

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Førord

Denne oppgaven ble gjennomført som en del av det to-årige masterstudiet i mikrobiologi ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap. Arbeidet ble utført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap, seksjon for miljømikrobiologi, i perioden august 2011 til august 2012.

Først og fremst vil jeg takke mine dyktige veiledere, hovedveileder Jon Fredrik Hanssen og medveileder Knut Rudi. Jon Fredrik var den som først introduserte meg for den spennende mikrobiologiske verdenen gjennom sitt store engasjement og sin enorme kunnskap. Han skal ha mye av æren for at valget på videre utdanning falt på mikrobiologi. Uten Knut på laget hadde det vært umulig å gjennomføre flere av metodene benyttet i denne oppgaven, og jeg setter stor pris utfordringene jeg ble gitt, og tilliten jeg ble vist. Til tross for at jeg tidvis har slitt ut dørstokkene, har jeg alltid følt meg oppriktig velkommen for en prat hos dere begge. Jeg verdsetter all hjelp og kunnskap som dere har delt, ikke minst at dere har «hatt trua» på oss. Det har jeg virkelig trengt.

Jeg vil også takke medstudent og labpartner, Fredrik Jordhøy, for et godt samarbeid gjennom oppgaven. Jeg har lært mye av våre mange og gode diskusjoner, konstruktive tilbakemeldinger og tette samarbeid. Videre vil jeg takke Live Holø og Rannei Tjøland for korrekturlesing. Ekstra takk til Rannei, for støtte og gode råd de gangene vi stod bom fast.

Sist, men ikke minst ønsker jeg å takke samtlige ved seksjon for miljømikrobiologi. Jeg har følt meg velkommen og inkludert fra første dag, og jeg setter stor pris på de gledene, latteren og kakene dere har delt med meg. Tusen takk for et veldig bra år som masterstudent hos dere!

Live Heldal Hagen
Ås, august 2012

Sammendrag

Verden i dag står overfor store miljømessige utfordringer, som trolig bare vil bli større i fremtiden. Vi produserer mer, vi bruker mer og energietterspørselen øker i takt med avfallshaugen. Dermed har også interessen rundt alternative energikilder og avfallshåndteringer økt de senere årene, for å møte utfordringer og behov på en miljøvennlig måte. Søkelyset er blant annet rettet mot den energirike gassen metan (CH_4), som dannes ved anaerob degradering av biomasse til biogass. I tillegg til å generere fornybar energi, gir denne prosessen en effektiv avfallsbehandling av organisk materiale. Dannelsen av metan fra organisk materiale er en kompleks prosess, utført av et mikrobielt samfunn bestående av ulike bakterier og arker i synergi med hverandre. I Norge er landbruk og fiskenæring er to viktige ressurser, og avfall fra disse industriene har et stort biogasspotensiale. Likevel har erfaringer vist at biogassanlegg ofte kan være ustabile og med et lavt energiutbytte. For å overkomme begrensninger knyttet til prosessen og for optimalisering av biogassproduksjonen, er mer kunnskap rundt den mikrobielle prosessen nødvendig. Hovedmålsettingen med dette arbeidet var derfor å studere sammensetning og utvikling av det mikrobielle samfunnet, og dannelse av biogass i reaktorer med varierte ratioer av storfe gjødsel i kombinasjon med ensilert fiskeavfall.

Biogassproduksjonen viste et avtakende metanutbytte med økende andel fiskeavfall. I tillegg til kvalitative og kvantitative analyser av biomassen og produsert biogass, ble ulike metoder benyttet for å kartlegge mikrobiologisk tilstedeværelse og suksessjon i batchreaktorene med storfe gjødsel og fiskeensilasje. En dyp karakterisering med *high-throughput* Illumina sekvensering avdekket Firmicutes, Bacteroidetes og Proteobacteria som mest tilstedeværende bakteriefylum. Medlemmer av Methanobacteriales ble observert som dominerende innen metanogene arker, og indikerte dermed at det meste av konverteringen til metan skjedde via hydrogenotrof metanogenese. En blandet Sanger-sekvensering utført på de samme prøvene som Illumina sekvenseringen, avslørte en konvergent utvikling i henhold til substrat. I tillegg ble qPCR-basert kvantifisering gjennomført for karakterisering av det relative forholdet mellom andelen av de ulike metanogruppene Methanosarcinales og Methanomicrobiales. *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) benyttet i et forsøk på å kvantifisere forholdet mellom arker og bakterier i bioreaktorene, men bakgrunnsstøy gjorde kvantifisering umulig.

Karakteriseringen av den mikrobielle stukturaen avdekket tilstedeværelsen av de mest sentrale metanproduserende arkene, og som denne oppgaven viser gav Illumina-sekvensering et godt innblikk i det mikrobielle samfunnet i en biogassreaktor.

Summary

The world today is facing major environmental challenges, which will probably only become larger in the future. We produce more, we spend more, and global energy demand increases along with increasing piles of waste. To meet these challenges and demands in an environmentally friendly manner, the interest in alternative energy sources and processing of waste has increased in recent years. The focus has, among other things been directed towards methane (CH₄), an energy-rich gas formed during anaerobic degradation of biomass to biogas. Anaerobic degradation is an effective waste management of organic materials, in addition to generating renewable energy. The formation of methane from organic material is a complex process, carried out by a microbial community of various bacteria and archaea in synergy with each other. Both agriculture and fish industry is important resources in Norway, and waste from these industries have great potential for biogas production. Nevertheless, experience has shown that biogas plants often can be unstable and with a low energy yield. More knowledge is therefore needed, to overcome limitations and to establish an effective utilization of this potential energy source. In this study, our aim was therefore to reveal the microbial development and community structure, in addition to the formation of biogas in batch reactors with different ratio of cow manure and ensiled fish waste.

The biogas production showed a decreasing methane yield, with increasing proportion of fish waste. Different methods were used to determine microbial presence and succession in batch reactors with silage and cattle manure, in addition to qualitative and quantitative analyzes of biomass and biogas production. A deep characterization with *high-throughput* Illumina sequencing, unveiled Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria as the most prevalent bacteria phylums. Species belonging to the order Methanobacteriales was dominant among methanogenic Archaea, indicating the hydrogenotrophic methanogenesis as prominent. A mixed Sanger sequencing performed on the same samples, revealed a convergent development in accordance with the substrate mixture. In addition, qPCR-based quantification was conducted to reveal the relative relationship between the proportion of Methanosarcinales and Methanomicrobiales. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was also used in an attempt to quantify the relationship between the Archaea and Bacteria in the bioreactor, but the background noise made quantification impossible.

The characterization of the microbial structure revealed the presence of the most important methane producing Archaea, and this study shows that the Illumina sequencing gave a good insight into the microbial community in a biogas reactor.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	1
1.1 Anaerob nedbryting; Fra biomasse til biogass	1
1.2 Den anaerobe nedbrytningsprosessen, steg for steg	2
1.2.1 Hydrolyse	3
1.2.2 Acidogenese/fermentering.....	5
1.2.3 Acetogenese/anaerob oksidasjon.....	6
1.2.4 Metanogenese.....	7
1.3 Metanproduserende arker	10
1.3.1 Methanosarcinales	12
1.3.2 Methanomicrobiales	13
1.3.3 Methanobacteriales.....	14
1.3.4 Methanococcales	14
1.3.5 Methanopyrales	14
1.3.6 Methanocellales.....	14
1.4 Biogass	15
1.5 Biomasse	15
1.5.1 Storfegjødsel.....	17
1.5.2 Ensilert fiskeavfall.....	17
1.6 Biogassreaktor	18
1.6.1 Ulike reaktortyper	18
1.6.2 pH og temperatur:	20
1.7 Biogasshemming ved høye ammoniumkonsentrasjoner	21
1.8 Metoder for identifisering og kvantifisering og av biogasskomponenter og flyktige fettsyrer.....	22
1.8.1 Gasskromatografi (GC)	22
1.8.2 Væskekromatografi (HPLC)	23
1.9 Metoder for identifisering av mikrobielle grupper og kartlegging av diversiteten	24
1.9.1 Polymerase chain reaction (PCR).....	24
1.9.2 Kvantitativ PCR (qPCR)	24
1.9.3 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	25
1.9.4 DNA-sekvensering	26
1.10 Oppgavens målsetning:	28

2. Materialer og metoder	29
2.1 Forbehandling og generell håndtering av batchreaktorene	30
2.1.1 Valg av ratio for storfe gjødsel:fiskeensilasje	30
2.1.2 Homogenisering av substratene	30
2.1.3 Serumsflasker ble benyttet som batchreaktorer	31
2.1.4 Åpning av batchfermentorene for uttak av prøvematerialer	31
2.2 Beregning av totalt tørrstoff (TS) og organisk tørrstoff (VS)	32
2.3 Måling av akkumulert gassvolum og beregning av spesifikk gassproduksjon	32
2.4 Kromatografiske metoder for analysering av gass og flyktige forbindelser	33
2.4.1 Gasskromatografi (GC)	33
2.4.2 Væskrokromatografi (HPLC)	34
2.5 Isolering av genomisk DNA	35
2.6 Kvantifisering og kvalifisering av DNA	36
2.6.1 Agarosegel-elektroforese	36
2.6.2 OD-måling	37
2.6.3 Fluorescerende agent	37
2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)	38
2.7.1 16 S rRNA genamplifisering med PRKillumina primersett	39
2.8 DNA sekvensering av mikrobiota	40
2.8.1 Blandet Sanger-sekvensering	40
2.8.2 Dybdesekvensering	42
2.9 Kvantitativ PCR (qPCR)	42
2.10 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	45
3. Resultater	46
3.1 Analyser av biomassen	46
3.1.1 Beregning av totalt tørrstoff (TS) og organisk tørrstoff (VS)	46
3.1.2 Detektering av et utvalg flyktige fettsyrer	46
3.1.3 pH-utvikling i de ulike reaktorene	47
3.2 Analyser av biogassen	48
3.2.1 Beregning av spesifikk gassproduksjon	48
3.2.2 Kvalitativ analyse av biogass med gasskromatografi	51
3.3 Valg av metode for isolering av genomisk DNA fra batchkulturene	53

3.4 16 S rRNA genamplifisering av genomisk DNA med PRKillumina primersett.....	54
3.5 Sekvensering viste lav diversitet for bakterier og arker i batchreaktorene	55
3.5.1 Blandet Sanger-sekvensering	55
3.5.2 Dybdesekvensering	57
3.6 Det relative forholdet mellom andel bakterier og arker	61
3.7 Visualisering av mikrobielle celler ved bruk av <i>fluorescence in situ hybridization</i> (FISH).....	62
4. Diskusjon.....	67
4.1 Gassproduksjon og andel metan varierte med hensyn på ulike blandingsforhold av storfegjødsel og fiskeensilasje.....	67
4.2 Biomassens innhold av flyktige fettsyrer kunne ikke bestemmes.....	69
4.3 Noen få, men svært dominerende mikrobiologiske grupper	69
4.4 Grupperingsmønsteret indikerer konvergent utvikling	72
4.5 FISH viste morfologi og tilstedeværelse av aktive celler i reaktorene	73
4.6 Forholdet mellom tilstedeværelsen av Methanomicrobiales og Methanosarcinaceae detekteres ved pPCR.	74
4.7 Evaluering av metoder og eget arbeid:.....	76
4.7.2 Dybdesekvenseringen viser et tilfredsstillende estimat av diversiteten	76
5. Konklusjon og videre arbeid	78
Referanseliste	81
Vedlegg A	I
Vedlegg B	VII
Materialer	VII
Vedlegg C	XIII
Vedlegg D	XV
Vedlegg E	XXIV
Vedlegg F.....	XXV
Vedlegg G.....	XXVI

Forkortelser

C _t	Syklus grenseverdi
ddNTP	2', 3' - dideoksynukleosidtrifosfat
dH ₂ O	Destillert vann
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleosid trifosfat
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EtBr	Etidiumbromid
EtOH	Etanol
FISH	Fluorescens In Situ Hybridization
GC	Gasskromatografi (Gas Chromatography)
HPLC	Væskeskromatografi (High-Performance Liquid Chromatography)
MQ-vann	MilliQ destillert vann
OD	Optisk tetthet (Optical Density)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase kjedereaksjon (Polymerase Chain Reaction)
PPD	Paraphenylenediamine
qPCR	Kvantitativ PCR (Quantitative PCR)
RNA	Ribonukleinsyre
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre
T _m	Smeltetemperatur
TS	Total tørrstoff (Total Solids)
UV	Ultrafiolet
VFA	Flyktige fettsyrer (Volatile Fatty Acid)
VS	Totalt organisk tørrstoff (Volatile Solids)

1. Innledning

1.1 Anaerob nedbryting; Fra biomasse til biogass

En viktig vei i den globale karbonsyklusen er anaerob konvertering av komplekse, organiske substrater til metan (CH_4). Dette er en naturlig prosess som foregår i miljøer der tilgang til lys eller uorganiske elektronakseptorer, som for eksempel oksygen, nitrat og sulfat er begrensende eller fraværende (Hattori 2008; Schink 1997). Man antar at mellom 1,5 og 2 % av netto karbondioksid (CO_2) fiksert i biomasse via fotosyntesen, ender opp som metan (Liu & Whitman 2008; Thauer et al. 2008). Dette betyr at metanproduserende organismer i fordøyelsessystemet hos drøvtyggere og termitter, ferskvannssedimenter, rismarker, søppelfyllinger og andre anoksiske miljøer genererer rundt 10^9 tonn metan per år (Thauer 1998; Thauer 2010).

