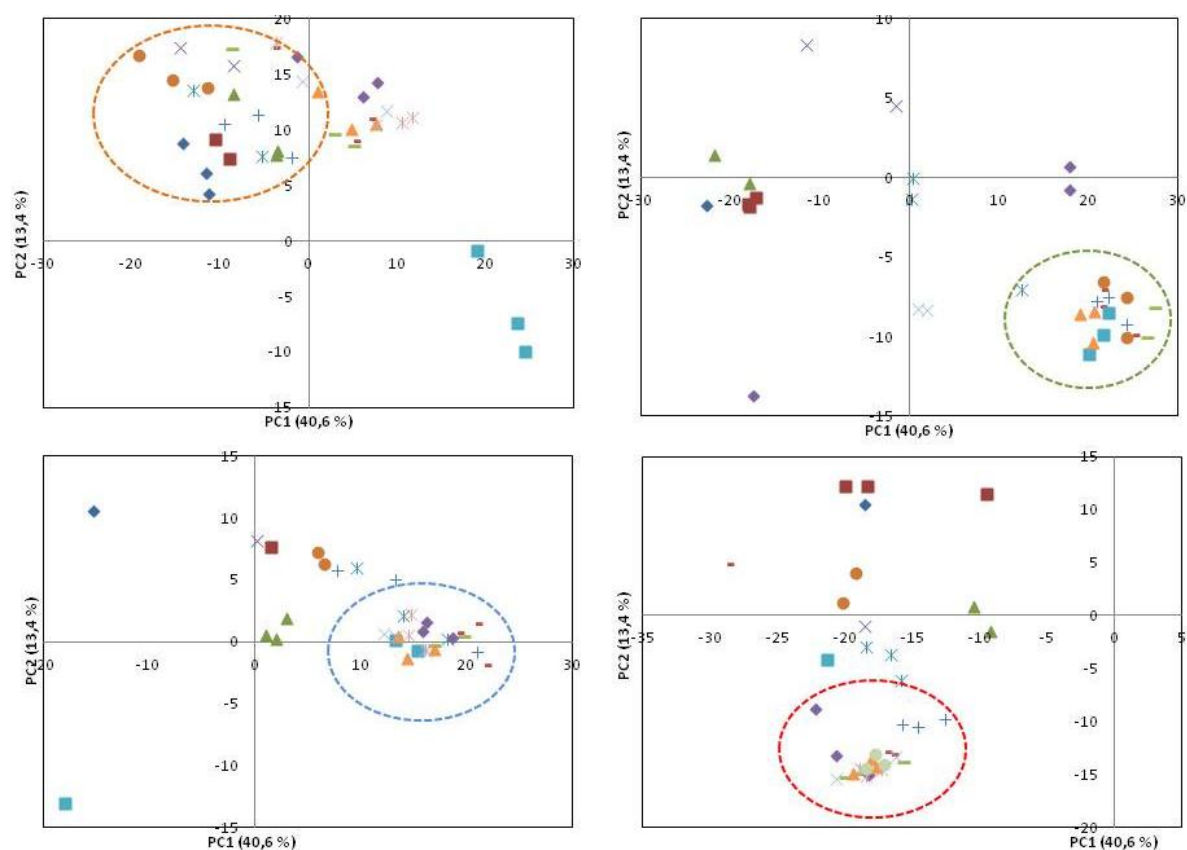
Figur 3.21 Antall sekvenser detektert for de ni mest dominante bakterie- OTUene i samtlige reaktorer. Forklaring på hver OTU 548, 662 og 667: *Clostridiales*, 538 *Bacteroidetes*, 671 og 306: *Clostridiales* 139: *Erysipelotrichales* 633: *Oceanospiriales*, 616: *Lactobacillales*



Figur 3.22 Antall sekvenser detektert for hver archaeaOTU i samtlige reaktorer. Forklaring på hver OTU: 842, 853 og 843 *Methanobacteriales*, 837: *Methanobacteriales*, 854, 844 og 845: *Methanobacteriales*, 829 og 836 *Methanomicrobiales*, 855 og 847: *Methanobacteriales*, 869: *Methanomicrobiales*, og 838: *Methanosarcinales*.

Analyse av data fra direkte sekvensering ble gjort ved bruk av PCA. Sammenstilling av Prinsipal komponentene (Figur 3.23) kan være med å indikere subgrupper som dannes, fra de ulike blandingene, som igjen kan si noe om trender i det mikrobielle samfunnet. De ulike principal komponentene viser grad av variasjon hvor PC1 viser maksimal variasjon mellom komponentene. Variasjon mellom komponentene (PC1, 2 og 3) ble satt til henholdsvis 40,6, 13,4 og 10,6 %.

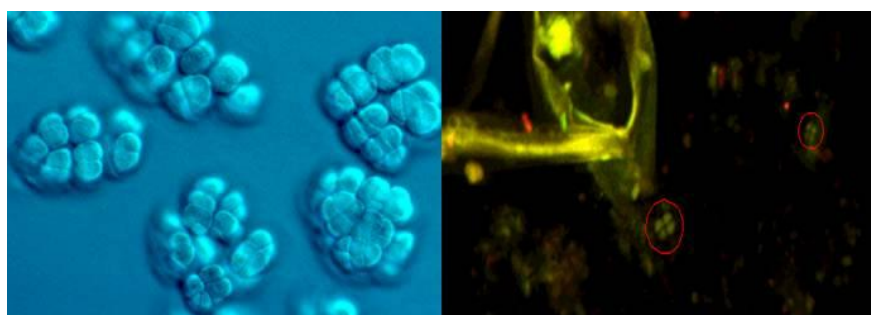
Figur 3.23 viser sammenstilling av PCA 1 og PCA 2 som viser størst diversitet innad. Resultatet fra sammenstilling viser at 20/30 har en gruppering, men punktene er ikke samlet tett inntil hverandre, som da antyder noen ulikheter og grad av diversitet. For de tre resterende reaktorblandinger (30/20, 40/10 og 50/0), viser alle forholdsvis kompakte samlinger og stor grad av konvergens. Grupperingene som forekommer, ser ut til å skje med prøver fra 19.11 og frem avslutning av prøvetakingen (15.12).



Figur 3.23 Sammenstilling av prinsipal komponenter med hensyn på tid fra data for direkte sekvensering. Analysen er gjort mellom PC 1 og PC 2. Grafen oppe til venstre viser 20/30, oppe til høyre 30/20, nede til venstre 40/10 og nede til høyre 50/0 med henholdsvis oransje, grønn, blå og rød sirkel som marker grupperinger. Sammenstillingen er gjort av PC komponenter beregnet ut fra samtlige datoer hvor det ble foretatt prøveuttak. Forklaring for samtlige punkter er oppgitt under.

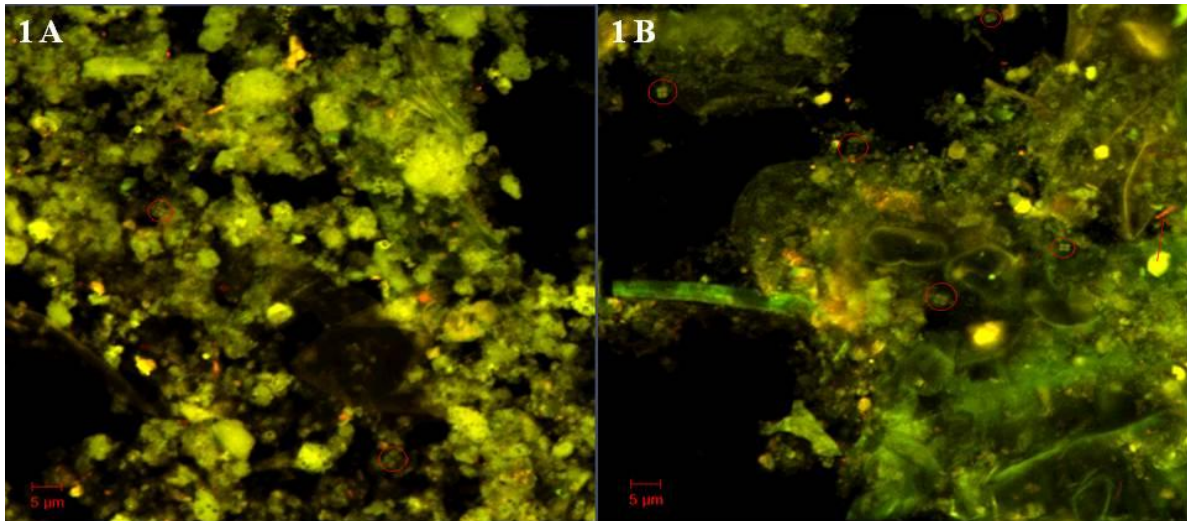
◆ 15.nov	■ 17.nov	▲ 19.nov	× 21.nov	✱ 23.nov
● 25.nov	+ 27.nov	- 01.des	- 03.des	◆ 05.des
■ 09.des	▲ 11.des	× 13.des	✱ 15.des	

FISH ble utført for kvantifisering og identifisering av arker og bakterier i de ulike reaktorene. På grunn av faktorer som autofluorescens og bakgrunnsstøy lot dette seg ikke gjennomføre. Kun trender ble observert. Derfor er det bare vist mikroskopiobservasjoner.



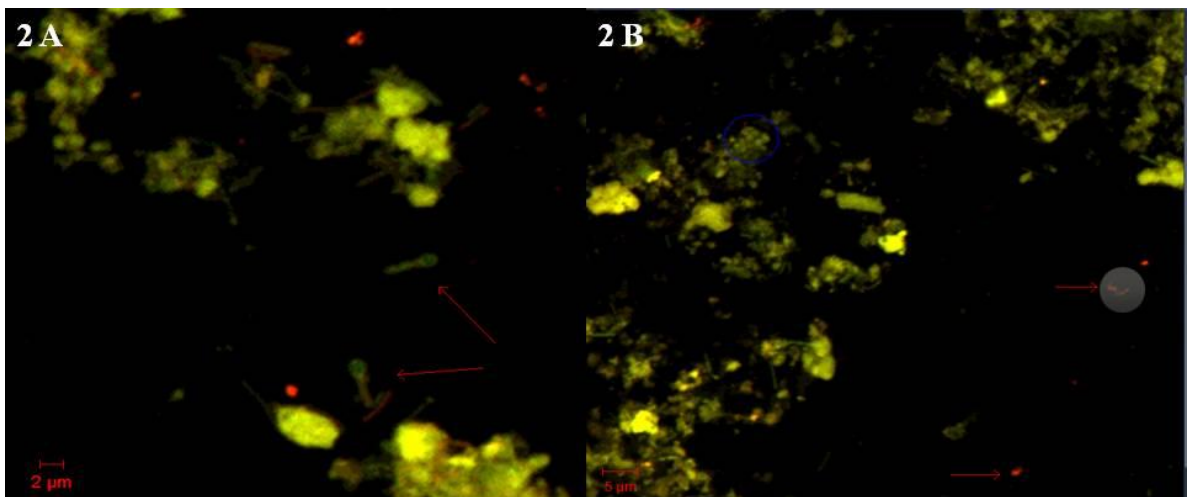
Figur 3.24 Antatt *Methanosarcina* vist opp mot en referanse. Figuren prøver å fremstille grad av likhet som kan være med å understreke at observerte organismer under mikroskopering av FISH resultat hørte til slekten *Methanosarcina*.

20CM/30FE: observasjon av kokker og diplokokker, store mengder bakgrunnsstøy og autofluorescens (1A). Enkelte observasjoner av *Methanosarcina* i uke 4(1B).



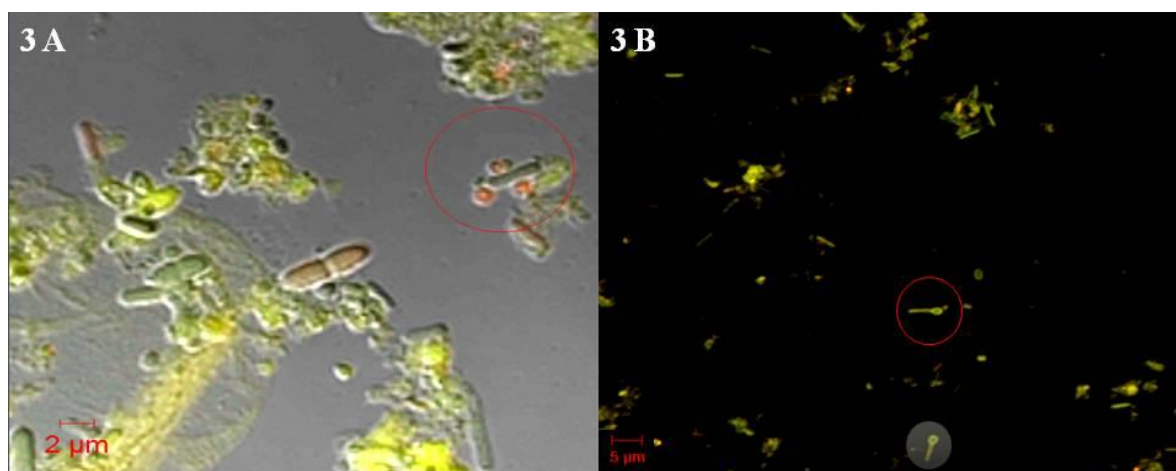
Figur 3.25. Mikroskopering av FISH preparat fra blanding 20/30. 1A. Demonstrasjon av bakgrunnsstøy og autofluorescens ved studering av preparatene. Bildet er fra første uke 1. 1B. Forekomst av *Methanosarcinales* fra uke 4.

30CM/20FE: observasjon av stavbakterier (enkle, eller to og to sammen), kokker og diplokokker (2B). Fra uke 2 ble det observert sporulerende celler, som avga både rød og grønn fluorescens (2A). En økning i antall stavbakterier ser ut til å forekomme fra uke 1-4.



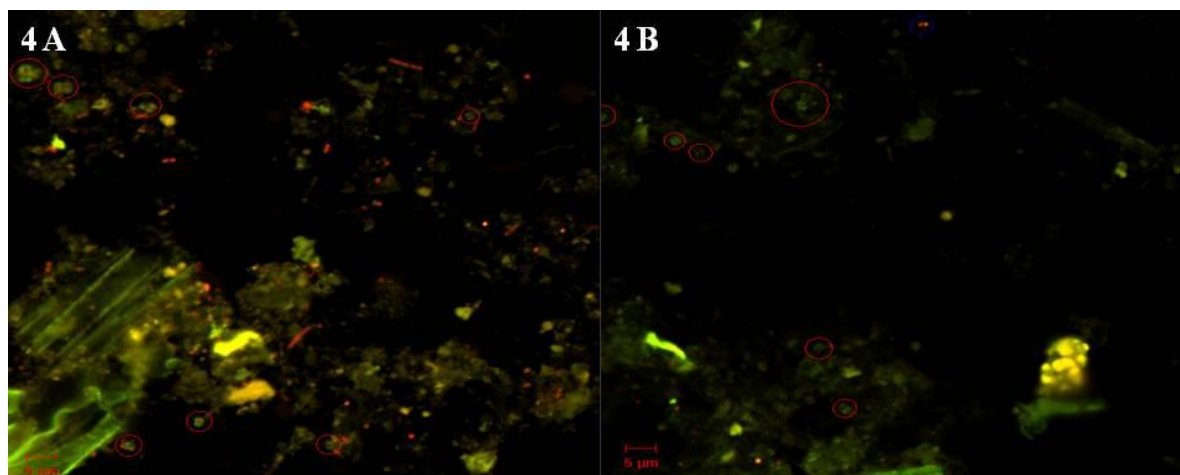
Figur 3.26. Mikroskopering av FISH preparat fra blanding 30/20. 2A viser sporulerende celler (pekt på med rød pil) fra uke 2. De sporulerende cellene er ca. 4-5 µm, sett ut fra den angitte størrelsesorden nede til venstre i bildet. 2B; Pilen markerer celler som kan være grønne staver og røde kokker, eller sporulerende celler. Bildene er fra uke 2 og 4.

40CM/10FE: sporulerende celler som avga grønn fluorescens, ble observert fra uke 1- 3(3B). Observasjon av staver og kokker som avgir både rød og grønn fluorescens. En spesiell observasjon viser bakterier (kokker), tett inntil arker (staver) vist i 3A.



Figur 3.27. Mikroskopering av FISH preparat fra blanding 40/10. 3A viser bakterier (røde kokker) tett inntil arker (grønne staver). Bildet er tatt fra uke 1. 3B; viser forekomst av sporulerende celler (merket med rød og hvit ring), fra uke 1.

50CM/0FE: Stor forekomst av *Methanosarcinales* ble observert i alle fire uker jfr. Figur 4A og 4B. Noe svakere hybridisering kan observeres i uke 4. I tillegg viser 4A generelt stor forekomst av mikroorganismer som avgir både rød og grønn fluorescens.



Figur 3.28. Mikroskopering av FISH preparat fra blanding 50/0. 4A viser stor forekomst av bakterier og *Methanosarcinales* markert med røde ringe. Bildet er fra uke 1. 4B viser forekomst av *Methanosarcinales* fra uke 4. Bildet viser noe svakere hybridisering.

4 Diskusjon

Denne oppgaven har vært todelt. Analyser av gass og metanproduksjon har vært *en* del og bruk av molekylære metoder for å studere det mikrobielle samfunnet har vært den andre. Da målet med denne oppgaven har vært å få en større innsikt i det mikrobielle samfunnet i en biogassreaktor (jf. 1.9), vil kun en liten del av diskusjonen gå inn på resultater som er oppnådd rundt gassproduksjon.

4.1 Gassproduksjon

Figur 3.7 viser total akkumulert gass fra de fire reaktorblandinger som ble brukt i oppgaven. Grafen viser akkumulert gass for reaktorer som forble uåpnede under hele forsøket, samt reaktorer som ble åpnet annen hver dag de 30 første dagene forsøket pågikk.

Gassproduksjonen er jevn for samtlige paralleller i blandingene 50/0 og 30/20. For 20/30 og 40/10 er den totale gassproduksjonen noe mer varierende; dette gjelder spesielt for reaktorblandingen 40/10. Grunnen til denne variasjonen ble diskutert. En feil i forbindelse med oppstart kan være en mulig forklaring. Et kontrollforsøk ble da satt i gang for å undersøke dette. Figur 3.8 viser resultatet av kontrollforsøket sammenlignet med resultatet oppnådd i hovedforsøket. Samme tendenser til varierende gassproduksjon i parallellene ble også observert her. Grunnen til at dette skjer er det vanskelig å gi noen forklaring på. For dårlig blanding av substratene kan være en mulig årsak, men da varierende gassproduksjon forekom i begge forsøk, er dette lite sannsynlig.

Spesifikk gassproduksjon er fremstilt i Figur 3.9. Resultatet viser en jevn stigning av gass for reaktorblending 40/10, noe mindre 50/0 og minst for 30/20. Grunnen til at gassproduksjonen avtar kan være flere, men en mulig forklaring kan være nedgang i metabolsk aktivitet grunnet begrenset tilgang på substrat.

Beregninger viser at reaktorer med substrat fra storfegjødsel gir størst spesifikk metanproduksjon. I forhold til total akkumulert gass (Figur 3.7) ville man kanskje forvente at spesifikk metanproduksjon var høyere for rektorblandingen 40/10. Når dette ikke var tilfelle, kan forklaringen være at stor gassproduksjon ikke er ensbetydende med høy metanproduksjon i anaerobe miljø. Det har ikke lyktes å finne litteratur som har beregnet spesifikk metanproduksjon i tilsvarende forsøk for blandinger av storfegjødsel og fiskeensilasje. En tidligere masteroppgave utført på UMB av Bjune (2009), beregnet spesifikk metanproduksjon for ren storfegjødsel. Dette viste et metanpotensial på 120 l pr kg VS-1.

I dette forsøket viste reaktorer med størst konsentrasjon av storfegjødsel en spesifikk metanproduksjon på $0,1 \text{ m}^3$ per kg VS, noe som tilsvarer i underkant av 100 liter per kg VS. Spesifikk metanproduksjon viste seg altså å være noe lavere i denne oppgaven. Grunnen til dette kan være at spesifikk metanproduksjon i denne oppgaven ble beregnet ut fra åpne reaktorer mens for Bjune (2009) ble dette beregnet for lukkede reaktorer.

Spesifikk metanproduksjon ble beregnet ut fra akkumulert gass den dagen GC ble gjennomført (jf. 2.3.1). Figur 3.10 viser spesifikk metanproduksjon for åpne reaktorer. I forhold til total gassproduksjon (også fremstilt i grafen) viser dette at spesifikk metanproduksjon har en større stigning i starten av forsøket for 50/0 mens for de resterende 30/20 og 40/10 skjer en markert økning i konsentrasjonene av metan produsert først etter 70-80 dager. Dette kan antyde fiskeensilasje forårsaker at biogass prosessen går sakter og at man måtte hatt lenger tid for å kunne se det totale metanpotensialet for disse reaktorblandingen. Den tidlige økningen av metanproduksjonen for blandingen 50/0 kan tyde på at tilstedeværelsen av metanogener i oppstartsperioden er høyere enn i de andre reaktorblandingen. Det er kjent at storfe har metanproduksjon og tilstedeværelse av metanogener i vomma (O'Mara 2004). I tillegg er pH (Figur 3.6) nær optimum for disse. (jf. 1.4).

Prosent forekomst av metan og karbondioksid er fremstilt i Figur 3.11 og 3.12. Dette er et direkte resultat av analyse ved bruk av GC. Biogass består i hovedsak av høyere konsentrasjoner av metan enn karbondioksid, noe avhengig av mengden fett, karbohydrater og protein tilstede (jf. Tabell 1.2). Det er derfor forventet at metanprosenten vil være større enn karbondioksidprosenten. Dette er overensstemmende med funnene vist i de to grafene jfr. høy CO_2 prosent ved oppstart for 30/20 og 40/10 (Figur 3.12), men synker når metanprosenten øker (Figur 3.11). En markert nedgang i metan kan observeres for 40/10 etter 66 dager. Dette kan skyldes at samtlige membraner ble skiftet for denne reaktorblandingen etter 65 dager. Denne nedgangen kan være noe misvisende på Figur 3.11 på grunn av få målinger etter 30 dager. Det er ikke sikkert at prosent metan har en jevn nedgang som figuren viser, men konsentrasjon av metan kan ha vært høy helt fremt til dag 65 da membranen ble skiftet. Oksygen kan ha påvirket det anaerobe miljøet og være årsaken til endringer i metanproduksjonen i reaktoren. Et fall i prosent metan blir også observert for 50/0 fra dag 20 til dag 30. I denne perioden ble reaktoren jevnlig åpnet for prøveuttak, og dette kan på indikere at reaktoren på lignende måte som 40/10 ble påvirket av dette.

Prosent CH₄ og CO₂ kan gi oss kunnskap om type substrat som danner grunnlag for metanproduksjon. Ut fra Tabell 1.2 kan en anta at metan i hovedsak dannes ved nedbryting av protein (~30 % CO₂ og 60 % CH₄) Analyser utført av Eurofins (vedlegg 8) viser at fiskeensilasje inneholder 14 % fett. Dette er med å styrke denne antagelsen.

4.2 Det mikrobielle samfunnet i en bioreaktor

Figur 3.19 og 3.20 viser forekomst av bakterier og archaea analysert ved bruk av en RDP database, hvor terskelverdien (grad a likhet for å henvise til en art) ble satt til 50 % for alle ledd i en taksonomisk rangering.

Blant bakterie OTUer var det størst forekomst av tre fyli; *Firmicutes*, *Bacteroidetes* og *Proteobacteria*. Innad i disse fyliene var *Ruminococceae* den mest dominante familien blant *Firmicutes*, *Flavobacteria* for *Bacteroidetes* og *Pseudomonadaceae* den mest dominerende klassen for *Proteobacteria*. Arter innad i *Ruminococceae* er observert i vomma hos drøvtyggere og kan leve i miljø med CO₂ og H₂ (Deublein & Steinhauser 2011). *Flavobacteria* forekommer i acetogenese, og er avhengig av syntrofy med hydrogenkonsumerende organismer. (Deublein & Steinhauser 2011). *Pseudomonadaceae* har vist seg å være aktiv ved nedbryting av lipider til lange fettkjeder og glykol (El-Bestawy *et al.* 2005).

Firmicutes, *Bacteroidetes* og *Proteobacteria* ble observert som dominerende fylum i denne oppgaven, det samme ble gjort av Jaencike *et al.* (2011) som ved bruk av 454 pyrosekvensering, så på forekomst av bakterier og arker ved nedbryting av polysakkaridet. Forsøk utført av Krause *et al.* (2008) og Kampmann *et al.* (2012) viste dominans av *Firmicutes* og *Bacteroidetes*, men det var noe varierende hvilke av fyliene som dominerte. Det spekuleres i årsaken til denne variasjonen. En årsak kan her være at de ulike forsøkene brukte ulike substrat. Kampmann *et al.* (2012) brukte reaktorer med en blanding av flytende storfegjødsel og grisegjødsel, mens Krause *et al.* (2008) i hovedsak brukte maisensilasje. I dette forsøket brukte vi en blanding av fiskeensilasje og storfegjødsel. En variasjon av ulike substrater vil gi et variert innhold av fett, karbohydrater og proteiner, som igjen vil føre til en varierende forekomst av ulike bakteriegrupper (jf. 1.3.2).

Forekomsten var stor for *Firmicutes* og *Bacteroidetes*, men begge fylkene viste liten grad av diversitet. *Firmicutes* viste tre ulike klasser; *Bacili*, *Clostridia* og *Erysipelotrichia*, mens *Bacteroidetes* var representert med følgende tre klasser: *Flavobacteria*, *Bacterioidia* og *Sphingobacteria*. *Proteobacteria* hadde størst diversitet av de tre dominerende fylkene og var representert med fem ulike klasser (*Alfa*, *Beta*, *Delta*, *Gamma* og *Epsilonproteobacteria*).

I tillegg til forekomst tar resultatet for seg antall sekvenser detektert for hver enkelt OTU (Figur 3.21). Figuren tar for seg de ni bakterier med størst antall sekvenser per OTU. For *Bacteroidetes*, hadde familien som viste størst forekomst også enkelt OTUer med flest antall sekvenser (*Flavobacteria*). For fylumet *Firmicutes* var *Peptostreptococcaceae* den familien som hadde en enkelt OTU med flest antall sekvenser. Dette gjaldt også totalt for alle identifiserte OTUer. I RDP søket opptrer denne familien som den med tredje størst forekomst innad i fylumet *Firmicutes*. Grunnen til at denne familien hadde størst forekomst av sekvenser kan ses i sammenheng med substratet som benyttes. Fiskeensilasje inneholder store mengder protein og fett (vedlegg 8). Familien *Peptostreptococcaceae* og slekten *Clostridium* er observert å være aktive både ved nedbryting av proteiner og skille ut lipaser til nedbryting av fett i hydrolysen (Petersen & Daniel 2006; Ramsay & Pullammanappallil 2001). En annen faktor som kan bidra til denne teorien vises i Figur 3.8. Her vises endring av pH over tid, noe som viser at pH stiger i samtlige blandinger. Som nevnt innledningsvis vil pH ved nedbryting av protein frigjøre ammonium (Boe *et al* 2006). For fylumet *Gammaproteobacteria*, var *Oceanospirillaceae* den familien som hadde flest sekvenser innad i en sekvens. Det ble ikke funnet litteratur som viste at *Oceanospirillaceae* hadde tilknytning til biogass prosessen.

Det ble identifisert 17 archaea OTUer, hvor alle hørte inn under fylumet Euryarchaeota. Av disse hadde familien *Methanobacteriaceae* størst forekomst og den mest dominante slekten var *Methanobrevobacter* (Figur 3.20). *Methanobacteriaceae* viste også flest antall sekvenser innad i en enkelt OTU fremstilt i Figur 3.22. At *Methanobacteriaceae* viste størst forekomst samsvarer ikke med observasjoner gjort i tilsvarende forsøk utført av Krause *et al.* (2008), Nelson *et al.* (2011) og Kampmann *et al.* (2012) som alle observerte *Methanomicrobiaceae* som mest dominant blandt methanogener. Det kan spekuleres i grunnen til dette; en årsak kan være cellelysis. Bergmann *et al.* (2010a) utførte ett studie på ulike ekstraksjons- og renseprotokoller for videre bruk i qPCR. Studiet viste at ved mekanisk lysis var amplifisering av *Methanomicrobiales* størst, og ved lysozym/SDS-basert lysis ga dette størst amplifisering av *Methanomicrobiales*. Både Krause, Nelson og Kampmann brukte alle Lysozym basert ekstraksjon, men dette forsøket benyttet mekanisk lysis. *Methanobacteriales* har en cellevegg

bestående av pseudomuring (Kandler & König 1998), som lysozym ikke klarer å kløye (Visweswaran *et al.* 2010) og kan være forklaringen på at *Methanobacteriales* er representert i større grad i denne oppgaven i forhold til de andre forsøkene.

Methanomicrobiaceae viste størst forekomst, og den som hadde flest antall sekvenser innad i en OTU etter *Methanobacteriaceae*. Tatt i betraktning at over 70 % av alle archaea til stede ble identifisert som *Methanomicrobiaceae* eller *Methanobacteriaceae* som begge er hydrogenotrofe og danner metan ved å redusere CO₂ (jf. 1.2 og 1.3.2), kan det på dette grunnlaget antas at hydrogenotrof metanogenese var dominerende i de tre reaktoren som produserte metan. Det kan også antas at prosent CO₂ (Figur 3.12) ikke ville stige når dette forbrukes i metanprosessen. En teori kan være at organismer som var aktive i prosessene før metanogenese er større enn metanogener. En annen teori kan være at økningen skjer etter at prøvetaking ble avsluttet, og at CO₂ økte når reaktorene fikk ”stå uberørt”.

Resultatet fra qPCR fremstilt i Figur 3.15 – 3.17 viser mengden archaea, *Methanomicrobiales* og *Methanosarcinales*. De spesifikke primerne ble valgt med bakgrunn i kjent kunnskap i forbindelse med studier av biogassreaktorer (Bergmann *et al.* 2010b; Lee *et al.* 2010).

Resultatet er beregnet ut fra den interne kontrollen med kjent konsentrasjon. Det ble ikke laget noen standardkurve for den interne kontrollen, derfor lot det seg ikke gjennomføre og beregne konsentrasjonen av startmaterialet; bare forholdet mellom de ulike organismene ble beregnet. Mengden av total archaea og *Methanomicrobiales* antyder større forekomst for reaktorblandingen 30/20, 40/10 og 50/0 (storfegjødsel/fiskeensilasje). Dette er forventet ut fra Figur 3.10, da denne viser at metan bare forekom i disse reaktorene. En markert økt forekomst av *Methanomicrobiales* enn *Methanosarcinales* er med på å styrke begrunnelsen for at reaktoren var dominert av hydrogenotrof metanogenese. Mengden *Methanosarcinales* er størst for blandingen 50/0 og samsvarer med et forsøk utført av Karakashev *et al.* (2005), som observerte størst forekomst av *Methanosarcinales* i reaktorer med storfegjødsel.