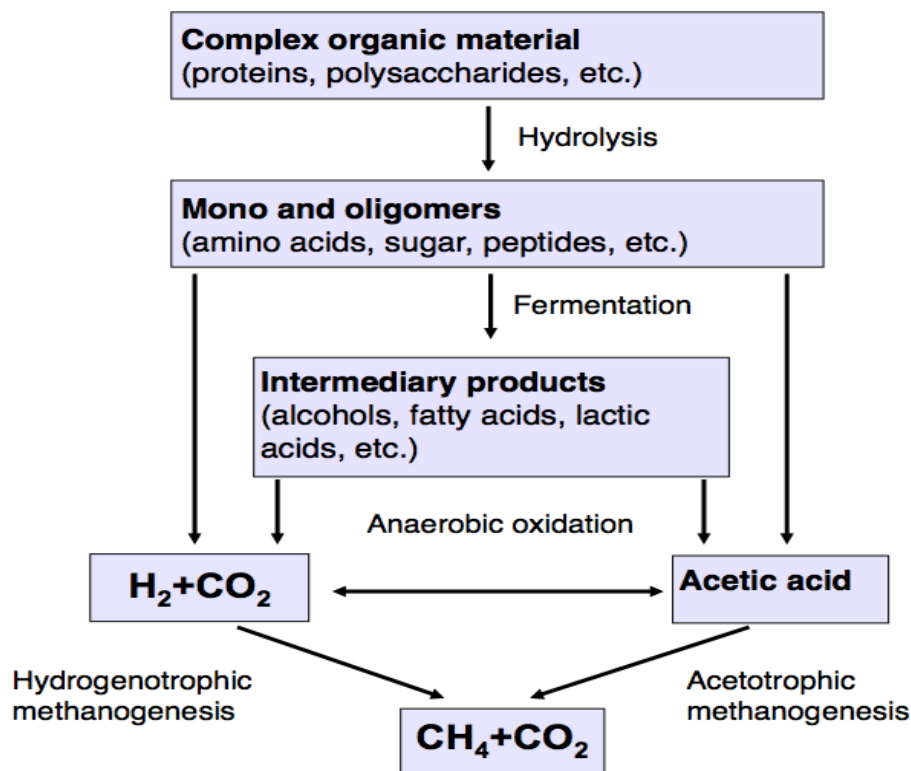
Metan ble først beskrevet i 1776 av den italienske fysikeren Alessandro Volta, som påviste den antennelige naturgassen ved å sette fyr på oppsamlet gass fra en myr (Madigan 2009). Det skulle gå et århundre før man oppdaget at mikroorganismer stod bak metanproduksjonen, og i 1936 lykkes man endelig i (tilsynelatende) å isolere og dyrke metanproduserende organismer *in vitro* (Barker 1956). De metanproduserende mikroorganismene ble senere omtalt som *metanogener*. Etter en stund oppdaget man derimot at disse første isolerte kulturene trolig bestod av to eller flere ulike arter, som var avhengige av hverandres metabolisme for egen vekst (Bryant et al. 1967). Etter hvert ble relativt vellykkede dyrkningsmetoder utviklet (Bryant 1972; Hungate 1969; Miller & Wolin 1974) og flere metanogene arter ble taksonomisk identifisert og fysiologisk beskrevet (Zeikus 1977). I løpet av de siste tiårene har mye skjedd innen forskning på metangenerende biosynteser, og i dag er konverteringen av organisk materiale til metan en velbeskrevet prosess.

Mesteparten av metan som blir produsert i anoksiske miljøer i naturen, vil oksidere til CO_2 og deretter diffundere til anaerobe habitater der gassen tjener som karbon- og energikilde for metanotrofe bakterier (Ferry 1992b). En andel av gassen vil også diffundere ut i atmosfæren, der den deltar i atmosfæriske reaksjoner som en svært reaktiv drivhusgass (Zinder 1993). Fordi metan er en energirik forbindelse, kan den også utnyttes til fordel for mennesker og miljøet vi lever i. Ved oppsamling av biogass fra metangenerende prosesser, kan energien anvendes som varme, strøm eller drivstoff (Petersen 2008). Disse bruksområdene for biogass gagnar miljøet på flere måter. I dagens samfunn produseres mesteparten av energien fra kull

og olje. Men med et globalt økende energiforbruk begynner lageret av fossilt brennstoff å tømmes (IEA 2010). Ved å utnytte metan som fornybar energi, vil det økende energibehovet møtes på en miljøvennlig måte. Biogass kan erstatte fossilt brennstoff som energikilde, samtidig som man ved å utnytte ulike metanreservoarer hindrer metan i å diffundere ut til atmosfæren. Biprodukter og avfall fra husholdninger, matproduksjon og landbruk er typiske reservoarer der metan dannes under anaerobe forhold. I tillegg til å generere energi, gir denne formen for behandling av organisk materiale mange fordeler sammenlignet med tradisjonell avfallsbehandling. Antall søppelfyllinger reduseres, og avfallsbehandlingen er tilnærmet luktfri for nærmiljøet siden prosessen skjer i lukkede omgivelser og mesteparten av de flyktige forbindelsene oksideres under forbrenning (Smet et al. 1999). Det produseres mindre ferdig nedbrutt biomasse enn ved aerobe behandlingstekniker, og denne bioresten kan effektivt utnyttes som gjødsel (Ward et al. 2008).

1.2 Den anaerobe nedbrytningsprosessen, steg for steg

Biomasse er en fellesbetegnelse på organisk materiale, der de mest sentrale forbindelsene er proteiner, lipider, ligniner, pektiner og polysakkaridforbindelser som cellulose, hemicellulose og stivelse. I en anaerob konvertering av biomasse til metan, deltar flere metabolske grupper sammen gjennom syntrofiske interaksjoner. Mikrober innen domenene Bacteria og Archaea (og til en viss grad Eukarya) utnytter hverandres metabolitter, samtidig som de hver for seg spiller en viktig rolle i nedbrytingen av komplekse organiske molekyler til gassene metan og karbondioksid. Hele prosessen kan deles inn i fire trinn; hydrolyse, acidogenese, acetogenese og metanogenese (Gujer & Zehnder 1983). Figur 1. 1 viser en skjematisk fremstilling av de ulike trinnene og synteseveiene som leder til produksjon av biogass.



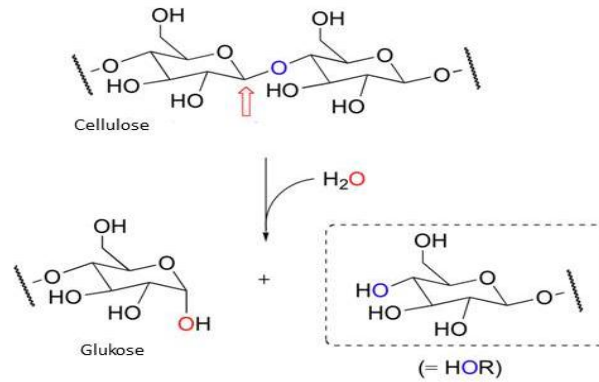
Figur 1. 1. Skjematisk fremstilling av nedbrytningen av biomasse til biogass (CO₂ og CH₄). Prosessen kan deles inn i fire trinn; hydrolyse, acidogenese (fermentering), acetogenese (anaerob oksidasjon) og metanogenese. Fremstillingen er i sin helhet hentet fra Schnürer & Jarvis (2009). Den metylotrofe metanogenesen er ikke inkludert i denne figuren, men vil bli omtalt senere i oppgaven.

I all hovedsak er det tre store fysiologiske grupper av mikroorganismer som utfører denne anaerobe degraderingen: Fermentative bakterier hydrolyserer biopolymerene til løselige monomerer, deretter til fettsyrer, CO₂, H₂ og alkoholer. Proton-reduserende, syntrofiske acetogener oksiderer fettsyrer og alkohol til H₂, acetat, formiat og CO₂, som metanogene arker omdanner til biogass (Hattori 2008; Schink 1997).

I kommende avsnitt gis en beskrivelse av de ulike biokjemiske prosessene som konverterer biomasse til biogass, samt representanter av mikroorganismer som utfører de ulike stegene.

1.2.1 Hydrolyse

Det første steget i nedbrytningen fra biomasse til biogass er hydrolyse. I denne prosessen spaltes et molekyl til to nye molekyler ved tilførsel av H₂O. Et av molekylene mottar vannmolekylets hydrogen atom (H⁺), mens det andre binder hydroksylgruppen (OH⁻) (Figur 1. 2). Slik blir biopolymerer som lipider (fett), proteiner, cellulose og andre karbohydrater konvertert til mindre, organiske forbindelser som fettsyrer, aminosyrer, enklere sukkerforbindelser og alkoholer.



Figur 1. 2. Hydrolytisk reaksjon av cellulose til glukose. Cellulose består i hovedsak av kjeder med glukosemolekyler. Glykosidbindinger mellom to glukosemolekyler i cellulose brytes (rød pil) av et hydrofilt angrep. Resultatet er en nedbrytning av polymerer til monomerer. Reaksjonen er enzymatisk katalysert.

For å kunne benytte komplekse organiske materialer til næring og energi, produserer bestemte bakterier ekstracellulære enzymer som bryter ned forbindelsene før de fraktes inn i cellen (Schink 1997). Biomasse fra for eksempel storfe gjødsel inneholder store mengder uløselige biopolymerer, med så høy molekylvekt at de sjelden kan benyttes direkte som kilde til substrat for mikroorganismer. Hydrolyse av disse polymerene til enklere forbindelser gjør substratene tilgjengelig for fermenterende bakterier, og er derfor et svært viktig steg i konvertering av biomasse. Ulike enzymer bryter ned ulike forbindelser, og effektiviteten av nedbrytingen er avhengig av enzymets natur og stoffets struktur (Howell & Stuck 1975; Lee & Fan 1982). Hydrolyse av proteiner utføres av proteolytiske bakterier fra slekter som *Clostridium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* og *Bifidobacterium*, og ulike aminosyrer er primært endeproduktet (Ramsay & Pullammanappallil 2001; Wallace & Brammall 1985). Sukkerforbindelser, eller polysakkarider, brytes ned av ulike bakterier innen *Bacteroides*, *Clostridium* og *Acetivibrio* (Salyers et al. 1977; Shallom & Shoham 2003). For nedbryting av fett benyttes lipase, et enzym som stort sett produseres av strengt anaerobe eller fakultativt aerobe bakterier. Arter innen *Bacillus*, *Burkholderia*, *Acinobacter*, *Pseudomonas* og *Clostridia* er noen eksempler på viktige lipase-produserende bakterier i anaerobe miljøer (Gupta et al. 2004; Petersen & Daniel 2006).

Tabell 1. 1. Hydrolyse av ulike biopolymerer under anaerobe forhold katalyseres av en rekke enzymer. Tabellen viser eksempler på viktige grupper av hydrolytiske enzymer som bryter ned polymerer i biomasse («Substrat») under anaerobe forhold, samt hydrolyseprodukt og eksempler på representative mikrobegrupper.

Enzymer	Substrat	Hydrolyseprodukt	Eksempel på mikroorganismer
Proteinase	Proteiner	Aminosyrer	<i>Clostridium, Peptostreptococcus, Bifidbacterium, Bacteroides ruminicola, Streptococcus bovis</i>
Cellulase	Cellulose	Cellobiose og glukose	<i>Acetivibrio, Ruminococcus, Bacteroides, Clostridium</i>
Hemicellulase	Hemicellulose	Sukker (glukose, xylose, mannose o.l.)	Clostridia; <i>Clostridium cellulovorans, Clostridium acetobutylicum</i>
Amylase	Stivelse	Glukose	Clostridia, <i>Lactobacillus, Bacteroides</i>
Lipase	Lipid/fett	Fettsyrer og glyserol	<i>Burkholderia, Bacillus, Clostridium tetanomorphum</i>
Pectinase	Pectin	Sukker (galaktose, arabinose, polygalacturonic acid)	Clostridia, <i>Bacteroides, Enterobacter</i>

Produktene fra hydrolysen, som for eksempel aminosyrer og enklere sukkerforbindelser, benyttes videre av ulike fermenterende bakterier.

1.2.2 Acidogenese/fermentering

Fermentering er en anaerob konvertering av organisk materiale uten tilgang på uorganiske elektronakseptorer, som sulfat, nitrat og oksygen (Madigan 2009). I likhet med hydrolysen, består også denne prosessen av flere reaksjoner. Under acidogenesen skjer en fermentering av monomerer fra hydrolysen (sukker, aminosyrer, puriner og pyrimidiner, fettsyrer osv.) til reduserte forbindelser som H₂, CO₂, alkoholer, flyktige fettsyrer og organiske syrer (som for eksempel acetat, succinat og lactat), i tillegg til noen aromater (Hattori 2008; Ramsay & Pullammanappallil 2001; Schink 1997). Flere av de fermenterende bakteriene som deltar i denne prosessen er de samme som utfører hydrolysen (Schink 1997), i tillegg til andre bakteriearter fra blant annet slektene *Aminobacterium*, *Enterobacterium* og *Eubacterium* (Baena et al. 2000; Tanisho et al. 1983; Zindel et al. 1988)

Fermenteringsproduktet varierer avhengig av substratets natur, miljøforhold og organismene tilstede. Syrer som dannes fra fermentering av f. eks. aminosyrer, har ofte likevekt mellom ladet og uladet form. Dette vil si at dersom pH i en biogassprosess er høyere enn 7 vil syrene

hovedsakelig forekomme som anioner, eksempelvis som formiat (HCOO^-), acetat (CH_3COO^-), propionat ($\text{C}_2\text{H}_5\text{COO}^-$) og butyrat ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$) (Schnürer & Jarvis 2009). H_2 og monokarbonforbindelser som CO_2 og acetat, kan konverteres direkte til metan av metanogene arker (via metanogenesen). Alkoholforbindelser som inneholder flere karbon, eller forgrenede og aromatiske fettsyrer må degraderes videre via anaerob oksidasjon, som utføres av en ny gruppe fermenterende bakterier (Schink 1997).

1.2.3 Acetogenese/anaerob oksidasjon

I acetogenesen oksideres de reduserte fermenteringsproduktene fra acidogenesen, til (primært) acetat og H_2 eller formiat (Ferry 1992b). Acetogenesen er metabolismen til syredannede bakterier med samlebetegnelsen *acetogener*. H_2 er i hovedsak elektrondonor i acetogenesen, men også C_1 -forbindelser, sukker, organiske syrer, aminosyrer, alkoholer og visse nitrogenbaser kan benyttes som elektrondonor av bestemte acetogene bakterier (Madigan 2009). Fordi de metanproduserende organismene ikke kan benytte seg av produktene fra fermenteringen, er acetogene bakterier en helt avgjørende gruppe mikroorganismer for dannelsen av metan.

Produktene fra acetogenesen er acetat, H_2 og CO_2 (Madigan 2009). Dette er sluttprodukter for bakteriene som fermenterer disse metabolittene, men fungerer som substrat for andre fermenterende bakterier, og for metanproduserende organismer. For at acetat, H_2 og CO_2 skal kunne dannes som et produkt av fermenteringen, må H_2 konsentrasjonen holdes lav (Conrad et al. 1986; Conrad 1999; Hoehler et al. 1998). Ved høy konsentrasjon av H_2 , kombinert med pH over 7 og lav temperatur, vil konverteringen fra CO_2 og H_2 til etansyre være den foretrukne syntesen hos de acetogene bakteriene. Den totale reaksjonen vil være endergonisk, og dermed stoppe opp (Schink 1997; Thauer 1990; Thauer et al. 2008). Dersom pH blir lavere enn 7 ved høy temperaturer og lav H_2 -konsentrasjon, vil derimot det motsatte skje; acetogene bakterier konverterer etansyre til dannelsen av H_2 og CO_2 (Thauer et al. 2008). Hele prosessen er derfor avhengig av et tett samarbeid mellom hydrogenprodusenter og hydrogenkonsumenter.

I en bioreaktor vil H_2 -konsumenten være metanogene mikroorganismer, som forbruker H_2 -molekyler etter hvert som en gruppe syntrofe acetogener oksiderer fermenteringsprodukter (Schink 1997; Schnürer et al. 1999). *Acetobacterium woodii* (Balch et al. 1977), *Clostridium ultunense* (Schnürer et al. 1996) og flere stammer innen slektene Syntrophomonas, Syntrophus, Syntrobacter og Desulfovibrio er eksempler på noen acetogener som utfører

syntrofisk acetat-oksidasjon (McInerney et al. 2008). Syntrofisk acetat-oksidasjon gir en lav degraderingsrate, fordi den lave mengden tilgjengelig energi må fordeles mellom de ulike deltakende organismene (Schnürer et al. 1999).

Hvordan de øvrige forbindelsene videre blir degradert til metan, er avhengig av tre ulike metabolske veier som de metanogene organismene benytter seg av; hydrogenotrofisk, acetotrofisk og metyloτροφisk metanogenese (Ferry 1993).

1.2.4 Metanogenese

Metan vil i hovedsak være sluttproduktet i en anaerob nedbryting av biomasse. Den biologiske synteseveien som danner metangass kalles metanogenese, og drives av mikroorganismer tilhørende domenet *Archaea*.

Sammenlignet med anaerob respirasjon, og andre alternativer til cellulær respirasjon, er metanogenesen den reaksjonen som gir minst energiutbytte for cellen (Schink 1997). Den lave energiutvekslingen involvert i reaksjonen er årsaken til at det er nødvendig med et tett samarbeid mellom ulike mikroorganismer for konvertering av biomasse til biogass. I tillegg er dette trolig en forklaring på hvorfor metanogenesen er det avsluttende steget etter at andre elektronakseptorer er redusert (Schink 1997). Når svovel, nitrat, Mn (VI) og Fe(III) er tilstede vil disse nemlig fungere som elektronakseptorer i en anaerob respirasjon, som dermed utkonkurrerer anaerob degradering med metan som hovedprodukt (Thauer et al. 2008). På grunn av det lave energiutbyttet, blir en stor andel av energien tilgjengelig i aerob biomassekonvertering bundet opp som metan. Denne energien kan senere utnyttes av aerobe organismer, eller som fornybar energi for menneskelig aktivitet (Schink 1997).

I de kommende seksjonene legges det vekt på den biokjemiske prosessen som de metanogene organismene utfører. I seksjon 1.3 gis en mer utfyllende beskrivelse av de ulike metanogene arkene.

1.2.4.1 Energimetabolismen til metanogene mikroorganismer

Flere av de biokjemiske reaksjonene i metanogenesen er avhengig av en rekke unike koenzymmer og membranbundne enzymkomplekser. Et koenzym kan i seg selv ikke katalyserer en enzymatisk reaksjon, men aktiverer enzymer ved å binde til et apoenzym. De mest essensielle koenzymene i metanogenesen kan deles inn i to grupper: C₁-bærere, som viderefører karbon fra startsubstrat (CO₂) til endeprodukt (CH₄), og redoks-koenzymmer som forsyner reduksjonsreaksjonen (fra CO₂ til CH₄) med elektroner (Madigan 2009). Noen av de viktigste koenzymene som deltar i metanogenesen er gitt i tabell 1. 2.

Tabell 1. 2: Viktige koenzymmer involvert i metanogenesisen. Koenzymene deles inn i to kategorier, basert på enzymets funksjon (Madigan 2009; Thauer 1998).

Kategori	Navn	Beskrivelse
<i>C₁- bærere:</i>	Methanofuran (MFR)	Deltar i det første steget i metanogenesisen; Furanring med amino nitrogengruppe som binder CO ₂ .
	Tetrahydro-methanopterin (H ₄ MPT)	Bærer C ₁ grupper som reduseres til metylnivå, før de overføres til CoM.
	Methanopterin	Fører C ₁ fra et mellomliggende steg av reduksjon av CO ₂ , til metan
	Koenzym M (CoM): F430	Kreves for konvertering av metylgruppen (CH ₃) til CH ₄ i det avsluttende steget av metanogenesisen En del av metyl-reduktase enzymkomplekset
<i>Redoks-koenzymmer:</i>	F420	Elektron donor i flere steg i CO ₂ - reduksjonen
	Coenzym B (CoB).	Elektron donor, og nødvendig for avsluttende steg i metanogenesisen. Katalysert av <i>methyl reductase</i> enzym komplekset.

Metanogenesisen skiller seg fra andre synteseveier ved at generering av ATP ikke kommer fra substratnivå fosforylering. ATP syntesen drives derimot av en kjemoosmotisk mekanisme, enten «proton motive force», eller for hydrogenotrofe metanogener; «sodium motive force» (Ferry 1992b; Thauer et al. 1977). En del av de metanogene artene inneholder dessuten cytocromer, et membranbundet protein med heme-gruppe, som driver elektrontransport (Ferry 1992b; Thauer et al. 2008).

1.2.4.2 Acetotrof, hydrogenotrof og metyloτροφ metanogenese

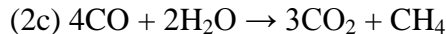
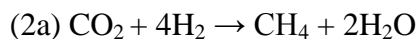
Det er oppdaget tre hovedsynteseveier for metandannelse, basert på hvilken karbonkilde de metanogene arkene benytter for vekst; acetat, CO₂ eller metylerte forbindelser. Den avsluttende konverteringen til metan er felles for alle tre, mens de innledende reaksjonene skiller seg fra hverandre.

I den acetotrofe metanogenesisen dannes en metyl- og karbonylgruppe fra fermenteringen av acetat (CH₃COO⁻). Metylgruppen konverteres direkte til metan via flere biokjemiske reaksjoner, med elektroner fra oksideringen av karbonylgruppen til CO₂ (ligning 1) (Ferry 1992b; Ferry 2010).



For at en spalting skal kunne skje, må acetat først aktiveres til acetyl-CoA. Deretter katalyserer enzymkomplekset CO-dehydrogenase (CODH) splitting av acetyl-CoA til en metylgruppe og en karbonylgruppe. Selve splittingen skjer i enzymkompleksets Ni-Fe senter. Den enzytbundne karbonylgruppen oksideres til CO₂, mens metylgruppen overføres til HS-CoM. CH₃-S-CoM-metylreduktase katalyserer en reduktiv demetylering av CH₃-S-CoM til CH₄ (Ferry 1992b). Kun to slekter er kjent som acetotrofe metanoger; *Methanosarcina* og *Methanosaeta* (Hattori 2008; Zinder 1993). Til tross for den svært snevre diversiteten blant acetotrofe metanogener, antas det at en stor andel av CH₄ dannes fra acetotrof metanogenese, og beregninger har vist at så mye som 2/3 av metandannelsen i visse miljøer produseres fra spalting av acetat (Ferry 1992b; Mackie & Bryant 1981; Madigan 2009; Smith & Mah 1966).

Den andre metabolske veien til dannelse av metan kalles hydrogenotrof metanogenese, og er en CO₂-reducerende syntesevei som benytter en serie reduktaser til konvertering fra CO₂, formiat eller karbon monoksid (CO), til metan (ligning 2a - c) (Ferry 2010; Madigan 2009).



Når CO₂ binder til koenzymet metanofuran (MFR), reduseres molekylet til formylnivå, med redusert ferredoxin (Fd) som elektrondonor. Formylgruppen overføres deretter til koenzymet tetrahydromethanopterin (H₄MPT), og danner komplekset formyl-H₄MPT. Formylgruppen dehydreres og reduseres til en metylengruppe (CH₂=H₄MPT), som deretter reduseres til metyl-H₄MPT, med redusert F₄₂₀ som elektrondonor. Metylgruppen overføres deretter til CoM, som sammen danner forbindelsen metyl-CoM. I metanogenesens avsluttende steg katalyserer metyl-CoM-reduktase (Mcr) reduksjonen av metyl-CoM til metan, med CoB som elektrondonor (oksidert CoB: CoM-S-S-CoB) (Liu & Whitman 2008; Thauer 1998). De aller fleste metanogene arker er hydrogenotrofe, og reduserer CO₂ til CH₄ med H₂ som primær elektrondonor. Mange av disse kan i tillegg benytte seg av formiat ved oksidering av fire formiatmolekyler til CO₂, katalysert av formiat dehydrogenase (Fdh) (Schauer & Ferry 1980). Noen få arter kan også benytte etanol eller sekundær-alkoholer som elektrondonor (Frimmer & Widdel 1989; Widdel 1986; Zellner & Winter 1987).

Den siste synteseveien er det utelukkende arter av ordenen Methanosarcinales, i tillegg til *Methanospaera sp* (orden Metanobacteriales), som kan benytte seg av (Liu & Whitman

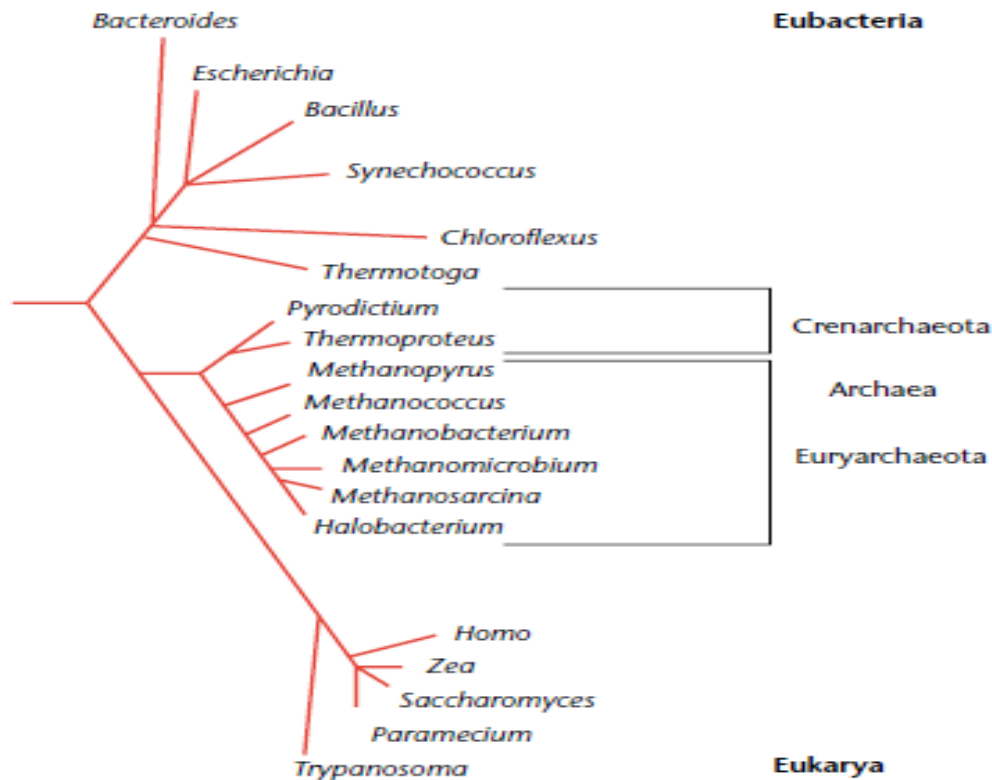
2008). Ved metyloτροφ metanogenese utfører metylotrofe metanogener konverteringen av metylerte C₁-forbindelser (karbonforbindelser med et karbonatom, som inneholder en metylgruppe), som for eksempel metanol, trimetylamin og dimetylsulfid til metan (ligning 3).



Forbindelsens metylgruppe overføres til CoM og reduseres til metan. Som elektrondonor benyttes H₂, eller elektroner fra oksidering av metylgruppen til CO₂. Elektronene som trengs for reduksjonen av metylgruppen skaffes fra oksidasjon av ytterligere metylgrupper til CO₂, og for hver CO₂ som dannes må tre metylgrupper reduseres til metan (Liu & Whitman 2008).

1.3 Metanproduserende arker

Selv om arker deler mange egenskaper med både Bacteria- og Eukarya-domene, er de evolusjonært ulike. Tidligere antok man at dette dreide seg om spesialiserte mikroorganismer innen domenet Bacteria, og de ble lenge omtalt som *arkebakterier*. På grunn av organismenes molekylære karakteristik, viste denne betegnelsen seg å være misvisende. I 1990 ble det derfor foreslått av Woese et al. (1990) å avskjære denne mikrobiske gruppen til et eget domene; *Archaea*. I tillegg til Euryarchaeota, faller også den fylogenetiske hovedgruppen Crenarchaeota under dette domenet (Barber 2001; Cavicchioli 2011). De evolusjonære forholdene illustreres i det fylogenetiske treet i Figur 1. 3. Metanogener er samlebetegnelsen på en gruppe obligat anaerobe Euryarchaeota, som omdanner CO₂ og H₂, formiat, metanol, methylaminer og/eller acetat til metan. Dette er den største, og mest varierende gruppen innen domenet arker (Ferry 1992a; Woese et al. 1990).



Figur 1. 3. Fylogenetisk forhold mellom levende organismer, basert på sammenligninger av ribosomalt RNA. Arkea er et eget domene, og deles inn hovedgruppene Crenarchaeota og Euryarchaeota. Det sistnevnte mikrobielle riket domineres av metanproduserende organismer. Hver gruppe er representert med en egen gren. Den metanogene ordenen som ble sist oppdaget, Methanocellales, mangler derimot i denne fremstillingen. Figuren er i sin helhet hentet fra Barber (2001).