Av 868 sekvenser var 98 % bakterie OTUer, mens ca. 2 % tilhørte archaea. Fra tilsvarende forsøk detekterte Krause *et al.* (2008) 2,5 %, Nelson *et al.* (2011) 4,5 % og Jaenike *et al.* (2011) 11 % (GSFLX) og 8 % (Titanium) archaea i en reaktor. I denne oppgaven kan en registrere at den universale primeren underestimerer archaea, som også vil gi et feil forhold mellom archaea og bakterier fra biogassproduksjon. Dette kan begrunnes med resultatet fra qPCR (ikke vist), hvor C_T verdien for den generelle primeren var lik eller til og med lavere

enn C_T verdiene med en generell archaea primer, noe som skulle tilsi at forekomst av archaea er større enn hva PRK viser.

For metanogener amplifisert med spesifikke prober viser *Methanomicrobiales* en markert større forekomst enn *Methanosarcinales*. Dette stemmer overens med Figur 3.22 hvor antall sekvenser per OTU er markert høyere for *Methanomicrobiales*, som igjen antyder en generell større forekomst. For resultatet fra qPCR viser dette at forekomst av spesifikke metanogener (*Methanomicrobiales*) er nesten like høy som total forekomst av archaea. Resultat fra Illuminasekvensering viser at forekomsten av *Methanobacteriales* var større enn *Methanomicrobiales* og en ville forventet en lavere mengde av *Methanomicrobiales*. For den generelle primeren ble det benyttet EvaGreen® (SYBR® Green, jf. 2.5.3) og probe. Probe vil i større grad amplifisere til flere amplikon enn EvaGreen®, og dette kan være grunnen til at C_T verdiene for henholdsvis archaea og *Methanomicrobiales* er omtrent den samme, men i realiteten er forholdet mellom archaea og *Methanomicrobiales* større.

Foruten forekomst og diversitet var det fokus på utvikling av det mikrobielle samfunnet over tid. Sekvenseringsresultat ble sortert tilbake til prøvedato, og forekomst over tid ble studert for henholdsvis bakterie og archaea OTUer. Resultatet (vedlegg 6) viste svært lite mønstre eller trender både innad i hver enkelt reaktor, og i forhold til andre reaktorer med andre blandingsforhold. På grunnlag av dette er det ikke sett på som hensiktsmessig å framlegge disse resultatene. Det må tas hensyn til at en teknisk feil kan ha skjedd i forbindelse med bearbeiding av data, som kan ha ført til at prøvene ikke er blitt sortert korrekt. Verken archaea eller bakterier viste noen markerte kvantitative endringer over tid (30 dager). Endringer over tid ble studert for organismer tilstede ved hydrolyse og fermentering, acetogenese, og i selve metanogenese.

I tillegg til Illuminasekvensering ble en direkte sekvensering utført, og ut fra resultatet av direkte sekvensering ble det gjennomført PCA. Direkte sekvensering vil ikke ha kapasitet til å dekke det komplekse mikrobielle samfunnet i en biogassreaktor, men vil kunne bidra til å se dominante grupper. Figur 3.23 viser en sammenstilling av PC 1 og PC 2. Grupperingen som ses, tilsvarer punkter med stor grad av likhet. Alle reaktorblandinger viser noe grad av diversitet fra oppstart og frem til dag 12. Etter 12 dager viser alle reaktorblandinger med unntak av 20/30 større grad av konvergens. 20/30 har antyder også en gruppering, men denne er ikke like markant som for de tre resterende blandinger. Figuren viser også at grupperingen skjer i ulike områder for de fire ulike blandinger som kan antyde at det mikrobielle

samfunnet er miljøavhengig og påvirkes av mengde fiskeensilasje og storfegjødning i reaktoren. Videre arbeid må gjennomføres for å få mer kunnskap om dette.

For å undersøke en eventuell sammenheng mellom direkte sekvensering og Illuminasekvensering ble det gjennomført en regresjonsanalyse mellom MCR komponenter fra PCA og normaliserte data for tre ulike OTUer som samsvarte ved RDP søk. Grad av likhet ble undersøkt helt ned til slekt. Resultatet (vedlegg 6) viste ingen form for sammenheng, og det var heller ingen signifikans mellom dem. Dette viser at de to typene data ikke var sammenlignbare, og ut fra grafene kan det se ut til at MCR dekker mye bredere grupper av organismer enn OTUer. I tillegg viser MCR større dominans innad. Eventuelt videre arbeid ville være å konstruere et slektstre for Illumina resultatene, og ut fra dette sette sammen OTUer som viste nær slektskap, og igjen ut fra dette danne MCR komponenter som da kunne blitt sammenstilt. Tidsbegrensninger ville uansett ikke gjort det mulig å gjennomføre dette i denne oppgaven.

Bakgrunnsstøy og autofluorescens gjorde det umulig å gjennomføre en kvantifisering ved bruk av FISH og ville antageligvis ført til underestimert mht. tilstedeværelsen av både archaea og bakterier. Svak fluorescens gjorde det vanskelig å avgjøre om en celle hadde hybridisert, eller ikke. Ved andre tilfeller førte mye bakgrunnsstøy til vanskeligheter mht. å avgjøre om observerte komponenter var celler eller støy. Autofluorescens og dårlig hybridisering gjentok seg ikke over hele preparatet. Hvor det var mulig ble det derfor resultatet benyttet til å identifisere organismer og undersøke trender eller utvikling av det mikrobielle samfunnet i den grad dette lot seg gjøre.

Ved å studere FISH resultatene i mikroskop, ble to organismer med karakteristisk morfologi oppdaget. Den ene ble antatt å være *Methanosarcinales* mens den andre ble antatt å være en *Clostridium*. *Methanosarcinales* har en svært karakteristisk morfologi kalt pseudosarcinale strukturer (Ferry & Kastead 2007). Figur 3.24 visualiserer utseende og kan i korte trekk beskrives som fire kokker samlet i en bestemt formasjon. Figuren viser en antatt *Methanosarcina* mot en referanse hentet fra (Winstead 2002). Referansen viser *Methanosarcina* ved en høyere forstørrelse, men den karakteristiske strukturen er godt synlig i begge bilder.

En annen organisme som skilte seg ut, antas å være en *Clostridium*, som kan være koblet opp både mot hydrolyse, fermentering og acetogenese (jf. 1.3.2.). Antagelsen er gjort på grunnlag av cellens spesifikke morfologi og kan beskrives som en stavbakterie med en oppsvulming på

enden. Dette kan indikere en sporulerende organisme. *Clostridium* er en sporulerende bakterie, den er anaerob og er en bakterie som er tilstede både ved i hydrolyse og fermentering i biogassproduksjon (jf. 1.3.2). I tillegg, som nevnt tidligere ble flere OTUer detektert som slekter av *Clostridium* og er med å styrke denne teorien. *Clostridium* observeres i hovedsak for blandinger med 50 % storfegjødsel og 33,33 % fiskeensilasje og 66,67 % storfegjødsel og 16,67 % fiskeensilasje, som viser til *Clostridium*s aktivitet i forbindelse med nedbryting av fett og proteiner, og som også forklarer at den er lite observert i reaktorer bestående av 83 % storfegjødsel da innhold av protein og fett her er adskillig mindre.

Methanosarcina observeres i hovedsak i blanding 50/0, og forekomsten er størst i uke 1. Det observeres flere bilder med *Methanosarcina* for uke 2-4, men med mye mindre grad av fluorescerende signal. At denne typen av metanogener er observert med et substrat i hovedsak bestående av storfegjødsel, stemmer overens med observasjon gjort av Karakashev *et al.* (2005). I de andre blandningene observeres også *Methanosarcina*, men i langt mindre grad, og deteksjon skjer ofte mot slutten av perioden (uke 3-4). For 40/10 er det gjort en interessant observasjon av grønne staver (arker) tett inntil røde kokker (bakterier). En kan gjøre seg mange tanker/teorier omkring dette. Det kan være en eller annen form for syntrofe. Forutsatt at det er en syntrofe mellom arker og bakterier, kan man knytte dette opp mot acetogenese og metanogenese. Organismer som *Synotrobacter* er identifisert som forekomst av flere OTUer ved RDP søket. Mer analyse må gjøres for å kunne si noe mer om dette.

4.3 Konklusjon

Denne oppgaven har bidratt økt forståelsen rundt det mikrobielle samfunnet i en biogass reaktor med innhold av fiskeensilasje og storfegjødsel. Ved bruk av Illuminasekvensering har resultatene fremstilt hvilke bakteriefyli som dominerte (*Firmicutes* og *Bacteroidetes*) og hvilke klasse av metanogener som viste størst dominans (*Methanobacteriales*). Metoder som qPCR og FISH har bidratt til å understreke noen av de observerte resultatene fra Illuminasekvensering mens direkte sekvensering har demonstrert at samfunnet viste mindre grad av ulikheter fra dag 12 og utover. Gassmåling og gasskromatografi har vist gass- og metanpotensialet mellom reaktorer med ulike blandinger av storfegjødsel og fiskeensilasje. Oppgaven har foruten resultatene bidratt til utprøving av nye metoder, som har lagt til rette for videre arbeid inne relaterte forsøk, men også innen andre felt. Noe som må ses på som svært positivt.

4.4 Refleksjoner over egne resultater.

Med henhold til drift av reaktorer kan man konkludere med at dette ble gjennomført som planlagt.

Det er flere usikkerheter rundt de metodene som er brukt og resultatet som er oppnådd. Det som kan sies med sikkerhet i forhold til det man finner i annen relatert faglitteratur, er at en i de ulike brukte reaktorblandingen hadde en dominans av bakterier tilhørende fyllet *Firmicutes* og *Bacteroidetes*. At *Methanobacteriales* viste seg å være dominant blant metanogener i denne oppgaven, stemmer ikke overens med funn fra andre forsøk. Ingen av de andre forsøkene har brukt fiskeensilasje som substrat, og dette kan være en forklaring. Da det ikke er funnet litteratur som omhandler kartlegging av mikrobielle miljø i reaktorer som benytter seg av fiskeensilasje, er det vanskelig og si om resultatet er som forventet, eller om en feil kan ha skjedd i forbindelse med prosessen. Det har vært diskutert om bruk av mekanisk lysis kunne være årsaken. I et forsøk ble det sett favorisering av enten *Methanomicrobiales* eller *Methanosarcinales* alt ettersom hvilken type cellelysis som ble brukt.

I tillegg til identifisering ble det undersøkt om det mikrobielle samfunnet viste noen form for trender i oppstartsperioden. Det har ikke vært mulig å observere noen utvikling over tid, med unntak av prinsippal komponentanalyse gjort ut fra resultat av direkte sekvensering. Her ble det observert samlinger for hver blanding, og at systemet syntes å bevege seg mot en form for likevekt. Ut over dette kan det ikke sies noe spesifikt om utviklingen til enkelte bakterie eller grupper av archaea.

Mye informasjon er diffus, men ved å se mellom linjene, vil en kunne se at ved å ta noe informasjon oppnådd med en teknikk og sammenligne denne med resultater fra andre, kunne se samsvar mellom de forskjellige funnene. Den spesifikke metanproduksjon beregnet fra GC resultat er logisk i forhold til qPCR resultatet med tanke på mengde archaea og metanogener tilstede i de ulike blandingen. En vesentlig høyere forekomst av *Methanomicrobiales* enn *Methanosarcinales* samsvarer med qPCR resultat og RDP søk gjort av OTUer fra Illumina resultat.

Alt i alt er ny informasjon oppnådd ved bruk av en rekke metoder. Bruk av metoder og til tider optimalisering var ikke ment som en del av dette forsøket derfor er det ikke lagt stor vekt på dette i diskusjonen. Her skal det understrekes at flere av disse metodene ikke er kombinert tidligere, og flere steg har blitt sett på som ”vi får bare prøve”. Ut fra dett er det oppnådd flere resultater enn hva man egentlig forventet, og tidsbegrensinger har vært en faktor som har gjort

at det ikke er forsøkt å få ut mer informasjon av blant annet Illumina resultater (det finnes mer data som ikke er analysert enda). Forsøket legger til rette for videre bearbeiding av allerede oppnådde resultat, men også videre arbeid og optimalisering av teknikker og metoder.

5 Evaluering av metoder og videre arbeid

Oppgaven har blitt gjennomført med flere ulike metoder. Denne avsluttende delen vil ta for seg parametere og hensyn som er tatt i forbindelse med metodene som er gjennomført samt erfaring underveis. En vil også drøftes feilkilder som kan ha påvirket de oppnådde resultatene. Helt til slutt drøftes kort forslag til videre arbeid.

5.1 Oppstart og drift samt behandling av biogassreaktorer

Substrat benyttet i forsøket ble lagret i store beholdere på kjølerom (4 °C). Før substratet ble overført, ble det foretatt kraftig røring i beholderne for å oppnå en mest mulig homogen blanding. Fordi substratet ble lagret kaldt, er det ikke beregnet eventuelt tap i gasspotensialet under lagring.

For å frigjøre mest mulig organisk materiale fra aggregater etc. ble storfe gjødsel homogenisert. Dette var ikke nødvendig med fiskeensilasjen, da denne var tilnærmet homogen. Homogenisering ble utført ved å bruke en blender. Dette medførte tilførsel av luft i substratet, noe som gjorde det vanskelig å arbeide med (skumming). I et kontrollforsøk i februar ble en stavmikser benyttet; dette var et bedre alternativ da det ikke tilførte luft i substratet. Dette anbefales derfor som verktøy for homogenisering.

Måling av gassproduksjon ble foretatt med en sprøyte. De 20 første dagene ble det brukt plastikk sprøyter med tre ulike volum, mens en glassprøyte ble brukt under resten av forsøket (dag 22-101). Det kunne virke som det var større friksjon mellom sylindere og stempel i plastikk sprøytene enn i glass-sprøyten. Dette kan ha ført til feil ved gassmåling og ville i hovedsak ha konsekvens for reaktorer som ble åpnet under forsøket. Derfor ble det i disse 20 dagene brukt plastikk sprøyter med tre ulike volum for å prøve å minske denne feilkilden (mindre sprøyter til reaktorer med mindre gass. Jf. mindre sprøyter - mindre friksjon). Det nevnes uansett som en potensiell feilkilde. Følgelig kan ikke total akkumulert gass defineres som fullstendig korrekt. Kanylen som er benyttet har egenskapen sideport, som betyr at hullet sitter på siden på nålen og ikke på tuppen. Dette minsker sjansen for å ødelegge membranen og er med på å hindre gasslekkasje.

For alle reaktorene som ble åpnet, ble dette gjort i aerobe forhold grunnet manglende tilgang til annet egnet utstyr. Reaktorene sto ”åpne” i svært korte tidsrom og ble deretter flushet med 100 % nitrogengass. Flaskene ble flushet i ca. 10 sekunder. GC analyse ble gjennomført av en tilfeldig valgt reaktor etter evakuering av oksygen. Dette ble kun gjennomført i begynnelsen

av forsøket. Oksygenkonsentrasjonen ble beregnet før og etter flushing og viste et innhold på 10 % før og 3 % etter flushing. Flushing anses derfor som et alternativ til å opprettholde et anaerobt miljø ved mangel på dertil egnet utstyr. Bruk av utstyr som anaerob hanskeboks vil nok ha vært et bedre alternativ, hvis dette hadde vært tilgjengelig. I tillegg til at reaktorene ble flushet etter åpning, ble alle reaktorer flushet ved oppstart for raskere å opprette et anaerobt miljø.

pH ble målt i blandingene men ble ikke endret med overlegg for å undersøke om reaktorer med lav pH ville være i stand til å stabilisere seg uten ekstern hjelp. Dette viste seg ikke å skje i reaktorer med 20CM/30FE. I et kontrollforsøk utført i februar med fokus på å studere spredt gassproduksjon blant reaktorene med 40CM/10FE (vedlegg 6) ble to reaktorer satt i gang med 20CM/30FE. pH i reaktorene ble justert til ~7,0 med KOH, og ble inkubert ved samme betingelser som for hovedforsøket. Resultatet kan ses i vedlegg 6 som viser metanproduksjon detektert med TCD. Dette er med å understreke at justering av pH eksternt må gjøres for å kunne oppnå metanproduksjon i substrat med i utgangspunktet lav pH. Det anbefales at en i det videre arbeid med fiskeensilasje som substrat, justerer pH ved oppstart.

Opplegg for blanding av forskjellige substrat ble foretatt på grunnlag av forventet gassproduksjon. Oppstartsperioden ble satt til 30 dager på grunn av tidsbegrensinger. I et forsøk med laksesmolt utført av Gebauer og Eikbrokk (2006) gikk forsøket over 155 dager hvorav 75 av disse var oppstartsperioden. Dette kan tyde på at oppstartsperioden i dette forsøket har vært for kort. Det ble også observert en stor gassproduksjon i reaktorer etter at forsøket var avsluttet (ikke tatt med), som viser at flere av blandingen var avhengig av lang tid for og «komme i gang». Og er med å styrke begrunnelsen om at perioden var for kort.

Det må også tas hensyn til at resultater som spesifikk metanproduksjon og spesifikk metanproduksjon er beregnet i reaktorer som har blitt åpnet. Resultatet her vil ikke være fullstendig korrekt, da miljøet i bioreaktorene kan ha blitt påvirket av ytre faktorer ved åpning. Beregningen er allikevel gjort for å kunne sammenligne gassanalysene med andre forsøk som qPCR og sekvensering.

5.2 FISH

Hensikten med FISH er kvantifisering av bakterier og arker og brukes som et sammenligningsgrunnlag mot resultater fra kvantitativ PCR. I tillegg var det et ønske å kunne identifisere ulike mikroorganismer ut fra morfologi. For å gjennomføre dette ble to prober benyttet; EUB 338 for deteksjon av bakterier og ARC 915 for deteksjon av arker. Probene ble merket med to ulike fluoriserende farger, Cyanine 3 (Cy3) for bakterier og 5-Carboxyfluorescein (5-FAM) for archaea. De to merkene hadde eksitasjon ved henholdsvis 488 (5-FAM, grønt emisjonsfilter) og 545nm (Cy3, rødt emisjonsfilter). Dette gjorde det mulig og studere forholdet mellom arche og bakterier i en og samme prøve. Undersøkelsen ble gjort med en probekonsentrasjon på 20mM. Tilsvarende ble gjort av Bjune (2009) som brukte FISH på samme måte som i dette forsøket. FISH ble utført direkte etter prøveuttak for å unngå degradering av RNA.

Som nevnt viser resultatet mye autofluorescens og ofte svak hybridisering. Det kan spekuleres i hva som kan ha gått galt her. Det kan være tekniske feil hvor metoden ikke har fungert som den skal. Både fiksering og hybridisering er kritiske steg (Batioğlu *et al.* 2007; Moter & Gobel 2000), ofte kan minimale temperaturendringer før til at man ikke oppnår det resultatet man forventer. Andre feilkilder kan være bruken av paraformaldehyd. Protokollen anbefalte bruk av paraformaldehyd som var > 24 timer. Etter en forespørsel til A. M. Bomo som har vært med å utvikle protokollen, ble det bestemt å ikke lage ny for hver gang. I ettertid kan en lure på om det ikke hadde vært best å følge protokollanbefalingen. Hybridisering kan også skyldes liten metabolsk aktivitet. Som nevnt innledningsvis hybridiserer proben til RNA (jf. 1.8.1), noe som krever at organismene er metabolsk aktive, ellers vil RNA raskt degraderes.

Autofluorescens kan også skyldes bruk av for høy konsentrasjon av probe. Bjune (2009) brukte Cy3 som fargestoff for begge prober, mens vi i denne oppgaven brukte to forskjellige. Det var ikke noen på laboratoriet som hadde erfaring med 5-FAM, og optimalisering kunne derfor vært bedre. Bakgrunnsstøy, må også tas med som en viktig faktor. I et forsøk på å unngå dette var det oppgitt i Bjune (2009) at prøver kunne tilsettes vann i en fortykning 1:10. Prøvene ble ristet til jevn suspensjon. Deretter sto de i ro noen minutter for at partikler skulle synke, for så å ta ut prøver fra toppsjiktet. Prosedyren ble fulgt, men likevel ga dette mye støy. En form for lavhastighetscentrifugering eller filtrering (0,5-1µm) uten at store mengde mikroorganismer gikk tapt, kunne vært et alternativ.

5.3 GC og HPLC

For GC ble volumet av prøvene som ble initiert, kontrollert nøye for at resultatene som ble oppnådd, skulle være mest mulig sammenlignbare. Før prøver ble tatt ut, ble reaktorene ”tømt” for gass for å unngå overtrykk. For at beregning av % CH₄ og CO₂ skulle være så korrekte som mulig, ble fire standarder kjørt hver dag GC ble benyttet. To standarder ble kjørt før prøvene ble initiert; en midt i og en etter siste prøve var kjørt. På denne måten kunne det både kontrolleres at de fire ulike standardene viste samme verdier, og at gjennomsnittet ga et riktigere resultat.

HPLC resultatene ga svært lite informasjon. Dette fordi alle blandinger som inneholdt fiskeensilasje ga store mengder bakgrunnsstøy, og at topper for deteksjon av ulike syrer ikke var mulig å fastslå. Figur 3.13 er tatt med for å demonstrere dette og viser ren fiskeensilasje mot en standard på 100mM, som med på å understreke store mengder støy. Ved deteksjon med UV ved 210nm ville dette gi deteksjon av store mengder organiske komponenter. Dette ville føre til en overbelastning av systemet hvis substratet inneholdt store mengder organiske komponenter. HPLC hadde ikke tidligere blitt utført på reaktormaterialet med fiskeensilasje, og videre arbeid anbefales for en optimalisering av prosessen. Deteksjon av VFA ved bruk av HPLC kan bidra til å indikere ustabilitet i systemet (jf. 1.5.2.), hvor flere syrer kan være med å indikere ubalansen i systemet.

5.4 DNA ekstraksjon

Optimalisering ble gjort før igangsettingen av hovedforsøket. Metodetesting ble foretatt etter at flere ekstraksjoner med GA Stool Bacteria DNA extraction ga dårlig resultat, samtidig som telling av totaltall (Tabell 3.1) viste stor forekomst av mikroorganismer i reaktoren. De tre ulike metodene var; GA Stool Bacteria DNA extraction, FastDNA® SPIN for Soil Kit og MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit *Bead-Based Sample Disruption*. Alle tre ekstraksjoner ble utført av samme materialet.

Etter ekstraksjon, ble det kjørt PCR av prøvene med en generell primer for prokaryote (PRK 341F og PRK806R). Grunnlag for valg av metode ble gjort ut fra resultat oppnådd ved PCR, hvor MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit hadde de sterkeste båndene og det mest stabile resultatet med amplifisering av samtlige prøver ved alle tilsatte volum.

Fra resultatet (Figur 3.1 – 3.3) for amplifisering kunne det skimtes svakt et bånd i brønnen for negativ kontroll. Det ble diskutert om vannet som ble brukt i mastermiksen kunne være kontaminert. Eksakt samme PCR med samme prøver ble kjørt med nytt med autoklavert vann.

Resultatet (ikke vist) viste ingen bånd for negativ kontroll, og bekreftelse for at vannet var kontaminert. Etter dette ble vannet autoklavert før kjøring av qPCR og PCR.

Ved DNA ekstraksjon ble et plasmid med kjent konsentrasjon tilsatt før selve ekstraksjonen. Denne kontrollen ble brukt for å kontrollere at ekstraksjonen gikk som ønsket. Et avvik i konsentrasjonen ville indikere at kulene ikke hadde klart å fange opp DNAet, som igjen kunne indikere en feil i systemet. Siste ekstraksjon viste en lavere verdi den interne kontrollen, men her er sannsynligheten stor for at det ble tilsatt feil konsentrasjon av den interne kontrollen.

5.5 PCR og qPCR

Primere for PCR og qPCR ble hentet fra Yu *et al.* (2005) og to primersett ble i hovedsak brukt i oppgaven. Primerne var ARC (generell for arker) og PRK (generell for prokaryote). Ut over validering av ARC og PRK primer for amplifisering av archaea DNA (Figur 3.4), ble det ikke foretatt noen videre validering jfr. informasjon i artikkelen. Dette gjelder også for de spesifikke probene for *Methanosarcina* (Msc) og *Methanomicrobiales* (MMB), som ble validert som oppgitt i artikkelen.

For å bestemme hybridiseringstemperaturen som skulle benyttes i amplifisering med modifiserte Illumina primere ble en T_m gradient PCR kjørt. Resultatet (Figur 3.5) viste god amplifisering mellom (47– 65.1 °C) og på dette grunnlaget ble en hybridiseringstemperatur på 50 °C valgt. Dette var samme temperatur som ble brukt i Bartram *et al.* (2011) for en opp amplifisering før Illumina sekvensering. Ved bruk av en forholdsvis lav hybridiseringstemperatur (jf. 1.8.3) ville sjansen for mer amplifisering øke, noe som ville inkludere en større del av det mikrobielle samfunnet. Det måtte også tas hensyn til at sjansen for primer-dimer også kunne øke.

Selv om ekstraksjonsmetoden regnes for å være god, ved at bare genomisk DNA skal kunne feste seg til de magnetiske kulene, kan likevel ulike stoffer bli med videre og forstyrre andre prosesser. For qPCR av komplekse mikrobielle miljøer, kan ulike inhibitorer påvirke prosessen. I jord er spesielt ”Humic acide” en kjent inhibitor. Den kan inhibere polymerasen og andre enzymer som er involvert direkte i qPCR (Sutlovic *et al.* 2008). Selv om inhibering kan forekomme, ble det ikke gjort noe i den oppgaven som spesielt fokuserte på å unngå inhibitorer.

5.6 Videre arbeid

Videre arbeid retter seg mot å etterprøve spesifisiteten til ulike primere og kanskje prøve å benytte seg av prober for å ha et bedre sammenligningsgrunnlag av qPCR resultat. Fordi den generelle primeren for prokaryote (PRK) underestimerte forekomst av archaea, vil et alternativ være å gjennomføre en tilsvarende sekvensering, men da benytte seg av to primere, en for archaea og en for bakterier. For bedre å kunne få fram det virkelige forhold mellom bakterier og archaea.

HPLC analyse ga ikke et tolkbart resultat, og en optimalisering av prosessen anbefales, for blant annet å kunne kontrollere eventuell ubalanse i reaktoren. Et forslag vil være å fortynne prøvematerialet, gjennomføre en ny analyse og arbeide videre ut i fra dette.

Arbeidet med å se på sammenheng mellom Illumina sekvensering og direkte sekvensering bør absolutt det arbeides videre med. Forslag til metode for videre arbeid er foreslått i teksten og vil ikke drøftes videre her.

For å undersøke endring over tid vil nok en utvidelse av oppstartperioden være å anbefale. Sannsynligheten for å kunne observere varierende trender for ulike grupper av mikroorganismer vil da være større.

Litteratur

- Ahring, B. K., Angelidaki, I. & Johansen, K. (1992). ANAEROBIC TREATMENT OF MANURE TOGETHER WITH INDUSTRIAL-WASTE. *Water Science and Technology*, 25 (7): s. 311-318.
- Ahring, B. K., Sandberg, M. & Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43: s. 559-565.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L. & Ahring, B. K. (2003). Applications of the anaerobic digestion process. I: Sherper, T. (red.) b. 83 *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, s. s. 1-33. Berlin: Springer.
- Applied Biosystems; TaqMan® and SYBR® Green Chemistries*. (2011). Tilgjengelig fra: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html> (lest 10.4.2012).
- Atlas, R. M. (1993). Handbook of Microbiological Media. I: Parks, L. C. (red.). Florida: CRC Press ink.
- Bagi, Z., Acs, N., Balint, B., Horvath, L., Dobo, K., Perei, K. R., Rakhely, G. & Kovacs, K. L. (2007). Biotechnological intensification of biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (2): s. 473-482.
- Barker, A. H. (1956). Bacterial Fermentations. s. 1-95.
- Bartram, K. A., Lynch, D. J. M., Stearns, C. J., Moreno-Hagelsieb, G. & Neufeld, D. J. (2011). Generation og Multimillion-Sequence 16s rRNA Gene Libraries fra Complex Microbial Communities by Assembling Paired-End Illumina Reads. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (11): s. 3846-3852.
- Batioğlu, M., Sallis, J. P., Cokgör, U. E., Behar, T. C. & A., A. T. (2007). Quantitative FISH of acetoclastic methanogens in two different anaerobic wastewater treatment reactors. *International journal of Molecular, Biology, Biochemistry and Gene Technology*, 3 (1): s. 23-33.
- Batstone, D. J., Keller, J., Newell, R. B. & Newland, M. (2000). Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. I: model development. *Bioresource Technology*, 75 (1): 67-74.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., *et al.* (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456 (7218): 53-59.
- Bergmann, I., Mundt, K., Sontag, M., Baumstark, I., Nettmann, E. & Klocke, M. (2010a). Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and Applied Microbiology*, 33 (2): 78-84.
- Bergmann, I., Nettmann, E., Mundt, K. & Klocke, M. (2010b). Determination of methanogenic Archaea abundance in a mesophilic biogas plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology*, 56 (5): 440-444.
- Bjune, M. C. (2009). *Biogass fra blandinger av storfegjødsel og industrialisert matavfall. - Mikrobiologisk, metodisk og prosessmessige aspekter ved metanproduksjon*. Mastergrads oppgave: Universitet for Miljø- og Biovitenskap, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.
- Boe, K., Batstone, D. J. & Angelidaki, I. (2005). Online headspace chromatographic method for measuring VFA in biogas reactor. *Water Science and Technology*, 52 (1-2): 473-478.
- Boe, K. (2006). *Online monitoring and control of the biogas process* [Ph.D. Thesis]. Denmark.
- Bomo, A. M., Storey, M. V. & Ashbolt, N. J. (2004). Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. *Journal of Water and Health*, 2 (2): 83-96.
- Bond, T. & Templeton, M. R. (2011). History and future of domestic biogas plants in the developing world. *Energy for Sustainable Development*, 15 (4): s. 347-354.
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., J., W. M. & Wolfe, R. S. (1967). Methanobacillus omelianskii, a Symbiotic Association og Two Species of Bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, 59: s. 20-31.
- Cardinali-Rezende, J., Moraes, A. M. M., Colturato, L., Carneiro, E. V., Marriel, I. E., Chartone-Souza, E. & Nascimento, A. M. A. (2011). Phylogenetic and physiological characterization of