Det er identifisert seks ulike ordner av metanogene arker; Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanococcales, Methanopyrales (Thauer et al. 2008) og Methanocellales (Sakai et al. 2008). For disse organismene er metanogenesen den eneste måten å generere energi til vekst på (Thauer 1998). Med unntak av acetat, pyruvat og formiat, kan ikke metanogener utnytte organiske forbindelser. Substratene som metanogener er avhengige av, begrenser seg til tre hovedgrupper: CO₂-type substrater, forbindelser som inneholder en metylgruppe, og acetotrofiske substrater (Liu & Whitman 2008; Zinder 1993). Til nå er det oppdaget at renkulturer av metanogene arter kan utnytte til sammen 11 ulike substrater. Disse forbindelsene, samt hvilken kategori substratene faller inn under er gitt i tabell 1. 3, som i sin helhet er hentet fra Madigan (2009). Den biokjemiske nedbrytningsprosessen av disse tre ulike substrattypene er tidligere forklart i seksjon 1.2.4.

Tabell 1. 3. Metanogene arker konverterer til sammen 11 ulike substrater til metan (Madigan 2009). Disse deles inn i tre grupper, og brytes ned etter de tre ulike biokjemiske prosessene; hydrogenotrof, metylotrof og acetotrof metanogenese.

CO₂-type substrater:	Karbondiokside, CO ₂ Formiat, HCOO ⁻ Karbon monokside, CO
Metyl substrater:	Metanol, CH ₃ OH Metylamin, CH ₃ NH ₃ ⁺ Dimetylamin, (CH ₃) ₂ NH ₃ ⁺ Trimetylamin, (CH ₃) ₃ NH ₃ ⁺ Metylmerkaptan, CH ₃ SH Dimetylsulfid, (CH ₃) ₂ S
Acetotrofe substrater:	Acetat, CH ₃ COO ⁻ Pyruvat, CH ₃ COCOO ⁻

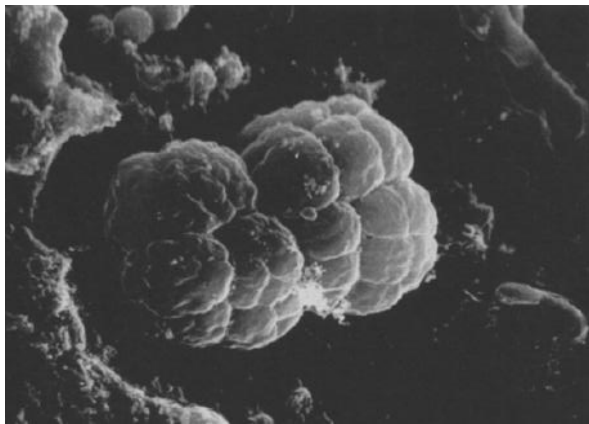
Som en konsekvens av denne spesialiseringen, er arkene avhengig av et nettverk av ulike, samarbeidende mikroorganismer for å få tilgang på substrater for energi og vekst (Zinder 1993). Dette nettverket består av anaerobe bakterier, protozoer og/eller fungi og syntrofiske bakterier (Thauer et al. 2008). Tidligere publikasjoner av studier på anaerobe reaktorer har anslått at tilstedeværelsen av metanogene arker kan være alt fra 10 % til 90 % av total andel prokaryote celler (Raskin et al. 1994; Raskin et al. 1995).

1.3.1 Methanosarcinales

Som eneste acetat-utnyttende organisme, antas Methanosarcinales som svært viktig bidragsyter til den globale metandannelsen. I tillegg til å ha en variert cellulær morfologi, kan medlemmene av Methanosarcinales benytte seg av et vidt spekter av substrater for vekst. Noen av slektene kan utnytte opptil 7 ulike substrater, noe som ansees som mange i den metanogene verden, der de fleste bare kan bruke en til to ulike forbindelser for sin metabolisme (Liu & Whitman 2008; Thauer et al. 2008; Zinder 1993). De aller fleste genererer metan ved konvertering av metylerte C₁-forbindelser, eller ved spalting av acetat til CO₂ og CH₄.

Ordenen Methanosarcinales deles inn i to familier; Methanosarcinaceae og Methanosaetaceae. Medlemmene av Methanosarcinaceae er metylotrofe, i tillegg til at mange av artene også kan vokse på CO₂/H₂ og ved spalting av acetat (Boone et al. 1993). Denne gruppen av metanogener representeres både av mesofile og termofile arker, og inkluderer slekter som *Methanosarcina* (derblandt artene *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazeii*), *Methanolobus*, *Methanohalobium*, *Methanococcoides*, *Methanohalophilus* og *Methanosalsum*

(Boone et al. 1993; Madigan 2009). Methanosarcinaceae opptrer som enkle, kokkoide celler, eller i større, karakteristiske aggregater (Boone et al. 1993).



Figur 1. 4. Skanning elektronmikroskop (SEM) - bilde av *Methanosarcina mazeii*, isolert fra rismarker. Cellene danner typisk et pseudosarcinacuster på 1-3 μm i diameter. Selv om denne aggregatstrukturen er den dominerende morfologien, observeres også kokkoide enkeltceller av *M. mazeii* (Asakawa et al. 1995).

Arrangering i aggregater er den dominerende strukturen for *Methanosarcina*, men strukturen kan under gitte forhold oppløses til enkeltceller (Maestrojuàn & Boone 1991; Sowers et al. 1993).

I motsetning til mangfoldet innen Methanosarcinaceae, inneholder Methanosaetacea bare en slekt, *Methanosaeta*, hvorav alle cellene vokser ved å spalte acetat (som eneste substrat) til metan og CO_4 (Boone et al. 1993). Til tross for denne gruppens svært spesifikke næringskrav, har den en unik utnyttelse av acetat og kan vokse på konsentrasjoner ned til 5- 20 μM . (Liu & Whitman 2008). *Methanosaeta* vokser som staver omsluttet av en kappe, ofte i lange kjeder (Patel & Sprott 1990).

1.3.2 Methanomicrobiales

Medlemmene av Methanomicrobiales er hydrogenotrofe, og produserer metan fra CO_2 med H_2 som elektrondonor. I tillegg til H_2 kan de fleste artene også utnytte formiat. Flere av medlemmene bruker også sekundære alkoholforbindelser som en alternativ elektrondonor, og de fleste artene krever acetat som karbonkilde for cellevekst (Boone et al. 1993; Liu & Whitman 2008). Cellemorfologien er oftest irregulære kokker, men medlemmer av Methanomicrobiales kan også forekomme i plateform, eller som staver (Boone et al. 1993). Methanomicrobiales deles inn i to familier: Methanomicrobiaceae og Methanocorpusculacea. Methanocorpusculacea er bare representert med en kokkoid art, mens Methanomicrobiaceae har en større diversitet av fylogeni og morfologi, blant annet spiralformet, j.f. *Methanospirillum* (Barber 2001).

1.3.3 Methanobacteriales

Ordenen Methanobacteriales består i hovedsak av stavformede, obligat hydrogenotrofe arker. Denne fylogenetiske gruppen deles inn i to familier, der Methanothermaceae kun består av den ekstremt termofile *Methanothermus*-slekten, mens Methanobacteriaceae representeres av flere slekter, deriblant *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanothermobacter* og *Methanosphaera*. *Methanosphaera* skiller seg derimot ut, da medlemmer av denne slekten har kokkoid struktur og kan bare vokse ved å redusere metanol til metan, med H₂ som elektron donor (Boone et al. 1993). Studier har vist at Methanobacteriales ofte er den mest dominerende metanogene gruppen i termofile reaktorer (Bauer et al. 2008).

1.3.4 Methanococcales

Methanococcales er, som navnet tilsier, irregulære kokker som får energi ved å utnytte H₂ eller formiat til reduksjon av CO₂ til CH₄. Methanococcales ansees som en marin metanogen, og mange av medlemmene er halofile (Boone et al. 1993). Representanter fra Methanococcales kan vokse i alt fra mesofile til hypertermofile miljøer, og deles inn i to familier basert på temperaturoptimum og -toleranse. Methanococcaceae består av mesofile og ekstremt termofile metanoger, h.h.v *Methanococcus* og *Methanothermococcus*. Methanocoldococcaceae inkluderer slektene *Methanocaldococcus* og *Methanotorris*, som begge er hypertermofile og vokser ved temperaturer over 85 °C (Liu & Whitman 2008).

1.3.5 Methanopyrales

Methanopyrus kandleri er Methanopyrales eneste art, og består av hydrogenotrofe stavformede organismer som vokser i hypertermofile miljøer med temperaturer opp til 110 °C (Boone et al. 1993; Liu et al. 2006). *Methanopyrus kandleri* kan kun utnytte CO₂ sammen med H₂ for metangenerering (Huber et al. 1989).

1.3.6 Methanocellales

Methanocellales ble for første gang isolert og karakterisert av Sakai og samarbeidspartnere i 2008, og er således den nyeste definerte gruppen i av metanogener. Dette er en mesofil, hydrogenotrof arke, som danner metan fra CO₂ og H₂ eller formiat. Den isolerte arten, *Methanocella paludicola* trenger i tillegg acetat for cellevekst. 16S rRNA gensekvens analyser plasserer denne metanogene ordenen mellom Methanomicrobiales og Mathanosarcinales. Cellene er uten bevegelse og opptrer som enkeltceller med stavform, i tillegg til at kokkoide celler er identifisert i eksponentiell fase (Sakai et al. 2008).

1.4 Biogass

Biogass består av en blanding av 48-65 % CH₄ og 36-41 % CO₂ (Mata-Alvarez 2003; Ward et al. 2008), i tillegg til små mengder av andre gasser og vanndamp (Rasi et al. 2007; Weiland 2010). Både metan og karbondioksid er potensielle drivhusgasser, og menneskeskapt metanutslipp er antatt å stå for en stor andel av den globale oppvarmingen som verden står ovenfor (Alexander 1994). Metan som drivhusgass er kalkulert til å være 25 ganger mer reaktiv enn karbondioksid, og forblir i atmosfæren i 9-15 år (Madsen 2011). Fordi metan er en energirik forbindelse, egner gassen seg også som kilde til fornybar energi. Den vanligste anvendelsen i dag er at biogassen brennes direkte, og dermed forsyner lokale områder med varme. Gassen kan også omformes til elektrisitet i generatorer, og vil ved transport over ledninger kunne forsyne en større region. Metangass kan også videreføres til drivstoff (Hagen et al. 2010). Kontrollert anaerob nedbrytning av organisk materiale er derfor fordelaktig på flere måter. Ved å behandle organisk avfall i lukkede omgivelser, hindres emisjon av metan til atmosfæren, samtidig som en fullstendig forbrenning av biogass vil kunne erstatte bruk av fossile brennstoff. Dermed reduseres utslipp av karbondioksid som ikke er en del av den forhenværende karbonsyklusen (Chynoweth et al. 2001). I tillegg kan det ferdig nedbrutte materialet (biorest) med stort hell benyttes som gjødsel for jordbruksmål (Ward et al. 2008; Weiland 2010). Biorest har de samme egenskapene som ubehandlet gjødsel, i tillegg til at andelen organisk nitrogen er redusert mens mengden mineralsk nitrogen er større, som en følge av biogassprosesseringen.

Selv om interessen og utviklingen rundt utnyttelse av biogass som energikilde er økende, har denne typen fornybar energi fortsatt et stort potensiale. En rapport fra 2010, utført av International Energy Agency (IEA), viste at omtrent 10,2 % av det globale energiforbruket dekkes av biomassekonvertering (Eisentraut 2010). Hele 88 % dekkes fortsatt av fossile brennstoff (Weiland 2010).

1.5 Biomasse

Så lenge karbohydrater, proteiner, fett, cellulose og hemicellulose er hovedkomponenter, kan hvilken som helst type biomasse benyttes som substrat for biogassproduksjon (Weiland 2010). Mikroorganismene er i tillegg avhengige av en mengde sporelementer for vekst, som for eksempel nikkel, jern og selen. Tradisjonelt sett er slam fra kommunale renseanlegg og storfe gjødsel benyttet som substrat i biogassanlegg. Flere anlegg benytter også matavfall fra kildesortert husholdningsavfall, matvarebutikker, restauranter og hoteller, samt avfall fra slakteri og matindustrien for øvrig (Schnürer & Jarvis 2009; Zhang et al. 2007). I senere tid

har flere studier vist at biomasse sammensatt av flere ulike substrater, omtalt som «*co-digestion*» i litteraturen, ofte gir høyere mikrobiologisk diversitet, et mer stabilt mikrobefunn og høyere metanutbytte enn enkeltsubstrat (Hartmann & Ahring 2005; McHugh et al. 2003). En av grunnene til dette, er at et sammensatt materiale ofte dekker organismenes næringsbehov bedre, særlig med tanke på de essensielle sporstoffene. Fordi karbohydrater, proteiner og fett har ulikt energiinnhold, påvirkes biogassutbyttet i stor grad av substratets sammensetning. Fett har lav biotilgjengelighet (Petruy & Lettinga 1997), men inneholder mye energi, og gir derfor teoretisk sett det høyeste utbyttet av biogass. Karbohydrater og proteiner degraderes derimot raskt, men gir et lavere utbytte (Vidal et al. 2000; Weiland 2010).

Tabell 1. 4. Teoretisk gassutbytte og sammensetning av biogass (Schnürer & Jarvis 2009)

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

Det teoretiske gassutbyttet kan estimeres for de enkelte komponentene. Beregninger av biogassvolum og teoretisk andel av metan vises i tabell 1. 4, som i sin helhet er hentet fra Schnürer & Jarvis (2009). Verdiene av beregnet biogass-sammesetning varierer noe i litteraturen. Teoretiske beregninger er ofte overestimerte i forhold til faktisk gassutbytte (Møller et al. 2004b), og disse verdiene må derfor bare sees på som veiledende eksempel.

I tillegg til at de nødvendige næringsstoffene må være tilgjengelig i substratet, har ratioen av karbon og nitrogen vist seg å være en viktig faktor for konverteringsprosessen (Lin & Lay 2004). Akseptert C/N ratio varierer mellom ulike substrater og prosesseringsforhold, men ligger mellom 10 og 30, med et optimum rundt 15-25 (Schnürer & Jarvis 2009; Yen & Brune 2007). Dersom ratioen er for høy, kan nitrogenmangel hemme veksten av mikroorganismer. En lav ratio vil derimot kunne føre til frigjørelse av store mengder ammoniakk, og dermed gi en hemming av prosessen. C/N ratioen påvirker også i stor grad kvantitet og kvalitet av flyktige fettsyrer (VFA) som dannes i prosessen (Liu et al. 2008; Yen & Brune 2007).

I arbeidet med denne oppgaven er storfegjødsel og ensilert fiskeavfall benyttet som substrater. I den kommende seksjonen er det derfor fokusert på disse to materialene.

1.5.1 Storfegjødsel

Tilgangen til husdyrgjødsel er stor i landbruksområder. Ved utnyttelse av gjødsel som substrat, reduserer man emisjon av drivhusgasser til atmosfæren, som ellers frigis ved lagring (Møller et al. 2004a). Gjødsel fra storfe som eneste substrat vil generelt gi et lavere gassutbytte enn gjødsel fra fjærkre og gris, fordi mye av det organiske materialet allerede har gjennomgått nedbrytning til metan i fordøyelsessystemet til drøvtyggere (Møller et al. 2004b; Weiland 2003). Som tilleggssubstrat til f.eks. matavfall, mais og korn, er storfegjødsel derimot godt egnet, siden gjødsel inneholder flere av mikroorganismene som kreves for anaerob nedbrytning (Schnürer & Jarvis 2009). I tillegg har storfegjødsel en høy bufferkapasitet, som stabiliserer pH verdien ved VFA akkumulering (Weiland 2003; Weiland 2010).

1.5.2 Ensilert fiskeavfall

Fiskeavfall fra slakteri og oppdrettsnæring utgjør en stor «utnyttet» ressurs langs norskekysten. I en rapport utført av stiftelsen RUBIN, ble den totale mengden av biråstoff fra fisk og skalldyr beregnet til 816 000 tonn i 2011 (RUBIN 2011). Dette materialet inneholder mye fett og proteiner og har derfor også et stort potensiale, blant annet som substrat i biogassanlegg. Ved anaerob behandling av fiskeavfall reduseres avfallsmassen, spredning av parasitter og patogene mikroorganismer forhindres, og emisjon av ubehagelig lukt unngås. Fordi forråtnelsesprosessen av fiskeavfall skjer raskt, er konservering ofte nødvendig for senere å kunne utnytte avfallet til ulike formål. Konservering ved ensilering er en måte å holde avfallet lagringsstabil over lengre tid, siden pH senkes til et nivå nedbrytere ikke kan leve på. Hvor lav pH som er nødvendig for å stoppe nedbrytningsprosessen er avhengig av konserveringsegenskapene til syren som benyttes, men ligger ofte rundt pH 4,5 (Bækken & Bekkevold 1993). I tillegg til at ensilering gjør lagring mulig, økes biotilgjengeligheten av næringsstoffer (Amon et al. 2007; Vidotti et al. 2003). Fordi ensileringen gir en lav pH, hemmes også mikroorganismer nødvendig for den anaerobe nedbrytningen. Disse faktorene gjør fiskeensilasje vanskelig å behandle i en anaerob nedbrytningsprosess. I tillegg kan nedbrytingen av store kvantum av fett og proteiner føre til akkumulering av hhv. flyktige fettsyrer (VFA)/lange fettsyrekjeder (LCFA), og ammoniakk (Eiroa et al. 2012; Mshandete et al. 2004), noe som igjen kan hemme prosessen.

1.6 Biogassreaktor

En biogassreaktor er kort fortalt en tank for nedbrytning av organisk materiale, der all tilførsel av oksygen elimineres for å opprettholde et anaerobt miljø. Det finnes ulike modeller for oppbygging av reaktorer, men den grunnleggende konstruksjonen er i hovedsak den samme: Gassen som dannes i prosessen samles opp i tankens øverste del, mens tilførsel av nytt substrat pumpes inn på tankens side. Avhengig av substratets egenskaper, gjennomgår materialet ofte en forbehandling, som for eksempel innblanding med andre type substrater, tilgjengeliggjøring for nedbrytning, fortynning eller fortykkelse, og sanering for å fjerne patogene mikroorganismer (Schnürer & Jarvis 2009). Sammenligninger av mikrobiologisk diversitet i ulike bioreaktorer har tidligere avdekket at reaktorens utforming, prosesseringsforhold og substratsammensetning har stor betydning for strukturen til det mikrobielle samfunnet (Collins et al. 2003; Leclerc et al. 2004; McHugh et al. 2003).

1.6.1 Ulike reaktortyper

De fleste bioreaktorene som benyttes til biogassproduksjon rundt om i verden i dag, kan deles inn i ulike kategorier basert på reaktorens utforming.

1.6.1.1 Batch eller kontinuerlig reaktor

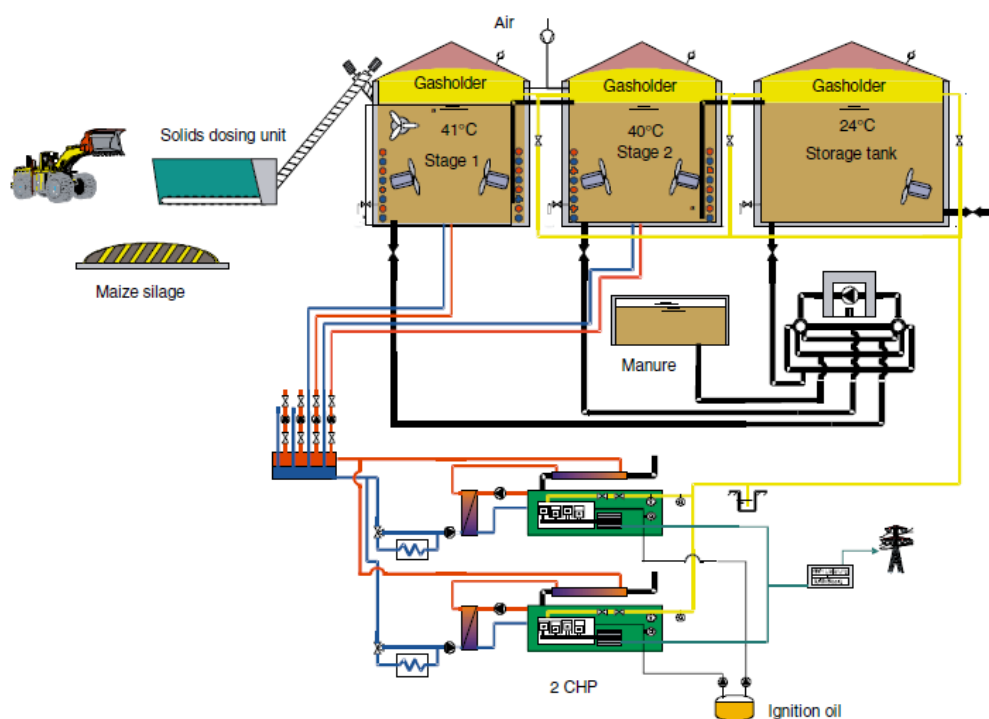
I en batchreaktor (også omtalt som porsjonsreaktor) blir all biomasse brutt ned, uten tilføring eller fjerning av materiale underveis i prosessen. Når nedbrytningen av det organiske materialet er fullført, fjernes bioresten før nytt substrat tilføres. I en slik uforstyrret nedbrytningsprosess får mikroorganismene lang tid til å bryte ned organiske materiale, uten å bli vasket ut av systemet. Metanproduksjonen vil ofte være størst i starten, for så å avta over tid ettersom energi- og karbonkildene brukes opp. I tillegg til at batchreaktorer ofte benyttes i forskning, er denne typen nedbrytningsmodell hyppig brukt i småskalaanlegg (Schnürer & Jarvis 2009).

I en kontinuerlig biogassreaktor med omrøring, pumpes nytt materiale inn i en kontinuerlig strøm, samtidig som ferdig nedbrutt materiale også pumpes ut. Dermed tilføres nytt råmateriale hele tiden, og metan produseres jevnt. Denne type reaktor kan benyttes for flytende substrater med et tørrstoffinnhold under 5 % (Schnürer & Jarvis 2009). Selv om en kontinuerlig biogassdrift kan medføre utvasking av organismer, vil mikrobefølget dra nytte av interaksjonene mellom ulike grupper og den uniforme substrattilgangen som skapes ved omrøring. Semikontinuerlige bioreaktorer referer til nedbrytningstanker der nytt råmateriale tilføres med jevne mellomrom, fra 1 til 8 ganger daglig (Schnürer & Jarvis 2009).

1.6.1.2 Nedbryting i ett eller flere trinn

Nedbrytingen i en kontinuerlig eller semikontinuerlig biogassreaktor kan foregå i ett eller to trinn. Ved nedbryting i ett trinn, skjer hele prosessen i en tank. Det vil si at hydrolyse, acidogenese (fermentering), acetogenese (anaerob oksidasjon) og metanogenese (metanproduksjon) skjer på samme sted, til samme tid. (Schnürer & Jarvis 2009). Dette er tradisjonelt sett den vanligste prosessløsningen på norske biogassanlegg.

Degradering i flere trinn er et passende alternativ når substratet er lett nedbrytbart og hydrolysen rask, og dersom man ønsker en optimalisering av forholdene til hver enkelt prosess (Blonskaja et al. 2003; Bouallagui et al. 2005; Liu et al. 2006). De fleste flertrinns-systemene separerer hydrolyse og acidogenesen fra acetogenesen og metanogenesen i to respektive tanker, en såkalt to-trinns reaktor (Ward et al. 2008).



Figur 1. 5. Sjematisk diagram av et typisk totrinns biogassanlegg. Designet kan variere mellom ulike anlegg. Figuren er i sin helhet hentet fra Weiland (2009).

Ved å separere hydrolysen og acidogenesen i en egen tank, unngår man at de mer sensitive metanogene arkene hemmes av et høyt innhold av flyktige fettsyrer, lav pH og andre stressfaktorer som kan oppstå, blant annet dersom biopolymerene brytes raskt ned i de første stegene. Metanogene har dessuten en vesentlig lavere vekstrate, og ved å separere prosessene unngår man en «overføring» av den metanogene delen av et reaktorsamfunn (Bouallagui et al.

2005; Weiland 2010). Det er også gjort suksessfulle studier med en ytterligere oppdeling av prosessen (Kim et al. 2000).

Selv om anlegg med to- eller flertrinns reaktorer er mer kostbare enn et-trinns reaktorer, tyder flere studier på at biogassutbyttet i en reaktor med separerte tanker er signifikant høyere sammenlignet med en et-trinns reaktor (Liu et al. 2006; Nielsen et al. 2004).

I tillegg til inndeling basert på design av reaktortanken, kategoriseres bioreaktorer også ut fra substratets tørrstoffinnhold. Våtreaktorer har en tørrstoffprosent på 16 % eller mindre, mens såkalt tørre reaktorer har en verdi mellom 22 % og 40 % (Ward et al. 2008).

1.6.2 pH og temperatur:

For at et biogassanlegg skal fungere mest mulig optimalt er driften avhengig av flere parametre. Temperatur og pH er faktorer med særlig stor påvirkningskraft. Basert på prosessens temperatur, kan biogassanlegg drives på to ulike måter. Mesofile biogassanlegg opererer med en temperatur på mellom 35-37 °C, mens termofile reaktorer benytter en vesentlig høyere temperatur (55-65 °C). Studier basert på sammenligning av reaktorer med ulike temperaturer har konkludert med at det er en generelt høyere mikrobiell diversitet ved degradering av organisk materiale under mesofile forhold, enn ved høyere temperaturer (Karakashev et al. 2005; Leven et al. 2007; Sekiguchi et al. 1998). Termofile biogassanlegg er ofte av større skala enn mesofile anlegg, og foretrekkes ved biodegradering av kommunalt avfall, der komplekse blandinger av ulike organiske materialer (storfegjødsel, avfall fra matindustri, slaktehus, husholdning, olje og fett o.l.) dominerer (Weiss et al. 2008). Sammenligninger har også vist at utbyttet av metangass er høyere i termofile biogassanlegg (Ahn & Forster 2000; Sanchez et al. 2000; Zabranska et al. 2000). I tillegg vil en høy temperatur mer effektivt ta livet av patogene organismer i avfallet. Men i forhold til en mesofil bioreaktor, kreves en vesentlig høyere energitilførsel for degradering under termofile forhold. I tillegg er det mikrobielle samfunnet i en mesofil reaktor mindre sensitiv mot ammoniumhemming, enn ved prosesser med høyere temperaturer (Sanchez et al. 2000).

De fleste metanogener har et pH optimum mellom 7.0 og 8.0. Dersom pH kommer under 6 vil vekstraten til metanogene arker hemmes. En pH over 8 vil ha samme utfall, fordi et svært basisk miljø kan være dødelig for mikroorganismene (Sandberg & Ahring 1992; Ward et al. 2008; Zinder 1993). Optimal pH for hydrolysen og acidogenesen ofte noe lavere (mellom 5,5 og 6,5) enn for metanogenesen, og bioreaktorer fungerer derfor best med en pH mellom 6,8 og 7,3 (Boone & Xun 1987; Ward et al. 2008; Zinder 1993).

Hemming av metanogenesen i biogassreaktorer kan forårsakes av tilstedeværelsen av giftige substanser, som ammoniakk, flyktige fettsyrer, tungmetaller, sulfid og petroleum-kjemikalier. I kommende seksjon fokuseres det på hemming av biogassprosesser som et resultat av høy ammoniumkonsentrasjon.