- organic waste-degrading bacterial communities. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27 (2): 245-252.
- Chen, Y., Yang, G. H., Sweeney, S. & Feng, Y. Z. (2010). Household biogas use in rural China: A study of opportunities and constraints. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14 (1): s. 545-549.
- Clark, J. (2007). *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - HPLC*. Tilgjengelig fra: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html> (lest 2.5.2012).
- Cooney, M., Maynard, N., Cannizzaro, C. & Benemann, J. (2007). Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. *Bioresource Technology*, 98 (14): 2641-2651.
- de Bok, F. A. M., Plugge, C. M. & Stams, A. J. M. (2004). Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research*, 38 (6): 1368-1375.
- Deublein, D. & Steinhauser, A. (2011). Microorganisms in Methanation. I: b. 2 *Biogas from Waste and Renewable Resources*. Weinheim: Wiley VCH.
- Ding, S. Y., Xu, Q., Crowley, M., Zeng, Y., Nimlos, M., Lamed, R., Bayer, E. A. & Himmel, M. E. (2008). A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (3): 218-227.
- Djatkov, D., Effenberger, M., Lehner, A., Martinov, M., Tesic, M. & Gronauer, A. (2012). New method for assessing the performance of agricultural biogas plants. *Renewable Energy*, 40 (1): 104-112.
- El-Bestawy, E., El-Masry, M. & El-Adl, N. E. (2005). The potentiality of free gram-negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21 (6-7): 815-822.
- Evans, E. A., Evans, K. M., Ulrich, A. & Ellsworth, S. (2011). Anaerobic Processes. *Water Environment Research*, 83 (10): s. 1285-1332.
- Ferrer, M., Martinez-Abarca, F. & Golyshin, P. N. (2005). Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (6): 588-593.
- Ferry, G. J. (1997). Methane: Small Molecule, Big Impact. *Science*, 278: s. 1413-1414
- Ferry, G. J. & Kastead, A. K. (2007). Methanogenesis. I: Cavicchioli, R. (red.) *Archaea: Molecular and Cellular Biology*, s. 288-314. Washington D. C. : ASM Press.
- Gebauer, R. & Eikebrokk, B. (2006). Mesophilic anaerobic treatment of sludge from salmon smolt hatching. *Bioresource Technology*, 97 (18): 2389-2401.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. & Pace, N. R. (1988). PHYLOGENETIC GROUP-SPECIFIC OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PROBES FOR IDENTIFICATION OF SINGLE MICROBIAL-CELLS. *Journal of Bacteriology*, 170 (2): 720-726.
- He, P. J. (2010). Anaerobic digestion: An intriguing long history in China. *Waste Management*, 30 (4): s. 549-550.
- Heid, A. C., Stevens, J., Livak, J. K. & Williams, P. M. (2008). Real Time Quantitative PCR. *GENOME RESEARCH*, 6: 986-994.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992). SIMULTANEOUS AMPLIFICATION AND DETECTION OF SPECIFIC DNA-SEQUENCES. *Bio-Technology*, 10 (4): 413-417.
- Hungate, R. E. (1967). Hydrogen as an Intermediate in the Rumen Fermentation. *Arch. Mikrobiol.*, 45: 158-- 164.
- Hungate, R. E. & Macy, J. (1973). The Roll-Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Bulletins from the Ecological Research Committee , No. 17, Modern Methods in the Study of Microbial Ecology (1973)*: S. 123-126.
- Jaenicke, S., Ander, C., Bekel, T., Bisdorf, R., Droge, M., Gartemann, K. H., Junemann, S., Kaiser, O., Krause, L., Tille, F., *et al.* (2011). Comparative and Joint Analysis of Two Metagenomic Datasets from a Biogas Fermenter Obtained by 454-Pyrosequencing. *Plos One*, 6 (1).
- John, H., Birnstiel, M. & Jones, K. (1969). RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature*, 223: s. 258-287.
- Kampmann, K., Ratering, S., Kramer, I., Schmidt, M., Zerr, W. & Schnell, S. (2012). Unexpected Stability of Bacteroidetes and Firmicutes Communities in Laboratory Biogas Reactors Fed with Different Defined Substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (7): 2106-2119.

- Kandler, O. & König, H. (1998). Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *CMLS, Cellular and Molecular Life Science*, 54: 305-308.
- Kaparaju, P., Ellegaard, L. & Angelidaki, I. (2009). Optimisation of biogas production from manure through serial digestion: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology*, 100 (2): 701-709.
- Karakashev, D., Batstone, D. J. & Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1): s. 331-338.
- Kircher, M. & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays*, 32 (6): 524-536.
- Komemoto, K., Lim, Y. G., Nagao, N., Onoue, Y., Niwa, C. & Toda, T. (2009). Effect of temperature on VFA's and biogas production in anaerobic solubilization of food waste. *Waste Management*, 29 (12): s. 2950-2955.
- Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, A. R., Gartemann, K. H., Krömeke, H., Neuweiger, H., Pühler, A., Runte, J. K., Schlüter, A., Stoye, J., *et al.* (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Bacteriology*, 136: s. 91-101.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jona'k, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., *et al.* (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: s. 95-125.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S. G., O'Flaherty, V. & Hwang, S. (2010). Quantitative and qualitative transitions of methanogen community structure during the batch anaerobic digestion of cheese-processing wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (5): 1963-1973.
- Liu, Y. & Whitman, B., William. (2008). Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. I: Wiegel, J., Maier, J. R. & Adams, W. W. M. (red.) b. 1125 *Incredible Anaerobes From Physiology to Genomics to Fuels*, s. 171-184. Athenes, Georgia: Blackwell Publishing Inc.
- Lozano, C. J. S., Mendoza, M. V., de Arango, M. C. & Monroy, E. F. C. (2009). Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. *Waste Management*, 29 (2): s. 704-711.
- Madigan, M., T., Martinko, J., M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. (2009). Metabolic Diversity: Catabolism of Organic Compounds. I: Berriman, L. & Carlson, G. (red.) *Brock, Biology of Microorganisms*, s. 612-651. San Francisco: Pearson Education Inc.
- Madsen, M. L. (2008). Physiological Ecology: Resource Exploitation by Microorganisms. I: b. 1 *Environmental Microbiology, From genomes to biogeochemistry*, s. 52-106. Malden: Blackwell Publishing Ltd.
- Moter, A. & Gobel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41 (2): 85-112.
- Nakakubo, R., Moller, H. B., Nielsen, A. M. & Matsuda, J. (2008). Ammonia Inhibition of Methanogenesis and Identification of Process Indicators during Anaerobic Digestion. *Environmental Engineering Science*, 25 (10): s. 1487-1496.
- Nelson, M. C., Morrison, M. & Yu, Z. T. (2011). A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, 102 (4): 3730-3739.
- Nielsen, H. B. (2006). *Control parameters for understanding and preventing process imbalances in biogas plant: Emphasis on VFA dynamics*. PhD dissertation: Thecnical University of Denmark, BioCentrum-DTU.
- Noble, R. T. & Fuhrman, J. A. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 14 (2): 113-118.
- O'Mara, F. (2004). *Greenhouse gas production from dairying: Reducing methane production*. Advances in Dairy Technology, Vol 16, b. 16. Edmonton: University Alberta Dept Agr, Food & Nutr Sci. 295-309 s.
- Oremland, R. S. (1988). Biogeochemistry of Methanogenic Bacteria. I: Zehnder, B. J. A. (red.) *Biology of Anaerobic Microorganisms*, s. 641-706. New York: John Wiley & Sons.

- Parawira, W., Murto, M., Read, S. J. & Mattiasson, B. (2005). Profile of hydrolases and biogasproduction during two-stagemesophilicanaerobicdigestion of solidpotatowaste. *Process Biochemistry*, 40 (9): s. 2945-2952.
- Pardue, M. L. & Gall, J. G. (1969). MOLECULAR HYBRIDIZATION OF RADIOACTIVE DNA TO DNA OF CYTOLOGICAL PREPARATIONS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64 (2): 600-&.
- Petersen, M. & Daniel, R. (2006). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22 (5): 431-435.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). CYTOGENETIC ANALYSIS USING QUANTITATIVE, HIGH-SENSITIVITY, FLUORESCENCE HYBRIDIZATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (9): 2934-2938.
- Ramsay, I. R. & Pullammanappallil, P. C. (2001). Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, 12 (4): 247-257.
- Rastogi, G. & Sani, K. R. (2011). Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function and Dynamics in the Environment. I: Ahmad, I., Ahmad, F. & Pichtel, J. (red.) b. 1 *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, s. 29-57: Springer.
- Roane, T. M., Reynolds, K. A., Maier, R. M. & Pepper, I. L. (2009). Microorganisms. I: Maier, R. M., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (red.) b. 2 *Environmental Microbiology*, s. s. 9-36. Burlington: Academic Press inc.
- Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, M. T. & Simonet, P. (2003). Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 39: 183-190.
- Rodriguez, J., Kleerebezem, R., Lema, J. M. & van Loosdrecht, M. C. M. (2006). Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 93 (3): 592-606.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B. & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37 (6).
- Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. (2008). *Methanocella paludicola* gen. nov., sp nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 929-936.
- Schnurer, A. & Jarvis, Å. (2010). Microbiological Handbook for Biogas Plants. *Swedish Waste Management U2009:03*, *Swedish Gas Centre Report 207* (03).
- Stams, M. J. A. & Caroline, P. M. (2009). Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature America*, 7: s. 568-577.
- Sutlovic, D., Gamulin, S., Definis-Gojanovic, M., Gugic, D. & Andjelinovic, S. (2008). Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and kinetics. *Electrophoresis*, 29 (7): 1467-1472.
- Tay, T. L. S., Ivanov, V., Kim, I. S., Feng, L. & Tay, J. H. (2001). Quantification of ratios of Bacteria and Archaea in methanogenic microbial community by fluorescence in situ hybridization and fluorescence spectrometry. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17 (6): 583-589.
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W. & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (8): s. 579-591.
- Urban, J. (2009). *Chromatographer; Gas chromatography*. Tilgjengelig fra: <http://www.chromatographer.com/gas-chromatography/> (lest 30.4.2012).
- Vilniskis, R., Baltrenas, P., Vasarevicius, S. & Baltrenaite, E. (2011). RESEARCH AND ASSESSMENT OF BIOGAS EVOLVED DURING ANAEROBIC DIGESTION OF BIODEGRADABLE AGRICULTURAL WASTE. *Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S*, 18 (4): 409-427.
- Visweswaran, G. R. R., Dijkstra, B. W. & Kok, J. (2010). Two Major Archaeal Pseudomurein Endoisopeptidases: PeiW and PeiP. *Hindawi Publishing Corporation* 10: s. 1-4.

- Warwick Chemistry >> *Chemical Biology* (2009). Tilgjengelig fra:
<http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/arodger/arodgergroup/people/msrhab/research/pcr/> (lest 30.4.2012).
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (4): s. 849-860.
- Wijekoon, K. C., Visvanathan, C. & Abeynayaka, A. (2011). Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 102 (9): s. 5353-5360.
- Willey, M. J., Sherwood, M. L. & Woolverton, J. C. (2009a). The Archaea. I: *Prescott's Principles of Microbiology*, s. 403-418. New York: Michelle Watnick.
- Willey, M. J., Sherwood, M. L. & Woolverton, J. C. (2009b). Introduction of Metabolism. I: Connely, F. J. (red.) *Prescott's Principle of Microbiology*, s. 169-187. New York: Michelle Watnick.
- Winstead, E. R. (2002). *Key player in global warming: M. acetivorans is sequenced* GNN - Genome News Network. Tilgjengelig fra:
http://www.genomenewsnetwork.org/articles/04_02/m_acetivorans_seq.shtml (lest 27.5.2012).
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N. & Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25 (4): 430-442.
- Woese, C. R. & E., F. G. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (11): s. 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). TOWARDS A NATURAL SYSTEM OF ORGANISMS - PROPOSAL FOR THE DOMAINS ARCHAEA, BACTERIA, AND EUCARYA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (12): 4576-4579.
- Yabu, H., Sakai, C., Fujiwara, T., Nishio, N. & Nakashimada, Y. (2011). Thermophilic two-stage dry anaerobic digestion of model garbage with ammonia stripping. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111 (3): 312-319.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. & Hwang, S. (2005). Group-Specific Primer and Probe Sets to detect Methanogenic Communities Using Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction. *Wiley InterScience* 10 (1002): 670-679.
- Zimonja, M., Rudi, K., Trosvik, P. & Naes, T. (2008). Multivariate curve resolution of mixed bacterial DNA sequence spectra: identification and quantification of bacteria in undefined mixture samples. *Journal of Chemometrics*, 22 (5-6): 309-322.
- Zinder, S. H. (1993). Physiological Ecology of Methanogens. I: Ferry, G. J. (red.) *Methanogenesis; Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*, s. 128-186. New York: Chapman & Hall Inc.
- Zwolinski, M. D. (2007). DNA sequencing: Strategies for soil microbiology. *Soil Science Society of America Journal*, 71 (2): 592-600.

VEDLEGG 1

Oversikt over materialer og kjemikalier

Komplett oversikt over alle apparater, bakterier, KIT og dataprogram benyttet i masteroppgaven

Ulike bakteriestammer benyttet i oppgaven

Bakteriens navn	Stamme	Referanse
Escherichia coli	11775	Else
Salmonella	Type 5	Jon F. Hanssen
Halifax denitrificans	DSMZ 4425	Daniel Mania

Oversikt over alle apparaturer benyttet i masteroppgaven

Produsent	Utstyr	Modell/Serienummer
Labnet International, Inc.	Vortex mikser	Z 0010141
IKA	Vortex mikser	96 unskirtet
Labnet International, Inc.	Mini sentrifuge	SN 0909 10556
Eppendorf	Bordsentrifuge	Mini-spin
Kubota	Platesentrifuge	Platespin II
BioRad	Gel dokumentasjon	Universell Hood II 720BR/02568
MP	Homogenisator	FastPrep-24®/6120303
Leica	Mikroskop	DMRE
Termo Scientific	Ekstraherings robot	King Fisher® FLEX
Perkin elmer	Gasskromatograf	Autosystem
InterChang eable	Glassprøyte 50 ml	Cadence Sience inc.
Pressure lok®	Glasssprøyte GC (0,5ml)	A2
Plastipac	Plastiksprøyte (10,30 og 60 ml)	Becton dickinson
Applied biosystem	PCR maskin I	270S1040227
Eppendorf	PCR maskin II	Master Cyclor Nexus Gradient
Eppendorf	Gradient PCR maskin	Mastercyckler gradient
Labsystem	Finnpipette	0,5- 10ml
Sartorius	Grov vekt	Type 1404
Sartorius	Finvekt	
Termomaks	Varmeskap 100-105 °C	
Therm concept	Glødeskap 550 °C	
IKA® RH	Magnetrører	Basic 2
Julabo	Vannbad	12
Infors HT	Inkubatorskap I	Ecotron
Infors HT	Inkubatorskap II	CH 4103
Whirlpool	Mikrobølgeovn	
Mettler	pH meter	Delta 320
Biorad	Elektroforese kar	Mini sub® cell GT
Grace	Serumflasker	120 ml Crimp Neck vial
Dynal	Magnetisk separator	
CamBrex	Spektrofluorometer	FLX800cse
ESCO	Varmeplate med rister	Provccl™ Shaking Micro inkubator

Oversikt materialer og kjemikalier

Applied Biosystem	qPCR maskin	Step One Plus
Thermo Scientific	High performance liquid chromatography (HPLC)	Dionex UltiMate 3000
Wheaton	Kappe krymper	
Waring	Blender	
Zeiss	Konfokal mikroskop	LM 700
Thermo Scientific	NanoDrop	NanoDrop 1000 spektrofotometer V3.7
Merck	pH strips	
Applied biosystem	Film for 96 brønns plate	MicroAmp™ Optical Adhesie Film
Eppendorf	Mikrobrønn plate	Twintec PCR plate
Wathman	Membranfilter	Andisk 25
Applied Biosystem	Sekvensator	Genetic analyser 3130 xl
BD	Kanlyle	BD Microlance™ 3

Oversikt over alle KIT benyttet i hele masteroppgaven

Kit	Produsent	Produktnummer
MagMAX™ Total Nucleic Acide Isolation Kit	Ambion, Inc.	
ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit	GE Healthcare	US 78200
BigDye® XTerminator™ Purification Kit	Applied Biosystems®	4376486
BigDye® Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit	Applied Biosystems®	4337449
Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit	Life Technologies	11496
E.Z.N.A.™ Cycle Pure Kit	Omega Bio-Tek, Inc	D6492-02
Fast DNA spin kit	QBiogens	

Oversikt over ulike programmer benyttet i hele oppgaven. Dataprogrammene inkluderer både program benyttet direkte og program tilknyttet et apparat.