1.7 Biogasshemming ved høye ammoniumkonsentrasjoner

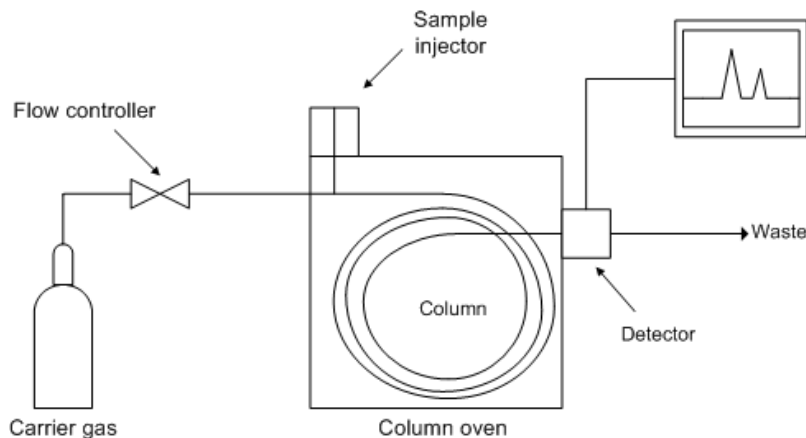
Som tidligere nevnt, vil proteinene i biomassen hydrolyseres til aminosyrer. Ved en videre nedbryting i fermenteringssteget, frigis aminosyrenes amin-gruppe ($-NH_2$) som ammoniakk (NH_3) eller ammonium (NH_4^+). Også nedbrytingen av urea vil frigi uorganiske nitrogenforbindelser. Hvilken av forbindelsene som dominerer i prosessen er avhengig av pH og temperaturforhold (Sanchez et al. 2000). Ved ammoniumhemming anses NH_3 som den aktive substansen (Kroeker et al. 1979), og tidligere forsøk tyder på at særlig de acetotrofe metanogene arkene er sensitive mot høye konsentrasjoner (Angelidaki & Ahring 1993; Hansen et al. 1998; Koster & Lettinga 1988). Fordi det antas at mesteparten av metanproduksjonen i biogassreaktorer utføres av acetotrofer, kan en økt ammoniumkonsentrasjon ha stor innvirkning på systemets biogassutbytte. Innenfor de acetotrofe gruppene, ser Methanosarcinaecea ser ut til å tåle miljøer med høyt innhold av ammoniakk og organiske syrer bedre enn Methanosaetacea (Karakashev et al. 2005).

Mekanismen bak ammoniumhemming er ikke fullstendig forstått, men man antar at aktiviteten av sentrale enzymer hemmes, eller at det intracellulære miljøet forstyrres ved diffusjon av ammoniakk over celleveggen (Kadam & Boone 1996; Sprott et al. 1984). Hvor mye fritt ammonium et metanogent samfunn kan tåle, er bestridt i litteraturen. Flere faktorer er avgjørende (pH, temperatur, inokulum), og den enkelte arts sensitivitet mot ammoniakk gjør at den tolererte mengden varierer (Angelidaki & Ahring 1993; Chen et al. 2008). Tidlige forsøk har vist en hemming i prosessen ved konsentrasjoner over 30,0 g N/l, mens andre studier viser både lavere og høyere toleranse (Chen et al. 2008). Angelidaki (1993) konkluderte i sine studier med at en konsentrasjon over 4 g N/l hemmer termofile bioreaktorer. Siden høy pH og temperatur øker mengden ammoniakk/ fritt ammonium, vil termofile bioreaktorer være mer sensitive for hemming enn mesofile samfunn (Angelidaki & Ahring 1993; Braun et al. 1981; Sanchez et al. 2000). Fordi en hemming av metanogenesen medfører ubalanse i forholdet mellom syredannede bakterier og metanproduserende arker, vil flyktige fettsyrer akkumulere. Høye konsentrasjoner av visse flyktige fettsyrer kan derfor benyttes som indikasjon på ammoniumhemming i biogassanlegg.

1.8 Metoder for identifisering og kvantifisering og av biogasskomponenter og flyktige fettsyrer

1.8.1 Gasskromatografi (GC)

Gasskromatografi kan benyttes når et volum av en gassprøve skal analyseres med hensyn på dens sammensetning. Metoden baseres på separering og deteksjon av ulike gasskomponenter ut fra komponentens molekylvekt, kokepunkt, lipofilisitet o.l. I enkelhet består en gasskromatograf av en injeksjonsport, en kolonne med inngang for bæregass, detektor og en registrator. Etter injisering fraktes prøven gjennom kolonnen med hjelp av en bæregass, ofte bestående av helium eller nitrogengass under trykk. Kolonnen inneholder en stasjonær fase med ulike kjemiske komponenter som prøven reagerer med. På grunn av ulikheter i kjemiske og fysiske egenskaper til de ulike komponentene i gassprøven, vil de vandre med ulik hastighet gjennom kolonnen. I tillegg har kolonnematerialet, temperatur og bæregassens hastighet innvirkning på prøvens vandring. På denne måten separeres prøvens komponenter fra hverandre. Ved kolonnes utløp, registreres gassmengde og tidspunkt den passerer detektoren på.



Figur 1. 6. En skjematisk fremstilling av en gasskromatograf. Gasskromatografen er oppbygd av en kolonne, en detektor og en registrator. Bæregassen bringer prøven gjennom kolonnen, og detektoren registrerer de ulike komponentene.

Ulike GC apparater benytter ulike deteksjonsprinsipper med varierende selektivitet for ulike gasser. *Thermal Conductivity Detector* (TCD) detekterer alle komponentene i prøven utenom bærerogassen, mens flammeioniseringsdetektor (FID), fotoionisasjonsdetektorer (PID), flammefotometridetektorer (FPD) og elektroninnfangingsdetektorer (ECD) kun detekterer bestemte substanser. For å kunne identifisere komponentene, må standarder med kjente konsentrasjoner for alle gasskomponentene legges inn i programvaren. Programvaren

sammenligner deretter komponentens retensjonstid (tiden det tar for hver komponent å vandre gjennom kolonnen) mellom den ukjente prøven og den kjente standarden, og på denne måten identifiserer og kvantifiserer komponenten.

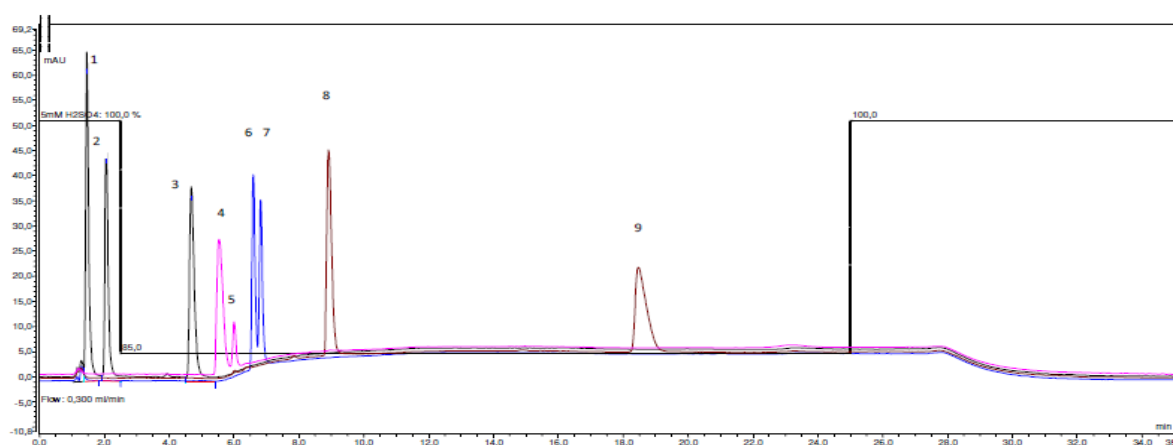
1.8.2 Væskekromatografi (HPLC)

HPLC (*high performance liquid chromatography*) fungerer etter samme hovedprinsipper som gaskromatografi, men prøvene analyseres i væskeform istedenfor i gassform. Systemet er utviklet for analyser av flyktige fettsyrer og produkter fra degradering av karbohydrater, som for eksempel furfural (et biprodukt av maursyre), hydroxymethylfurfural (HMF, fra degradering av noen sukkertyper, druesukker) og ketosyrer. Dette er organiske molekyler med ulik hydrofobisitet, og de separeres basert på reversert fase (RP) separering.

HPLC-systemet består av en injeksjonsport, en eller flere kolonner og detektorer, og en programvare for håndtering av data, samt instrumentkontroll. Prøven injiseres via injeksjonsporten og høyt trykk sørger for at væsken presses gjennom kolonnen. Et løsemiddel frakter væsken gjennom kolonnen med stasjonær fase.

Det finnes ulike typer HPLC-metoder, basert på den relative polariteten mellom løsemiddelet og den stasjonære fasen. Metanol (CH_3OH), svovelsyre (H_2SO_4) og acetonitril (CH_3CN) er eksempel på slike løsemiddel. Komponentene i væsken separeres etter samme prinsipp som ved GC, og passerer detektoren ved ulike tider. Mens hydrofile komponenter fraktes raskt gjennom kolonnen, vil hydrofobe forbindelser binde sterkere til kolonnens matrise.

Detektoren registrerer flyktige, organiske komponenter fra prøven, og et kromatogram konstrueres for sammenligning med kjente standarder (Figur 1. 7) (Agger 2011).



Figur 1. 7. Kromatografisk profil. Toppene identifiseres som følgende flyktige fettsyrer: 1) metansyre, 2) etansyre, 3) propansyre, 4 og 5) Levulinic syre 6) HMF 7) Furfural 8) butansyre og 9) valerinsyre. Kromatogrammet er hentet fra manual for HPLC analyse, av Agger (2011).

1.9 Metoder for identifisering av mikrobielle grupper og kartlegging av diversiteten

1.9.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) gjør det mulig å utføre molekylære studier av ekstrahert DNA som opprinnelig ville vært tilstede i svært små mengder, eller å studere spesifikke sekvenser og gener fra større molekyler (Mullis et al. 1986).

PCR er en enzymatisk reaksjon der RNA og DNA amplifiseres ved hjelp av en varmestabil polymerase og komplementære primere til flankerende DNA sekvenser (Saiki et al. 1988). De spesifikke primerne er korte oligonukleotider, som hybridiserer til den komplementære sekvensen på templatet/ønsket DNA sekvens. I tillegg tilsettes deoxynucleotidene dATP, dCTP, dGTP og dTT, slik at polymerasen kan syntetisere en ny DNA sekvens (Mullis et al. 1986).

Reaksjonen styres av ulike temperaturer som aktiverer eller inaktiverer prosessene. Amplifiseringen består av tre gjentagende steg, i tillegg til initiell denaturering der temperaturen stiger til optimal aktiveringstemperatur for polymerasen, samt et avsluttende steg som senker temperaturen så lavt at polymerasen inaktiveres. I syklusens første steg økes temperaturen slik at hydrogenbindingene mellom nukleotidene i DNA-spiralen brytes, og DNA denatureres. Dette gjør målsekvensen tilgjengelig for primere. I hybridiseringssteget senkes temperaturen til 40-70 °C (avhengig av primerens smeltepunkt) og primere binder til de komplementære basene på DNA sekvensene. Deretter syntetiserer polymerasen en ny DNA-tråd komplementær til den gamle, ved å inkorporere nukleotider til den ledige 3' OH gruppen på hybridisert primer. Denaturering, primer hybridisering og elongering repeteres, og for hver runde doubles antall DNA tråder. Resultatet er en eksponentiell amplifisering av ønsket DNA-sekvens.

1.9.2 Kvantitativ PCR (qPCR)

Real-time kvantitativ PCR er en svært sensitiv metode for kvantifisering og deteksjon av mikrobielle samfunn. Hovedprinsippene er de samme som for tradisjonell PCR, der hver syklus dobler det teoretiske antallet DNA-tråder. I qPCR reaksjoner blir amplifisert DNA fortløpende detektert underveis i reaksjonen, ved at prosessen genererer et målbart signal (Higuchi et al. 1992). I dag er alle deteksjonssystemer basert på fluorescens teknologi, der mengden DNA-kopier av den spesifikke sekvensen korrelerer med kinetikken av fluorescens signalet (Kubista et al. 2006).

C_T (threshold cycle) verdien definerer antall PCR sykluser som trengs for at signalintensiteten skal bli signifikant høyere enn bakgrunnsnivået (Kubista et al. 2006). Denne verdien er proporsjonal med antall kopier av målsekvensen i startreaksjonen; til lavere C_T verdi, dess høyere er startkonsentrasjonen av rDNA. Kvantiteten baseres på to ulike tilnæringer: Absolutt kvantifisering med normalisering til en standardkurve, eller en relativ kvantifisering der en intern referanse benyttes til normalisering (Heid et al. 1996). På bakgrunn av dette kan startkonsentrasjoner av ønsket mikroorganisme/gen i prøver beregnes.

1.9.3 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

In Situ Hybridization (ISH) ble for første gang beskrevet i 1969, med hensikt å eksaminere nukleinsyresekvenser med radioaktive prober, uten å endre cellens morfologi (Pardue & Gall 1969). Siden den gang er denne metoden blitt modifisert flere ganger, og DeLong et al. (1989) var de første til å benytte oligonukleotider med fluorescerende merker for deteksjon av mikrobiologiske celler. I dag er *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) et viktig verktøy for identifisering, kvantifisering og lokalisering av enkeltceller i fylogenetiske og økologiske studier innen medisin og miljømikrobiologi.

FISH baserer seg på hybridisering av en syntetisk oligonukleotid-probe til komplementære regioner på ribosomet eller til spesifikke gener (Bottari et al. 2006). Probene er designet ut fra databaser med rRNA sekvenser for ulike mikroorganismer, og sekvensene ofte korte (15 og 30 bp) for de skal kunne penetrere cellemembranen/veggen. De er i tillegg modifisert med et fluorescerende merke, slik at de kan detekteres via et epifluorescense mikroskop eller flowcytometri (Amann et al. 1995; Wagner et al. 2003). Merkingen kan skje på flere måter, men direkte fluorescens merking i 5'- eller 3' ende er vanligst. Ved direkte merking forlenges proben med en eller flere dNTP, modifisert med et fluorokrom i sidegruppen (Bottari et al. 2006). Bruk av indirekte probemerking inkluderer reporter molekyler, enzymatisk signal amplifisering og bruk av polyribonucleotid prober merket med flere fluorokrom-molekyler (Moter & Gobel 2000). De senere årene har det kommet flere, og mer stabile fluorokromer. Noen eksempler på vanlige fluorokromer er TAMRA, Rodamine, Dapi og carbocyanine farger som Cy3 og Cy 5 (Amann et al. 2001; Moter & Gobel 2000). Ved å kombinere prober og fluorokromer med ulik eksitasjons- og emisjonsmaksimum, kan to eller flere ulike mikroorganismer detekteres fra samme prøve. *In situ* studier av mikroorganismer tillater eksaminering av celler som normalt ikke lar seg kultivere. Dette gir et mer korrekt bilde av sammensetningen i mikrobefundet siden man antar et bare en liten andel mikroorganismer

lar seg dyrke *in vitro*. Metoden er sensitiv og rask, og gjør det mulig å studere enkeltceller i deres opprinnelige miljø.