Program	Produsent	Bruksområde
Quantitative one 3.6.7	BIO RAD	Geldokumentasjon
Turbochrom Navigator	Nelson	GC
Leica Application Suite V3,8	Leica	Mikroskop
Step One	Applied biosystem	qPCR
Chromeleon	Thermo Scientific	HPLC
KC4™	Omega Bio-Tek, Inc	Spektrofluorometer
BindIt™	Thermo Scientific	King Fisher ekstraheringsrobot
LinRegPCR	Ruijter <i>et al.</i> (2009).	Behandling av qPCR resultat
MATLAB	Matrix Laboratory	Behandling av sekvensering resultat
Zen 2010 BV 6,0	Cal Zeiss Micro-Image	Konfokalmikroskop
NanoDrop Technologies Inc.	Sprktrofotometer	ND 1000 v3.3.1

VEDLEGG 1

Oversikt over materialer og kjemikalier

Komplett kjemikalieliste for alle kjemikalier anvendt i oppgaven.

Kjemikalie	Kjemisk formel	Leverandør
Agarose		Invitrogen
Ammoniumklorid	NH ₄ Cl	Merck
Butansyre (smørsyre) (>99 %)	C ₄ H ₈ O ₂	Aldrich chemistry
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Merck
Eddiksyre	CH ₃ COOH	Merck
Etidiumbromid (EtBr)	C ₁₂ H ₂₀ B	VWR
Formamide	CH ₃ NO	Sigma
Gjær-ekstrakt		
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	B.D.H Laboratory supplies
Guanidine hydrochloride	CH ₆ ClN ₃	Sigma
Guanidine thiocyanat	C ₂ H ₆ N ₄ S	Sigma
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Arcus
Kaliumdihydrogen	KH ₂ PO ₄	Merck
Kaliumklorid	KCl	Merck
Kalium-monohydrogenfosfat	K ₂ HPO ₄	Norsk medisinaldepot
Kalsium karbonat	CaCO ₃	Merck
Magnesiumdiklorid	MgCl ₂	Merck
Metanol (100 %)	CH ₃ OH	Sigma-Aldrich
Metansyre (98- 100 %)	CH ₂ O ₂	Sigma- Aldrich
Natriumhydroksid	NaOH	Merck
Natriumklorid	NaCl	Merck
Nitrogengass?	N ₂	Yara
Paraformaldehyd	OH(CH ₂ O) _n H	Sigma-Aldrich
<i>p</i> - Paraphenylenediamine (PPD)	C ₆ H ₈ N ₂	Sigma
Pepton (fra kjøtt)		Merck
Propansyre	C ₃ H ₆ O ₂	Merck
Rekvifisert sprit	C ₂ H ₅ OH	Arcus
Saltsyre	HCl	Merck
SDS (sodiumdeoxycholate)	C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na	Sigma-Aldrich
Svovelsyre (75 %)	H ₂ SO ₄	Merck
Tris- base	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma- Aldrich
Triton® X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n	Sigma
Trizma®-base		Sigma- Aldich
Valerinsyre (99 %)	C ₅ H ₁₀ O ₂	Kebo Lab

Oversikt over ulike anrikningsmedium benyttet i oppgaven. To av mediene ble brukt i et forsøk om oppdyrking av metanogener i et partikkelfritt mediet. Halobacteria ble brukt for å dyrke opp arker for verifisering av archaea primere.

Anrikningsmediet for metanogener, Barker

Sammensetning per liter

CaCO ₃	20,0g
NH ₄ Cl	1,00g
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	0,40g
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,10g
Metanol	20,0ml
pH 7,0 ± 0,2 ved 25 °C	

Alle komponenter blandes med unntak av CaCO₃ og metanol i milliQ vann til et totalvolum på 1 liter. Blandes godt og kokes akkurat opp til kokepunktet, autoklaveres i 15 minutt ved 121 °C. Mediet kjøles ned til 25 °C, og sterilfiltrert metanol tilsettes. 1 gram CaCO₃ tilsettes for hver 50mL skrukorkflaske og autoklaveres. Mediet tilsettes så etter autoklaving i volum på 50mL.

Standardmediet for anrikning av metanogener

Sammensetning per liter

Glukose	10,0g
KH ₂ PO ₄	1,50g
Na ₂ HPO ₄	1,67g
NH ₄ Cl	0,50g
MgCl*6H ₂ O	0,18g
Gjærekstrakt	2,00g
Peptone	2,00g
(Antifoam A	0,02g)

Alt ble blandet sammen og milliQ vann tilsatt opp til en liter. Antifoam ble ikke sett på som nødvendig og derfor ikke benyttet i denne oppgaven.

HALOBACTERIA MEDIUM

Sammensetning per liter

Yeast extract	5.00 g
Casamino acids	5.00 g
Na-glutamate	1.00 g
KCl	2.00 g
Na ₃ -citrate	3.00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	20.00g
NaCl	200.00 g
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	36.0 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0.36 mg
(Agar 20.00 g)	
Juster pH to 7.0 - 7.2	

Buffer

Under følger oppskrifter på ulike buffere som ble laget og benyttet i masteroppgaven. PBS ble benyttet til i flere tilfeller, mens TE og EDTA ble brukt for vaskebuffer og hybridiseringsbuffer anvendt i FISH.

10 X PBS buffer

Tabell 1 reagenser benyttet i tillaging av 10X PBS buffer. Alle reagenser blandes, her kan en magnet røer benyttes. Når bufferen er ferdigblandet kan den autoklaveres.

kjemikalier	Mengde	Sluttkonsentrasjon
NaCl	20 g	1,37 M
KCl	0,5 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,91 g	43 mM
KH ₂ PO ₄	0,5 g	14 mM
milliQ	Fyll opp til 250 ml	

Tabell 2. reagenser benyttet i tillaging av TE-buffer. Alle reagenser blandes, og bufferen autoklaveres før bruk

kjemikalier	Mengde	Sluttkonsentrasjon
1 M Tris-HCl pH 8,0	1 ml	10 mM
0,5 M EDTA	200 µl	1 mM
milliQ	Fyll opp til 100 ml	

Tabell 3 reagenser benyttet i tillaging av 0,5 M EDTA. Tilsett EDTA til ca 90 ml vann, EDTA løses i vann ved å justere pH til 7. Når EDTA er løst, oppjusteres pH til 8, og vann tilsettes opp til 125 ml. Løsningen autoklaveres før bruk.

Kjemikalie	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	23,265 g	MW 372,24 g/mol
MilliQ	Fylle opp til 125 ml	

Protokoller

Full protokoll for ekstraksjon med MagMAX™ isolerings kit. Protokollen er hetnet fra Applied Biosystems website.

MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

(Part Number AM1840)

Protocol

II. MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Procedure

A. Reagent and Equipment Preparation

Before using the kit the first time, prepare wash solutions

- Add 12 mL 100% isopropanol to the bottle labeled Wash Solution 1 Concentrate and mix thoroughly. The resulting mixture is called Wash Solution 1 in these instructions.
- Add 32 mL 100% ethanol to the bottle labeled as Wash Solution 2 Concentrate and mix thoroughly. The resulting mixture is called Wash Solution 2 in these instructions.
- Mark the labels to indicate that the wash solutions are complete.
- Store the wash solutions at room temperature.

Determine maximum shaker speed for the procedure

Using ~210 µL of water per well of a 96-well plate, determine the maximum shaking speed that can be used with your orbital shaker without spilling sample. Use this speed for all shaking steps in the procedure.

Add Carrier NA to the Lysis/Binding Solution



IMPORTANT

Carrier NA is not known to affect RT-PCR, even when oligo(dT) is used as primer for the RT reaction. If you are isolating RNA with the intention of amplifying it for microarray analysis, however, Carrier NA could interfere with RNA amplification using oligo(dT) primers. Carrier NA can be left out of the Lysis/Binding Solution for all sample types, except cell-free or nearly cell-free samples; replace it with Nuclease-free Water. Carrier NA is required for quantitative NA recovery from cell-free or nearly cell-free samples, so this kit is not recommended for NA isolation from these sample types for use in microarray analysis.



IMPORTANT

Shipment on dry ice may cause the Carrier NA to become gelatinous and difficult to pipet. If you experience problems when attempting to pipet the Carrier NA, we recommend heating it in a hybridization oven at 37°C for 10–15 min. A heat block may be used for this incubation, as long as the block accommodates the tube to uniformly heat the solution to 37°C. After heating, vortex vigorously, then spin briefly; you should now be able to easily pipette the solution accurately.

- Prepare the amount of Lysis/Binding Solution needed for one month as shown in Table 1. If you prepare less than the entire bottle, include ~10% overage to cover pipetting loss. Once the Carrier NA is added, the solution is stable for one month.

Table 1. Lysis/Binding Solution Preparation

	Per Rxn	Entire Bottle
Lysis/Binding Solution Concentrate	232 µL	28 mL
Carrier NA (1 µg/sample)	3 µL	360 µL

- Mix by inverting the tube several times.
 - If you prepare the entire bottle, mark the label to indicate this.
 - Store the prepared Lysis/Binding Solution at room temperature. Storage at lower temperatures may cause the Carrier NA to precipitate. If the solution is inadvertently stored at 4°C, warm it at 37°C and shake to dissolve any precipitates before use.

MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Procedure

Prepare *Bead Mix*

Each isolation reaction requires 20 µL of *Bead Mix*. Although the mixture is stable at 4°C for up to 2 weeks, we recommend preparing it on the day it will be used.

- a. Prepare *Bead Mix* by as shown in Table 2 for the number of isolation reactions to be performed. Add ~10% overage to cover pipetting loss. Mix thoroughly by gently vortexing.

Table 2. *Bead Mix* preparation

Component	Per Reaction	96 Rxns (+10%)
NA Binding Beads*	10 µL	1.1 mL
Lysis/Binding Enhancer	10 µL	1.1 mL

* Vortex the NA Binding Beads at moderate speed to form a uniform suspension before pipetting.

- b. Place the prepared *Bead Mix* on ice until it is needed in step [II.C.3](#).

B. Sample Disruption

The sample disruption procedure is slightly different for solid samples such as feces, and liquid samples such as biofluids and bacterial cultures. Separate instructions are provided in sections [B.I](#) and [B.II](#).

RNase decontamination

Lab bench and pipettors

Before working with RNA, it is always a good idea to clean the lab bench and pipettors with an RNase decontamination solution (e.g. Ambion® RNaseZap Solution).

Gloves and RNase-free technique

- Wear laboratory gloves to perform this procedure and change them frequently. They will protect you from the reagents, and they will protect the RNA from nucleases that are present on skin.
- Use RNase-free tips to handle the wash solutions and the Elution Solution, and avoid putting used tips into the kit reagents.

B.I. Disruption of Solid Samples

Follow this sample disruption procedure for solid samples such as feces and cow alleyway samples.

1. Add 235 µL Lysis/Binding Solution to a *Bead Tube*

Dispense 235 µL Lysis/Binding Solution (prepared as described on page [6](#)) into a *Bead Tube* for each sample. Set the tube(s) aside for use in step [4](#) below.

MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

2. Add 0.3 g sample to 1 mL PBS and vortex for ~3 min

- Mix samples thoroughly to create a homogenous sample. This is critical for detection of pathogens such as MAP, because the pathogens are typically concentrated in fecal material that was adjacent to the intestinal wall.
- For each sample, place 1 mL of PBS in a 2 mL microcentrifuge tube.
- Add 0.3 g (± 0.1 g) sample to the PBS.
- Mix by vortexing at moderate to high speed for 3 min to fully suspend the sample.



NOTE

The volume of PBS provided is sufficient for relatively large fecal samples. To prepare larger fecal samples, scale up proportionally.

3. Centrifuge at 100 x g for 1 min and transfer 175 μ L supernatant to a Bead Tube

- Centrifuge samples at very low speed, 100 x g, for 1 min.
- Transfer 175 μ L of the supernatant to each Bead Tube containing Lysis/Binding Solution.
For isolation of nucleic acids from relatively large organisms such as *Mycobacterium*, it is important to transfer the supernatant before the cells settle to the bottom of the tube.

4. Bead-beat for 15 min

Bead-beat the samples for 15 min on a vortex mixer.

This step lyses cells to release nucleic acids by physical disruption with the zirconia beads. Adequate agitation is particularly important for cells that are difficult to lyse, such as *Mycobacterium*.

Following are recommendations for thorough sample disruption using the equipment tested at Applied Biosystems.

Table 3. Sample Disruption Recommendations

Vortex adapter & mixer	Vortex mixer speed and time	Comments
Ambion Vortex Adapter and Vortex-Genie® 2	Speed: maximum, Time: 15 min	Position the sample tubes horizontally on the vortex adapter with the tube caps towards the center.
Disruptor Genie®	Speed: maximum, Time: 15 min	Use the TurboMix attachment for 2 mL tubes.
FastPrep®-24 Instrument	Speed: 6.5 m/s, Time: 2 x 1 min	Two cycles of 1 min each. Allow at least 2 min rest between cycles.
Precellys 24	Speed: 6800 rpm, Time: 2 x 1.5 min	Two cycles of 1.5 min each. Allow 5 min rest between cycles.

5. Pellet the beads and transfer 300 μ L lysate to an empty tube

- Pellet the zirconia beads by centrifuging at 16,000 x g for 3 min.
- Transfer 300 μ L of lysate to a new, empty 1.5 mL microcentrifuge tube, being careful to avoid transferring the zirconia beads.

6. Centrifuge lysate at 16,000 x g for 6 min

- Clarify the lysate by centrifuging at 16,000 x g for 6 min.
- Proceed to section [C. Nucleic Acid Purification](#) starting on page 9.

MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Procedure

B.II. Disruption of Liquid Samples

Follow this sample disruption procedure for liquid samples such as whole blood, milk, bacterial and cell cultures, and other biofluid samples.

1. **Add 235 µL Lysis/Binding Solution to a Bead Tube**

Dispense 235 µL Lysis/Binding Solution (prepared as described on page 6) into a Bead Tube for each sample.
2. **Add 175 µL sample and bead-beat for 15 min**
 - a. Add 175 µL of sample to each Bead Tube containing Lysis/Binding Solution.
 - b. Bead-beat the samples for 15 min on a vortex mixer.
This step lyses cells to release nucleic acids by physical disruption with the zirconia beads. Adequate agitation is particularly important for cells that are difficult to lyse, such as *Mycobacterium*. Table 3 on page 8 lists recommendations for thorough sample disruption using the vortex adapters tested at Ambion.
3. **Pellet the zirconia beads**
 - a. Pellet the zirconia beads by centrifuging at 16,000 x g for 3 min.
 - b. Proceed to section [C. Nucleic Acid Purification](#) below.


C. Nucleic Acid Purification

Before starting the NA purification:

Place the Elution Buffer at 65°C to preheat it for the final NA elution in step 8.


1. **Transfer 115 µL sample to a well of the Processing Plate**

Transfer 115 µL of sample supernatant to a well of the Processing Plate.



IMPORTANT

When working with solid samples, aspirate the sample supernatant carefully to avoid carryover of the pelleted material to the Processing Plate.



NOTE

If the NA will be used to detect DNA targets by RT-PCR, unused sample supernatant can be stored at room temperature for up to 5 days. Do not store unused sample lysate below room temperature as this may reduce NA yield due to precipitation.
2. **Add 65 µL 100% isopropanol and mix for 1 min**
 - a. Add 65 µL 100% isopropanol (ACS reagent grade or equivalent) to each sample in the Processing Plate.
 - b. Shake the plate for 1 min on an orbital multiwell-plate shaker at the maximum speed identified in step [A. Determine maximum shaker speed for the procedure](#) on page 6.

MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

3. Add 20 µL Bead Mix and mix for 5 min

- Vortex the prepared Bead Mix at moderate speed to create a uniform suspension before pipetting (prepared as described in step [A. Prepare Bead Mix](#) on page 7).
- Remove the plate from the shaker and add 20 µL Bead Mix to each sample.
- Shake the plate for 5 min to bind NA to the NA Binding Beads.

4. Capture the NA Binding Beads and carefully discard the supernatant

- Move the Processing Plate to a magnetic stand to capture the NA Binding Beads. Leave the plate on the magnetic stand for 3–5 min. When capture is complete, the NA Binding Beads will form pellets against the magnets in the magnetic stand. The capture time depends on the magnetic stand used.
- Carefully aspirate and discard the supernatant without disturbing the beads, and remove the Processing Plate from the magnetic stand.