1.9.4 DNA-sekvensering

DNA-sekvensering innebærer bestemmelse av baserekkefølgen i DNA. På bakgrunn av denne rekkefølgen kan organismer sammenlignes og identifiseres, nye gener eller mutasjoner kartlegges og kunnskap om både vårt eget, og andre organismers molekylære programmering oppdateres (Shendure et al. 2004).

1.9.4.1 Sanger- sekvensering

Sanger-sekvensering er en DNA-polymerase avhengig sekvenseringsstrategi basert på elektroforetisk separering av deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) fragmenter.

Polymeraseaktiviteten katalyserer en syntese av nytt DNA templat (komplementær til aktuell sekvens) ved fosfodiesterbindinger av dNTP til den voksende 3'-enden. I tillegg til dNTP, tilsettes dideoxyribonucleotide triphosphate (ddNTP), der den frie OH-gruppen i 3'-ende er erstattet av et hydrogenatom. Ved en tilfeldig binding av ddNTP istedenfor dNTP vil reaksjonen dermed termineres. Ratio av dNTP/ddNTP bestemmer hyppigheten av terminering, og dermed også lengden av DNA-fragmenter. En balansert konkurranse mellom dNTP og ddNTP i reaksjonen gir dermed fragmenter av ulik størrelse (Sanger et al. 1977).

Den vanligste metoden for deteksjon av sekvensen er ved å merke hver ddNTP med en spesifikk fluorokrom som eksiterer ved passering av en laser i sekvenseringsanalysatoren. Fragmentene separeres ved *high-resolution gelelektroforese*, og fluorescenssignalet detekteres i fire ulike farger, etter basens identitet (Metzker 2005). Fordi fragmentene separeres med hensyn på størrelse, bestemmes også posisjonen til basene. På denne måten vil rekkefølgen av farger avsløre sekvensens baserekkefølge. I arbeidet med denne oppgaven ble en blandet Sanger-sekvensering benyttet.

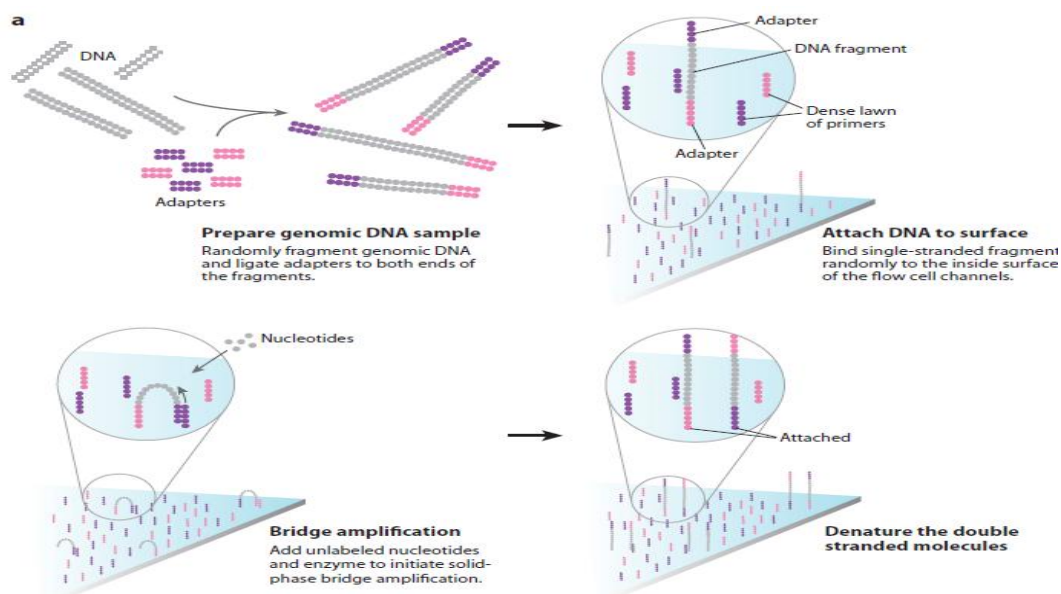
1.9.4.2 High Throughput-sekvensering

Dybdesekvenseringsmetoder med *high throughput*-teknologi ble utviklet i kjølevannet av *Human Genomic Project* (HGP), for å møte kravet om rimeligere og mer effektiv DNA sekvensering sammenlignet med fargerterminatorer (Metzker 2005).

I *high throughput*-sekvensering utføres sekvenseringsreaksjonene i paralleller, og resultatet er et større antall sekvenser, fra flere tusen til millioner. På denne måten kan analyser av hele genom, karakterisering av økologisk diversitet og identifisering av ukjente agenter og mutanter utføres i et enkelt eksperiment (Mardis 2008; Reis-Filho 2009). I tillegg til at

parallele reaksjoner gir et økt antall sekvenser, er de enkelte sekvensene kortere enn leselengder fra Sanger-sekvensering (Dohm et al. 2008). *High throughput* sekvensering gir mer dybde i form av multiple leselengder av samme region, og er økonomisk gunstigere med hensyn på nøyaktighet, enn tradisjonelle sekvenseringsmetoder. De knappe ti siste årene har utviklingen av sekvenseringsstrategier skutt fart, og i dag finnes det flere tilgjengelige plattformer for dybdesekvensering. De mest brukte er 454 sekvensering/Roche, basert pyrosekvenseringsteknologi, SOLiD™ system/ Applied Biosystem og Illumina genome analyzer /Solex (Mardis 2008). I arbeidet med denne oppgaven ble sekvensering på Illumina plattform benyttet, for karakterisering av diversiteten i bioreaktore med storfegjødning og fiskeensilasje.

Illumina-sekvensering er en 2. generasjons sekvensering som benytter seg av *single nucleotide addition* (SNA). Denne sekvenseringsstrategien er basert på reversibel fargerterminering, som detekterer enkeltbaser etterhvert som de inkorporeres til en voksende DNA tråd. DNA molekyler binder via adaptersekvenser til oligonukleotider på overflaten til en «flowcell». Broamplifisering av multiple DNA kopier danner kolonier på rundt 1 million sekvenser, der hver koloni representerer den opprinnelige DNA sekvensen (Mardis 2008). Fire ulike reversible terminatorbaser tilsettes, hver modifisert med et fluorescerende molekyl som blokkerer 3'-OH gruppen. Dermed kan DNA sekvensen bare forlenges med en nukleotid om gangen. Fordi alle fire dNTP molekylene er tilstede i reaksjonen, oppstår en naturlig konkurranse mellom basene, og nukleotiden komplementær til målsekvensen inkorporeres.



Figur 1. 8. Illumina «flowcell». Genomiske DNA hybridiserer til oligonucleotider via adaptere på DNA fragmentet. Broamplifisering med enzym og umerket nukleotider resulterer i kolonidannelse, der hver enkelt koloni representerer et opprinnelig DNA molekyl. Figuren er hentet fra Mardis (2008)

En illuminerende kilde fører til at fluorokromet på det inkorporerte nukleotidet fluorescerer i en farge som reflekterer basens identitet. På grunn av kolonidannelsen vil dette signalet være sterkt nok til å fanges opp av et kamera. Etter deteksjon av fluorescenssignalet, blir fargen kjemisk fjernet og syklusen gjentas med inkorporering av den neste reversterminerende basen (Mardis 2008). Signalene arrangeres i inkorporert rekkefølge, der fargekodene avdekker DNA molekylets basesekvens.

1.10 Oppgavens målsetning:

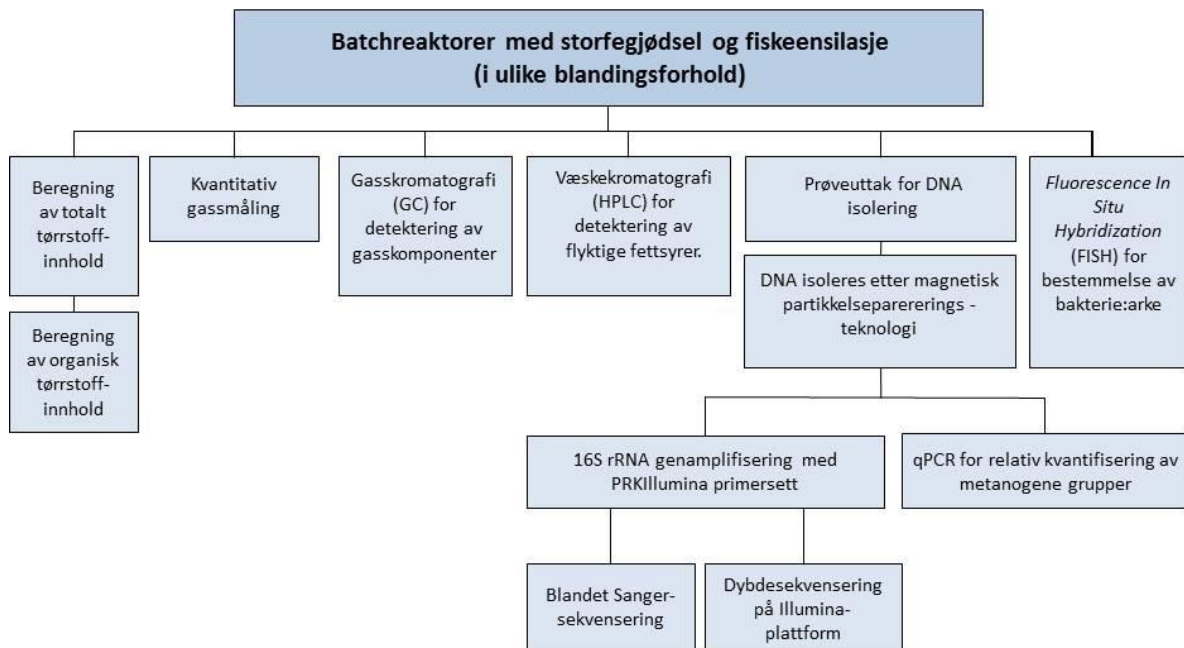
Hovedmålsettingen med dette arbeidet var å studere sammensetning og utvikling av mikroorganismer, og dannelse av biogass i reaktorer med storfegjødsel i kombinasjon med ensilert fiskeavfall. Fiskeavfall har stort metanpotensiale, men er ofte forbundet med ustabilitet på grunn av store mengder ammoniakk og flyktige fettsyrer. Det ble derfor benyttet ulike ratioer av storfegjødsel:fiskeensilasje i et forsøk på forbedring av metanproduksjonen.

Spesifikke mål med arbeidet:

- Beregning av mengde gass produsert per enhet organisk materiale.
- Kvalitativ og kvantitativ analysering av komponenter i biogass, med særlig hensyn på metan.
- Avdekke tilstedeværelsen av flyktige fettsyrer i biomassen.
- Karakterisere den mikrobielle sammensetningen og utviklingen i reaktorene over en gitt tidsperiode.
- Karakterisere den relative tilstedeværelsen av to spesifikke metanogene grupper (Methanomicrobiales og Methanosarcinaaceae).
- Visualisere, lokalisere og bestemme forholdet mellom bakterier og arker.

2. Materialer og metoder

I arbeidet med denne oppgaven ble flere ulike metoder benyttet for å kartlegge mikrobiologisk tilstedeværelse og suksisjon i batchreaktorer med fiskeensilasje og storfe gjødsel. I tillegg ble det utført kvalitative og kvantitative analyser av biomassen og den produserte biogassen. En skjematisk fremstilling av oppgavens utførelse er vist i Figur 2. 1.



Figur 2. 1 En skjematisk fremstilling som viser stegene i gjennomføringen av arbeidet knyttet til denne oppgaven. Batchreaktorer med ulik ratio av storfe gjødsel og fiskeensilasje er utgangspunktet for alle analysene som foretas, Kjemiske og så vel som molekylærbiologiske.

Måling av mengde gass produsert, og kromatografisk analyse av gassen ble foretatt annenhver dag i hovedforsøksperioden (30 dager), og deretter med jevne mellomrom/ved behov resten av forsøksperioden (til dag 101). Analyse for deteksjon av flyktige fettsyrer ble utført på prøver fra dag 0, dag 59 og dag 101 (samtlige prøver ble lagret ved -20°C før analysering). pH ble målt på det samme materiale. I hovedforsøksperioden ble prøveuttak for DNA-isolering gjennomført annenhver dag, mens uttak og forberedelse av FISH-preparater ble utført hver 7-9. dag.

En fullstendig oversikt over alle kjemikalier, materialer og laboratorieutstyr benyttet i dette arbeidet er gitt som vedlegg, jf. Vedlegg B. Oppskrifter på alle buffere og løsninger er også gitt som vedlegg, jf. Vedlegg G.

2.1 Forbehandling og generell håndtering av batchreaktorene

2.1.1 Valg av ratio for storfegjødsel:fiskeensilasje

Husdyrgjødsel og fiskeensilasje fra biogassanlegget på Åna kretsfengsel (hentet i oktober 2010 og lagret ved 4 °C frem til bruk) ble benyttet som substrat i batchreaktorene.

Innledningsvis ble batchreaktorer med ulike blandingsforhold av husdyrgjødsel og fiskeensilasje satt opp, og på bakgrunn av gassproduksjonen i disse reaktorene ble fire ulike ratioer av storfegjødsel:fiskeensilasje valgt (jf. blandingsforholdene i tabell 2. 1). I tillegg til storfegjødsel og fiskeensilasje ble 16 % inokulum tilsatt i hver reaktor. Inokulumet er biorest fra en reaktor med husdyrgjødsel og fiskeensilasje fra SUS scrofa (BioForsk). Dette inneholder lett tilgjengelige næringsstoffer og organisk materiale, i tillegg til mikroorganismer fra tidligere prosessering.