IMPORTANT

To obtain pure NA, it is important to completely remove the supernatant at this step; use the Ambion 96-well Magnetic-Ring Stand (P/N AM10050) for the best consistency.

5. Wash twice with 150 µL Wash Solution 1

- Remove the plate from the shaker and add 150 µL Wash Solution 1 (isopropanol added) to each sample and shake the plate for 1 min.
- Capture the NA Binding Beads on a magnetic stand for ~1 min, or until the mixture becomes clear, indicating that capture is complete.
- Carefully aspirate and discard the supernatant without disturbing the beads and remove the Processing Plate from the magnetic stand. It is critical to move the Processing Plate off the magnetic stand before the subsequent wash.
- Repeat steps [a–c](#) to wash a second time with 150 µL Wash Solution 1.

6. Wash twice with 150 µL Wash Solution 2

- Remove the plate from the shaker and add 150 µL Wash Solution 2 (ethanol added) to each sample and shake for 1 min.
- Capture the NA Binding Beads as in the previous wash.
- Carefully aspirate and discard the supernatant without disturbing the beads and remove the Processing Plate from the magnetic stand. As in the previous wash, it is critical to move the Processing Plate off the magnetic stand before the subsequent wash.
- Repeat steps [a–c](#) to wash a second time with 150 µL Wash Solution 2.



IMPORTANT

It is important to completely remove Wash Solution 2 from the samples, because otherwise it could inhibit downstream applications such as RT-PCR.

MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Procedure **7. Dry the beads by shaking for 2 min**

- a. Move the Processing Plate to the shaker and shake for 2 min to allow any remaining alcohol from the Wash Solution 2 to evaporate.
- b. Inspect the wells and if there is residual solution, shake the plate for another minute or two to let it evaporate.

**IMPORTANT**

Do not shake the plate for >5 min, as this could overdry the beads.

8. Add 20–50 µL 65°C Elution Buffer and mix for 3 min

- a. Add 20–50 µL 65°C Elution Buffer to each sample, and shake vigorously for 3 min.

**NOTE**

The elution volume is somewhat flexible; NA can be eluted as little as 20 µL, or in >50 µL to achieve the desired final nucleic acid concentration. The volume of Elution Buffer supplied with the kit is enough for 96 samples at 90 µL each.

- b. Inspect the samples to make sure that the magnetic beads are uniformly resuspended in the Elution Buffer. If aggregates of beads are visible, pipette up and down ~10 times to thoroughly resuspend the beads, then shake for 1 more minute. Complete resuspension of beads is critical for consistent and efficient NA recovery.

9. Capture the beads and transfer the purified NA to a storage container

- a. Capture the NA Binding Beads as in the previous steps. *The purified NA will be in the supernatant.*
- b. Transfer the supernatant, which contains the NA, to a nuclease-free container appropriate for your application, and store the purified NA at –20°C.



FastDNA[®] SPIN Kit for Soil

Rapid Isolation of PCR - Ready Genomic DNA from Soil Samples Using the FastPrep[®] System

5. Protocol

1. Add up to 500 mg of soil sample to a Lysing Matrix E tube.
NOTE: See section 3.2 for important guidelines.
2. Add 978 μ l Sodium Phosphate Buffer to sample in Lysing Matrix E tube.
3. Add 122 μ l MT Buffer.
4. Homogenize in the FastPrep[®] Instrument for 40 seconds at a speed setting of 6.0.
5. Centrifuge at 14,000 x g for 5-10 minutes to pellet debris.
NOTE: Extending centrifugation to 15 minutes can enhance elimination of excessive debris from large samples, or from cells with complex cell walls.
6. Transfer supernatant to a clean 2.0 ml microcentrifuge tube. Add 250 μ l PPS (Protein Precipitation Solution) and mix by shaking the tube by hand 10 times.
7. Centrifuge at 14,000 x g for 5 minutes to pellet precipitate. Transfer supernatant to a clean 15 ml tube. NOTE: While a 2.0 ml microcentrifuge tube may be used at this step, better mixing and DNA binding will occur in a larger tube.
8. Resuspend Binding Matrix suspension and add 1.0 ml to supernatant in 15 ml tube.
9. Place on rotator or invert by hand for 2 minutes to allow binding of DNA. Place tube in a rack for 3 minutes to allow settling of silica matrix.
10. Remove and discard 500 μ l of supernatant being careful to avoid settled Binding Matrix.
11. Resuspend Binding Matrix in the remaining amount of supernatant. Transfer approximately 600 μ l of the mixture to a SPIN[™] Filter and centrifuge at 14,000 x g for 1 minute. Empty the catch tube and add the remaining mixture to the SPIN[™] Filter and centrifuge as before. Empty the catch tube again.
12. Add 500 μ l prepared SEWS-M and gently resuspend the pellet using the force of the liquid from the pipet tip.
NOTE: Ensure that ethanol has been added to the Concentrated SEWS-M.
See section 3.1.

13. Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute. Empty the catch tube and replace.
14. Without any addition of liquid, centrifuge a second time at 14,000 x g for 2 minutes to "dry" the matrix of residual wash solution. Discard the catch tube and replace with a new, clean catch tube.
15. Air dry the SPIN™ Filter for 5 minutes at room temperature.
16. Gently resuspend Binding Matrix (above the SPIN filter) in 50-100 µl of DES (DNase/Pyrogen-Free Water).
NOTE: To avoid over-dilution of the purified DNA, use the smallest amount of DES required to resuspend Binding Matrix pellet.
NOTE: Yields may be increased by incubation for 5 minutes at 55°C in a heat block or water bath.
17. Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute to bring eluted DNA into the clean catch tube. Discard the SPIN filter. DNA is now ready for PCR and other downstream applications. Store at -20°C for extended periods or 4°C until use.

GA Stool Bacteria DNA extraction protokoll

4.6 DNA isolation

When all the stool samples are aliquoted into the tubes, you should immediately continue with the procedure for bacterial DNA isolation from the stool samples.

Procedure for bacterial DNA isolation from stool samples.

1. Dissolve 40mg stool sample in 1200 μ l Bindingbuffer [5 M Guanidinium thiocyanate; 150 mM Tris-HCl pH 6.8; 7.5 mM EDTA] and glass beads (0.25 g of <106 μ m). Vortex briefly. Alternatively the sample can be frozen down at -20°.
2. Homogenize the cells in the MagNA Lyser at 6500 rpm in 2x20 sec. Leave on cold block between each homogenization step.
3. Centrifuge the sample at 13000 rpm for 5 min at RT and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (600 μ l)
4. Add 100 μ l SiMAG/MP-DNA Magnetic Beads (200 mg/ml), vortex and incubate for 5 min at RT. Spin briefly.
5. Place the tube on a magnetic separator for 30 second and collect the bead/DNA pellet. Remove and discard the supernatant.
6. Add 1 ml Washing Buffer I [60 % Guanidinium hydrochloride; 1 % Triton X100; 10 % TE Buffer pH 8.0]. Vortex gently at RT (avoid foaming due to the TritinX100), Spin briefly. Place the tube on a magnetic separator for 30 second and collect the bead/DNA pellet. Remove and discard the supernatant.
7. Add 1 ml Washing Buffer II [70 % EtOH] and vortex for 5 second. Spin briefly. Place the tube on a magnetic separator for 30 second and collect the bead/DNA pellet. Remove and discharge the supernatant.
8. Add 1 ml Washing Buffer III [ddH₂O] and vortex for 1 second (It is important to not vortex longer since H₂O elutes the DNA). Spin briefly. Remove and discharge the supernatant.
9. Add 100 μ l elutionbuffer [10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA], vortex spin briefly. Incubate beads and DNA for 10 min at 60 °C in a thermo-mixer with mixing (1000 rpm).
10. Collect the beads with the magnet and transfer the solution with the eluted DNA to a new clean 1,5ml eppendorf tube.

Gelelektroforese

Gelelektroforese ble brukt for å verifisere resultat både for metodetesting av ekstraksjon, T_m gradient PCR, og verifisering av primere. Og for å kontrollere at PCR med Illuminaprimere var vellykket.

Prosedyre

Tillaging av 1 % agarosegel:

- 50mg agarose blandes med 50 ml 1X TBE buffer.
- Løsningen varmes opp (mikrobølgeovn) til all agarose er løst opp i bufferen (klar væske). Vær obs på at løsningen ikke koker over. Ta jevnlig og rør om på kolben under oppvarming
- Tilsett en dråpe etidiumbromid (3µl) når væsken er kjølt ned til ca 60 °C, for å unngå fordampning av etidiumbromid.
- Væsken overføres så til et gelkar, unngå bobler. Hvis bobler skulle forekomme bruk noe til å føre disse til nedre hjørne av gelkaret. Sett så på brønnkam.
- La gelen stivne i 20 min, fjern så brønnkammen og overfør gelen fra gelkaret til elektroforesekaret.
- Elektroforesekaret skal innholdet så mye TBE buffer at det dekker brønnen på gelen. TBE buffer bør skiftes etter maksimum tre kjøring.
- Ladder å prøver pipettes så i brønnene, med tilsatt elektroforese dye. I dette forsøket ble 1 kb ladder benyttet.
- Sett på lokk og skru på strømmapparatet. Normal kjøring er 80 volt i 40 min. i dette forsøket ble vanlig kjøring 80 volt i 35 min
- Etter 35 min avleses så gelen i en avlesingsmaskin med UV lys(navn på maskin).

Indeks benyttet for konstruksjon av amplikonbibliotek til For Illuminasekvensering

TruSeq Index Sequences

Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence
1	ATCACG	13	AGTCAA	25	ACTGAT	37	CGGAAT
2	CGATGT	14	AGTTCC	26	ATGAGC	38	CTAGCT
3	TTAGGC	15	ATGTCA	27	ATTCTT	39	CTATAC
4	TGACCA	16	CCGTCC	28	CAAAAG	40	CTCAGA
5	ACAGTG	17	GTAGAG	29	CAACTA	41	GACGAC
6	GCCAAT	18	GTCCGC	30	CACCGG	42	TAATCG
7	CAGATC	19	GTGAAA	31	CACGAT	43	TACAGC
8	ACTTGA	20	GTGGCC	32	CACTCA	44	TATAAT
9	GATCAG	21	GTTTCG	33	CAGGCG	45	TCATTC
10	TAGCTT	22	CGTACG	34	CATGGC	46	TCCCGA
11	GGCTAC	23	GAGTGG	35	CATTTT	47	TCGAAG
12	CTTGTA	24	GGTAGC	36	CCAACA	48	TCGGCA

TruSeq DNA and RNA libraries use indexes 1-12.

TruSeq Small RNA libraries use indexes 1-48.

Nukleotide sekvenser av primere benyttet til konstruksjon av bibliotek for Illumina sekvensering. Små bokstaver representerer adapter sekvensen nødvendig for binding til flytcellen. Små bokstaver med understrek er bindingsområdet for Illumina sekvens primeren. Små bokstaver Sekvens med kun store fete bokstaver (revers primer) er indeks sekvensen. Små fete bokstaver er eget merke i forbindelse med analyse av data. Store ikke-fete bokstaver representerer den generelle primeren for prokaryote (PRK 314F og PRK806R)

Forward primer sekvens (5'→3')

1. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**agtcaa**CCTACGGGRBGCASCAG
2. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**agtccc**CCTACGGGRBGCASCAG
3. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**atgtca**CCTACGGGRBGCASCAG
4. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**ccgtcc**CCTACGGGRBGCASCAG
5. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtagag**CCTACGGGRBGCASCAG
6. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtccgc**CCTACGGGRBGCASCAG
7. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtgaaa**CCTACGGGRBGCASCAG
8. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtggcc**CCTACGGGRBGCASCAG
9. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gtttcg**CCTACGGGRBGCASCAG
10. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**cgtaag**CCTACGGGRBGCASCAG
11. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**gagtgg**CCTACGGGRBGCASCAG
12. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**ggtagc**CCTACGGGRBGCASCAG
13. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**actgat**CCTACGGGRBGCASCAG
14. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**atgagc**CCTACGGGRBGCASCAG
15. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**attcct**CCTACGGGRBGCASCAG
16. aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatct**caaaag**CCTACGGGRBGCASCAG

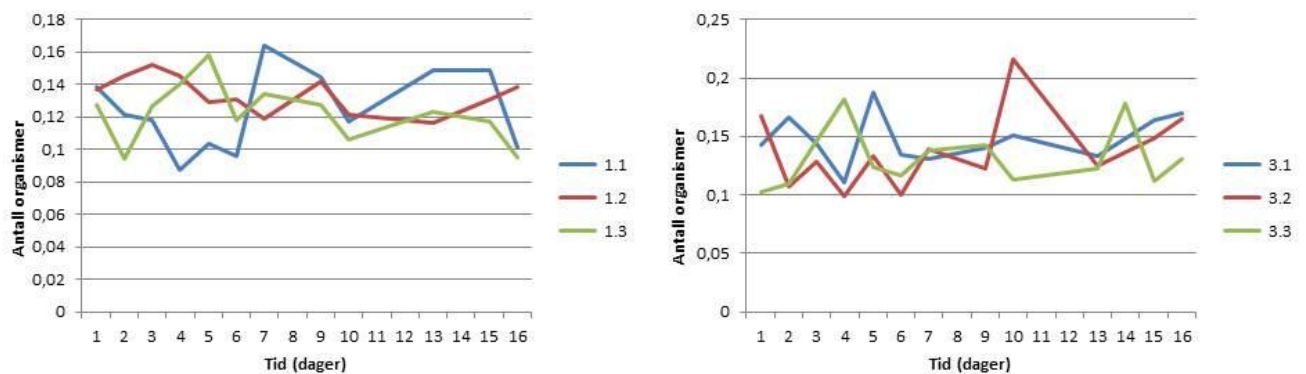
Revers primer sekvens (5'→3')

1. caagcagaagacggcatacagagat**CGTGAT**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
2. caagcagaagacggcatacagagat**ACATCG**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
3. caagcagaagacggcatacagagat**GCCTAA**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
4. caagcagaagacggcatacagagat**TGGTCA**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
5. caagcagaagacggcatacagagat**CACTCT**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
6. caagcagaagacggcatacagagat**ATTGGC**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
7. caagcagaagacggcatacagagat**GATCTG**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
8. caagcagaagacggcatacagagat**TCAAGT**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
9. caagcagaagacggcatacagagat**CTGATC**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
10. caagcagaagacggcatacagagat**AAGCTA**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
11. caagcagaagacggcatacagagat**GTAGCC**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
12. caagcagaagacggcatacagagat**TACAAG**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT

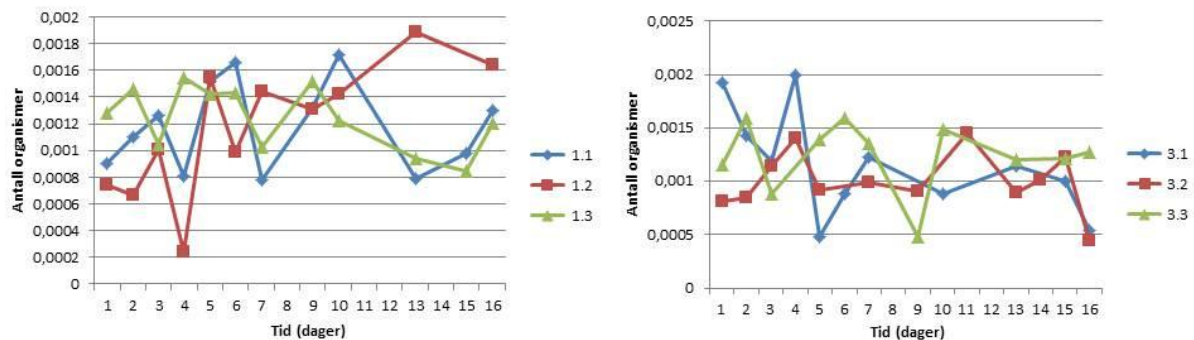
Diverse resultat som ikke ble fremstilt i selve oppgaven.

Tabell 3.4. Beregnet prosent metan ved TCD detektor. Alle prøvene er fra kontrollforsøk startet i februar (3.2.2012). parallellene er begge tilsatt KOH og hadde en pH i startmaterialet var tilnærmet 7,0.

Dato	Prøve	% metan
3.2.2012	1.1	0
26/2-2012		6,23
9.3.2012		9,94
3.2.2012	1.2	0
26/2-2012		4,22
9.3.2012		8,7

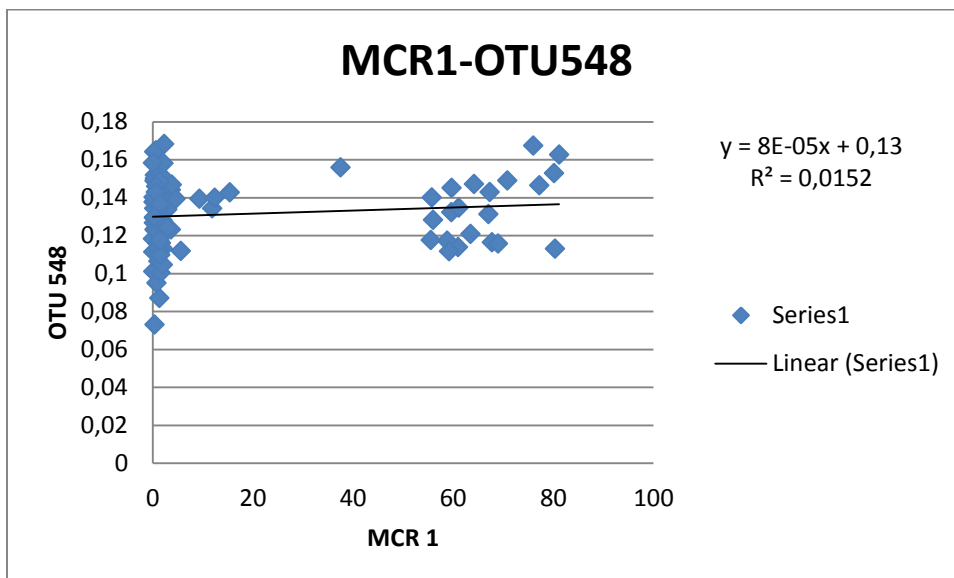
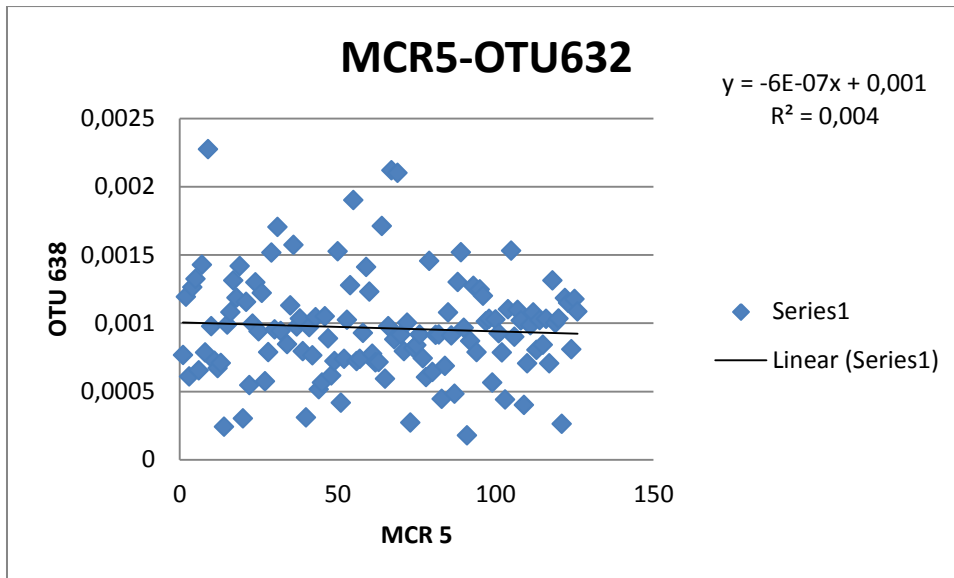


Figur 1 Utvikling av *Streptococcae* over tid for henholdsvis reaktor med 33,33 % storfegjødsel/50 % fiskeensilasje (1.1-1.3) og For blanding med 66,67 % storfegjødsel/16,67 % fiskeensilasje (3.1-3.3) Grafene er en av flere som ble laget for å se etter trender ved utvikling. Og er tatt med som en demonstrasjon av at dette ikke var tilfellet.



Figur 2. Utvikling av *Methanobacteriales* over tid for henholdsvis reaktor med 33,33 % storfegjødsel/50 % fiskeensilasje (1.1-1.3) og For blanding med 66,67 % storfegjødsel/16,67 % fiskeensilasje (3.1-3.3) Grafene er en av flere som ble laget for å se etter trender ved utvikling. Og er tatt med som en demonstrasjon av at dette ikke var tilfellet.

Begge grafene er inkludert i dette vedlegget for å vise til at sammenstilling mellom MCR og OTUer ikke ga noen form som grad av likhet. Fra RDP søket viser MCR 5 og OTU 632 å tilhøre slekten *Sporanaerobacter*, mens MCR1 og OTU 548 tilhører slekten *Clostridium*.



Tabell 1 Oversikt over resultat fra RDP søk. Resultatet viser identifisering av alle OTU som var representert med ≥ 1000 organismer (vist i kolonnen helt til høyre). Alle fargede ruter indikerer identifiserte organismer med en sekvenslikhet $< 50\%$.

OTU	Slekt	Fylum	Klasse	Orden	Antall
OTU132	Pseudoflavonifactor	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2313
OTU264	Fastidiosipila	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1485
OTU155	Flavonifactor	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1990
OTU158	Flavonifactor	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1805
OTU160	Flavonifactor	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1213
OTU180	Saccharofermentans	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	7466
OTU309	Flavonifactor	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1209
OTU310	Clostridium IV	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	7413
OTU312	Acetivibrio	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	5715
OTU317	Pseudoflavonifactor	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2503
OTU318	Saccharofermentans	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1592
OTU319	Clostridium III	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1855
OTU320	Clostridium III	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	11960
OTU321	Flavonifactor	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1321
OTU324	Clostridium III	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1171
OTU325	Saccharofermentans	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2335
OTU326	Saccharofermentans	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1495
OTU339	Papillibacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2916
OTU373	Saccharofermentans	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	15031
OTU475	Oscillibacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	8092
OTU603	Anaerotruncus	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2036
OTU684	Acetanaerobacterium	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1946
OTU244	Alkalibacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1658
OTU271		Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1195
OTU273	Anaerofustis	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	22718
OTU274	Anaerofustis	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	3706
OTU288	Anaerofustis	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	4608
OTU298	Alkalibaculum	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2796
OTU561	Alkalibaculum	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1241
OTU671	Alkalibaculum	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	85991
OTU293	Clostridium sensu stricto	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	28055
OTU306	Clostridium sensu stricto	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	69669
OTU558	Anaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	10396
OTU653	Anaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	5906
OTU697	Anaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	14275
OTU704	Proteiniclasticum	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1702
OTU681	Geosporobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	3194
OTU275	Thermosyntrophia	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	7248
OTU286	Syntrophomonas	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	16028
OTU364	Tepidanaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	10784

VEDLEGG 7

OTU366	Tepidanaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1272
OTU632	Sporanaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1718
OTU667	Sporanaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1E+05
OTU711	Tissierella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	18752
OTU712	Tissierella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1240
OTU769	Sporanaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1613
OTU673	Sedimentibacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	16426
OTU677	Tissierella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	14243
OTU768	Clostridium XII	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1963
OTU662	Clostridium XII	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2E+05
OTU709	Murdochiella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	12534
OTU546	Anaerovorax	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1706
OTU571	Mogibacterium	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	3913
OTU146	Fusibacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	3756
OTU522	Acetoanaerobium	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1183
OTU611	Peptostreptococcus *	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2051
OTU548	Clostridium XI	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2E+05
OTU758	Clostridium XI	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2708
OTU544	Anaerostipes	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	31991
OTU545	Pseudobutyrvibrio	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2456
OTU550	Butyrvibrio	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1367
OTU588	Robinsoniella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	4119
OTU605	Robinsoniella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1413
OTU678	Cellulosilyticum	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1358
OTU688	Lachnospiracea_incertainae_sedis	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1079
OTU141	Anaeroglobus	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2354
OTU557	Thermincola	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	3118
OTU145	Sporotomaculum	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2213
OTU184	Dethiobacter	Firmicutes	Clostridia	Natranaerobiales	2070
OTU454	Natronovirga	Firmicutes	Clostridia	Natranaerobiales	23496
OTU140	Halarsenatibacter	Firmicutes	Clostridia	Halanaerobiales	2245
OTU178	Syntrophaceticus	Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	2941
OTU137	Turicibacter	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	8292
OTU138	Turicibacter	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	1863
OTU139	Turicibacter	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	62994
OTU249	Sharpea	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	2365
OTU277	Catenibacterium	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	2141
OTU283	Erysipelothrix	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	1147
OTU379	Sharpea	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	2037
OTU382	Sharpea	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	3165
OTU172	Shimazuella	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	2412
OTU455	Falsibacillus	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	1322
OTU464	Cerasibacillus	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	2725
OTU589	Shimazuella	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	2497
OTU719	Filibacter	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	1203

OTU723	Psychrobacillus	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	1195
OTU724	Planococcaceae_incertae_sedis	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	1049
OTU729	Abiotrophia	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	1370
OTU458	Facklamia	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	1395
OTU461	Facklamia	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	1297
OTU448	Atopococcus	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	6409
OTU463	Isobaculum	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	11534
OTU731	Pediococcus	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	16891
OTU554	Lactobacillus	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	5170
OTU614	Lactobacillus	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	2097
OTU616	Lactobacillus	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	42032
OTU732	Lactobacillus	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	7995
OTU98		"Bacteroidetes"	"Bacteroidetes"_incertae_sedis	Prolixibacter	1920
OTU100		"Bacteroidetes"	"Bacteroidetes"_incertae_sedis	Marinifilum	1017
OTU104		"Bacteroidetes"	"Bacteroidetes"_incertae_sedis	Marinifilum	8938
OTU117		"Bacteroidetes"	"Bacteroidetes"_incertae_sedis	Marinifilum	3659
OTU441		"Bacteroidetes"	"Bacteroidetes"_incertae_sedis	Marinifilum	826
OTU174	Anaerorhabdus	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	1142
OTU272	Acetomicrobium	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	5404
OTU229	Petrimonas	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	12965
OTU235	Petrimonas	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	27347
OTU236	Proteiniphilum	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	3025
OTU446	Proteiniphilum	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	4132
OTU438	Proteiniphilum	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	1666
OTU431	Marinilabilia	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	12309
OTU440	Anaerophaga	"Bacteroidetes"	"Bacteroidia"	"Bacteroidales"	1185
OTU535	Lutaonella	"Bacteroidetes"	Flavobacteria	"Flavobacteriales"	1577
OTU536	Sediminicola	"Bacteroidetes"	Flavobacteria	"Flavobacteriales"	1222
OTU538	Coenonia	"Bacteroidetes"	Flavobacteria	"Flavobacteriales"	96929
OTU756	Coenonia	"Bacteroidetes"	Flavobacteria	"Flavobacteriales"	1070
OTU149	Jonquetella	"Synergistetes"	Synergistia	Synergistales	3847
OTU153	Aminobacterium	"Synergistetes"	Synergistia	Synergistales	1086
OTU708	Albidovulum	"Proteobacteria"	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	3851
OTU638	Advenella	"Proteobacteria"	Betaproteobacteria	Burkholderiales	1086
OTU644	Stenoxybacter	"Proteobacteria"	Betaproteobacteria	Neisseriales	2226
OTU645	Paenalcaligenes	"Proteobacteria"	Betaproteobacteria	Burkholderiales	1761
OTU647	Alcaligenes	"Proteobacteria"	Betaproteobacteria	Burkholderiales	1588
OTU728	Desulfofustis	"Proteobacteria"	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	1699
OTU469	Desulfocurvus	"Proteobacteria"	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	1856
OTU265	Basfia	"Proteobacteria"	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	1315
OTU269	Basfia	"Proteobacteria"	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	1466
OTU633	Marinospirillum	"Proteobacteria"	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	43049
OTU634	Pseudomonas	"Proteobacteria"	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	23438
OTU635	Azomonas	"Proteobacteria"	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	19275
OTU636	Azomonas	"Proteobacteria"	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	3709

VEDLEGG 7

OTU639	Azomonas	"Proteobacteria"	Gamma proteobacteria	Pseudomonadales	3899
OTU701	Sulfurospirillum	"Proteobacteria"	Epsilon proteobacteria	Campylobacterales	3929
OTU255	Anaeroplasma	"Tenericutes"	Mollicutes	Anaeroplasmatales	6880
OTU343	Acholeplasma	"Tenericutes"	Mollicutes	Acholeplasmatales	1360
OTU375	Acholeplasma	"Tenericutes"	Mollicutes	Acholeplasmatales	8407
OTU385	Acholeplasma	"Tenericutes"	Mollicutes	Acholeplasmatales	2296
OTU278	Acanthopleuribacter	"Acidobacteria"	Holophagae	Acanthopleuribacteriales	5011
OTU371	"Coriobacterineae"	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Coriobacteridae	1602
OTU567	Bifidobacteriaceae	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Actinobacteridae	1194
OTU568	Micrococcineae	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Actinobacteridae	1006
OTU576	"Coriobacterineae"	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Coriobacteridae	3106
OTU577	"Coriobacterineae"	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Coriobacteridae	2986
OTU586	Micrococcineae	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Actinobacteridae	2775
OTU600	Micromonosporineae	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Actinobacteridae	1179
OTU607	"Coriobacterineae"	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Coriobacteridae	3267
OTU333	Caldilinea	"Chloroflexi"	Caldilineae	Caldilineales	1252
OTU453	Treponema	"Spirochaetes"	Spirochaetes	Spirochaetales	3101
OTU610	Venenivibrio *	"Aquificae"	Aquificae	Aquificales	23421
OTU706	Simkania	"Chlamydiae"	Chlamydiae	Chlamydiales	2239
OTU707	Caldimicrobium	"Thermodesulfobacteria"	Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteriales	3581

Analyserapport

Moss

UMB
Hansen Jon Fredrik
Boks 5003
1432 Ås



Rapport utført av
akkreditert laboratorium

Report issued by
Accredited Laboratory



Kundenummer	8403537-1726355	Prøvemottak	15.09.2010	Side 1 (1)
Prøvetype	Førprøver	Analyserapport klar	29.09.2010	
Oppdragsmarking	Jon Fredrik Hansen Ressurs 631, stedkode 1934			

Lab.nr.		NOF004667-10	NOF004668-10	NOF004669-10			
Produkt							
Tatt ut		08.09.2010	08.09.2010	08.09.2010			
Merket		1 Fiskeensilasje, Bioforsk	2 Matavfall, Bioforsk	3 Storfegjødsel, Bioforsk			
Parameter	Enhet				Måleu.	Ref/Metode basert på	Lab
Råfett iht SBR	%	19.0	4.4	0.6	±9-30%	NMKL 131, Lidfe	L
Protein N*6,25	%	14.1	4.9	2.3	±10-20%	NMKL nr 6 3 utg	L
Vann	%	65.5	85.8	95.1	±5%	71/393/EEG	L

Karin Danielsen +47 94504297

Lab. ingeniør

Denne rapport er elektronisk signert!