Tabell 2. 1 For gjennomføring av forsøket ble følgende volum (ml) av substrat (storfegjødsel og fiskeensilasje) og inokulum blandet:

Serie	Inokulum	Substrat	
		Storfegjødsel	Fiskeensilasje
1	10 ml	20 ml	30 ml
2	10 ml	30 ml	20 ml
3	10 ml	40 ml	10 ml
4	10 ml	50 ml	0 ml

De fire ulike batchreaktorene omtales heretter som serie 1, serie 2, serie 3 og serie 4, jf. tabell 2. 1. De respektive seriene inneholdt følgende ratio av hhv. storfegjødsel (SG) og fiskeensilasje (FE); 40:60 %, 60:40 %, 80:20 % og 100:0 % (av 100 % substrat, beregnet på bakgrunn av volum i ml.). Av hver blanding ble 8 parallelle reaktorer benyttet.

2.1.2 Homogenisering av substratene

Homogenisering av storfegjødsel var nødvendig for gjennomføringen av prøveuttak, da dette substratet inneholdt større partikler som fôrrester og lignende. Homogeniseringen ble foretatt i en Waring-blender (Waring Products, USA). Det var ikke nødvendig å homogenisere det ensilerte fiskeavfallet. Avslutningsvis ble alle fraksjonene blandet godt sammen, slik at graden av homogenisering var den samme for hele massen, før substratet ble fordelt utover i serumsflasker.

2.1.3 Serumsflasker ble benyttet som batchreaktorer

Serumsflasker (120 ml) ble benyttet for simulering av reelle biogassreaktorer (Miller & Wolin 1974). Til hver flaske ble totalt 60 ml reaktormateriale tilsatt (i blandingsforhold som beskrevet i tabell 2. 1) og serumsflaskene ble lukket med en septa av butylgummi og aluminiumforsegling. Septaens egenskaper gjør at gass kan tas ut med kanyle (med sideport) gjennom membranen gjentatte ganger uten at luft lekker inn, eller biogass ut. Aluminiumsforsegling sørger for at flaskene tåler et overtrykk ved gassproduksjon. Serumsflaskene er enklere å håndtere, og krever mindre plass enn reelle prøverektorer. Alle serumsflaskene ble inkubert i 37 °C med moderat risting.



Figur 2. 2. Serumsflasker ble benyttet som batchreaktorer. Til venstre; 120 ml serumsflasker med 60 ml reaktormateriale. Til høyre; batchreaktorene ble inkubert i varmeskap (37 °C) med moderat risting. Foto: Live Heldal Hagen.

2.1.4 Åpning av batchfermentorene for uttak av prøvematerialer

Tre av parallellene i hver serie ble åpnet annenhver dag for uttak av prøvemateriale til molekylærbiologiske analyser. Konverteringen av biomasse til biogass er en strengt anaerob prosess, og åpning og lukking av flaskene bør skje uten at det anaerobe miljøet i fermentorene forstyrres. For å redusere tilførselen av oksygen ble åpningene utført med så hurtig åpningstid som mulig, og flaskene ble lukket med ny septa og aluminiumsforsegling øyeblikkelig etter uttak av materiale. Undertrykk i flaskene ble fjernet med gasstett sprøyte (for måling av produsert gass) før åpning. På grunn av lukt, ble prøveuttak utført i avtrekkskap. Etter åpning og lukking ble flaskene stående mest mulig i ro for å unngå omrøring av det øverste sjiktet, da noe oksygen ville være tilstede her. For å evakuere oksygen i batchreaktorene, ble flaskene skylt med nitrogen gass (99,99 %). Nitrogen gass er en ikke-reaktiv gass, og vil ikke påvirke det mikrobielle samfunnet i reaktormaterialet. En kanyle festet via en slange på gasstanken ble ført gjennom gummimembranen, og trykk ledet nitrogen gass ned i flasken. En åpen kanyle gjennom membranen ledet gass ut igjen for å unngå et overtrykk over serumsflaskens kapasitet, samt for å evakuere fortrent oksygen gass.

2.2 Beregning av totalt tørrstoff (TS) og organisk tørrstoff (VS)

Totalt tørrstoff (TS) er mengden faste stoffer gjenværende i prøven etter oppvarming til 105 °C, til konstant vekt (ca. 24 timer). Tørrvekten av materialet inkl. aluminiumsskåler ble veid og vekten notert. På grunnlag av disse verdiene ble andel tørrstoff beregnet:

$$\% TS = \frac{Tørrvekt}{Våtvekt} \times 100$$

Organisk tørrstoff (VS) defineres som mengden av flyktige, organiske stoffer som forsvinner etter forbrenning ved 550 °C (i minst 8 timer) av total tørrstoff (TS). Aske ble veid og glødetap bestemt, og på grunnlag av disse verdiene ble andel organisk materiale beregnet:

$$\% VS = \frac{Glødetap}{Tørrvekt} \times 100$$

Fordi prøvemateriale trekker til seg fuktighet fra omgivelsene, var det viktig at veiing ble utført umiddelbart etter tørking og forbrenning.

2.3 Måling av akkumulert gassvolum og beregning av spesifikk gassproduksjon

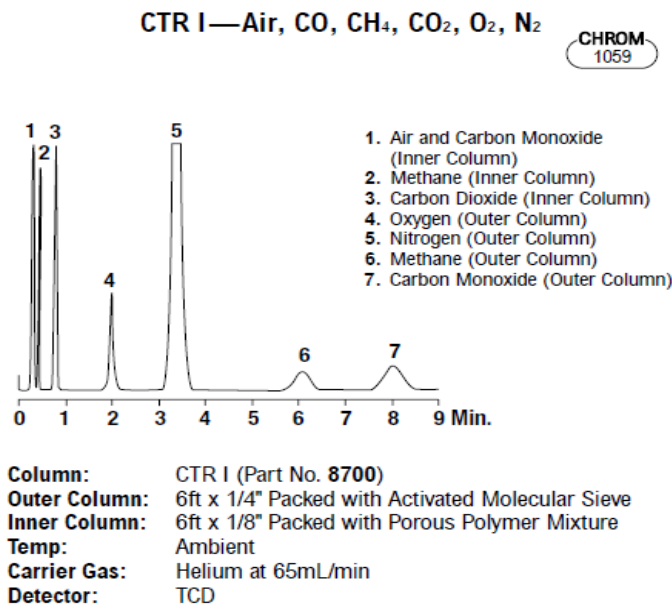
Gassproduksjon i batchreaktorene ble målt ved gassuttak med en 50 ml glassprøyte (Condence Science, Inc.). Det eventuelle overtrykket i flaskene presset stempelet i glassprøyten opp, og mengde gass (ml) ble avlest og notert. Hensikten var å bestemme hvor mye biogass som ble produsert i batchkulturene, for beregning av spesifikk gassproduksjon. Den organiske andelen av tørrstoffet som er tilgjengelig for mikrobiell nedbrytning (jf. VS), spiller en viktig rolle for biogasspotensialet. Spesifikk gassproduksjon beregnes derfor ut fra mengden organisk tørrstoff i hver prøve:

$$\text{Spesifikk gassproduksjon} = \frac{\text{Gass produsert (ml)}}{\text{VS tilsatt (g)}}$$

2.4 Kromatografiske metoder for analysering av gass og flyktige forbindelser

2.4.1 Gasskromatografi (GC)

Sammensetningen av biogasskomponenter ble analysert i en gasskromatograf (PerkinElmer), for å beregne metan- og karbondioksidutbyttet i batchreaktorene. Gasskromatograf-instrumentet som ble benyttet i dette forsøket har CTR I kolonne (Alltech Associates Inc.) og er ideell for separering av oksygen (O₂), nitrogen (N₂), metan (CH₄), karbonmonoksid (CO) og karbondioksid (CO₂).



Figur 2.3. Kromatografisk profil (Alltech® CTR Concentric Packed Columns). Gasskomponentene i prøven separeres i kolonnen, detekteres ved kolonnens utløp. Komponentens retensjonstid sammenlignes med kjente standarder, og arealet under hver topp gjenspeiler komponentens kvantitet. På denne måten kan ulike gasser i en prøve indentifiseres og kvantifiseres.

Kolonnen inneholder to ulike pakninger som skilles fra hverandre med ulik innvendig diameter og ulike separeringsegenskaper. Porapack (pakket med en blanding av porøse polymerere) kommer først, og separerer først luft og karbonmonoksid, deretter metan, og til slutt karbondioksid. Molekyl-sil separerer (hhv.) oksygen, nitrogen, metan og karbonmonoksid. For deteksjon av komponentene ble to ulike sensorer benyttet, TCD og FID. Sistnevnte ble benyttet for å detektere små mengder metan. For TCD sensor ble helium (He, klasse 5) benyttet som bæregass, mens O₂ og H₂ ble brukt ved FID. Alle analysene ble utført med et trykk på bæregassen på 20,0 psi. 0,50 ml gass ble samlet fra hver batchreaktor med en gass tett glassprøyte med sideportkanyle (VIKI), og injisert via injiseringsporten på gasskromatografen. Temperaturer i injeksjonsporten og kolonnen var på hhv. 200 °C og 60 °C, mens deteksjonstemperaturen var 250 °C. Analyseringen ble startet manuelt og

resultatene ble tilgjengelige for prosessering i programmet TotalChrom (PerkinElmer). For en prosentvis bergening av gassenes konsentrasjon, ble en blanding av følgende standardgasser benyttet (sammensetning i mol %); metan (60,6 %), CO₂ (34,5 %) og nitrogen (resterende) (Yara).

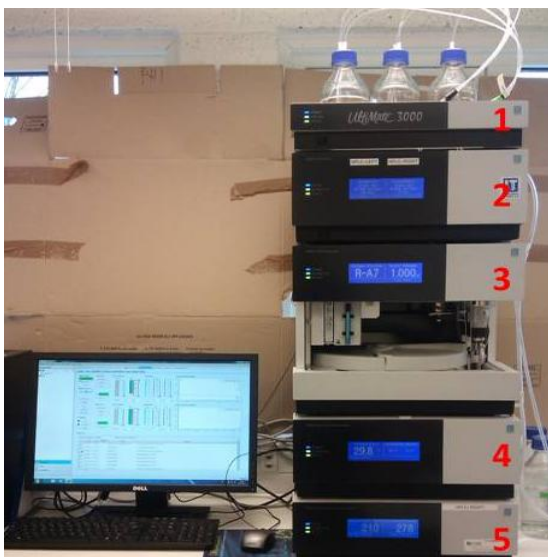
Av mengde CH₄ som måles i denne analysen, ble følgende utregning benyttet for beregning av spesifikk metanproduksjon (de samme formelene gjelder for beregning av spesifikk karbondioksidproduksjon):

$$\text{Akkumulert metan} = \frac{\text{Gass produsert (ml)} * \text{CH}_4 \text{ (\%)}}{100}$$

$$\text{Spesifikk metanproduksjon} = \frac{\text{Akkumulert metan (ml)}}{\text{VS tilsatt (g)}}$$

2.4.2 Væskekromatografi (HPLC)

HPLC (*high performance liquid chromatography*) ble benyttet for å detektere et utvalg flyktige fettsyrer og karbohydrater i batchreaktorene. I tillegg til startkultur (0 dager), midtkultur (59 dager) og sluttkultur (101 dager), ble også de enkelte substratene og inokulum analysert med instrumentet Dionex Ultimate 3000 kromatografisk system med UV-VIS - basert (ultraviolett-visibility light) detektor.



Figur 2. 4. Dionex Ultimate 3000 ble benyttet for å detektere et utvalg flyktige fettsyrer. Ultimate 3000 systemet består av 5 moduler: 1) Løsningsrack, 2) Pumper, 3) Autosampler, 4) Kolonne og 5) UV detektor. Foto: Live Heldal Hagen

De ulike komponentene har ulike bølgelengdeoptimum, og metoden inkluderte derfor deteksjon ved to ulike bølgelengder; 210 nm (organiske syrer) og 278 nm (furfural og HMF). Kolonnen som ble benyttet, Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies), var 150 x 2,1 mm (3,5 µm partikler) med en 12,5 x 2,1 mm (5 µm partikler) beskyttelseskolonne. Pumpene opererte med en infusjonshastighet i kolonnene på mellom 0,200 ml/min, og med maksimalt trykk på 400 bar. Kolonnetemperaturen var 40 °C og 100 % metanol og 2,5 mM H₂SO₄ ble brukt som løsemiddel.

For å unngå protonering av komponentene, er det viktig at pH i den mobile fasen er lavere enn pK_a-verdien til komponenten med lavest pK_a. Prøvene ble derfor forsuret med 75 % H₂SO₄, til en pH lavere enn 2,5. En pH-indikatorstrips ble benyttet for å konstatere en lav pH. For stabilitet under lagring ble prøvene oppbevart på -20 °C, og tinet sakte i kjølerom (4 °C) før analysering. Prøvene ble spunnet ned på maksimal hastighet i 10 min før forsuring, for å få et partikkelfritt materiale til analysering (noen av prøvene trengte lengre sentrifugering). Etter forsuringen ble prøvene inkubert på benk i noen minutter. Det dannes CO₂, og for å hindre overtrykk stod prøvene uten lokk. Reaksjoner ved tilsetningen av H₂SO₄ førte til fargeforandring og utfelling, og prøven ble derfor sentrifugert på nytt. Standarder av metansyre (CH₂O₂), eddiksyre (CH₃COOH), propansyre (C₃H₆O₂), butansyre (C₄H₈O₂) og valerinsyre (C₅H₁₀O₂) ble laget i konsentrasjonene 5 mM, 50 mM, 100 mM og 500 mM. Injiseringsvolumet ble satt til 1 µl per prøve (ved dette volumet vil flyktige fettsyrer med en konsentrasjon på minst 1 mM detekteres).

Dataprogrammet Chromeleon™ 7 (versjon 7.1.1.1127, Dionex) benyttes for kontrollering og kommandering av instrumentet, samt datahåndtering.

2.5 Isolering av genomisk DNA

Tre ulike prosedyrer for isolering av DNA ble på forhånd testet for å finne ut hvilken metode som gav størst utbytte av genomisk DNA. Av disse er to kommersielle kit, mens en tredje prosedyreprotokoll er utviklet av Genetic Analysis (GA):

1. FastDNA SPIN kit for Soil (Qbiogene) er en kolonnebasert metode, produsert og designet for ekstrahering av genomisk DNA fra jord.
2. MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion) er et silicabasert metode, basert på magnetisk partikkelseparering.

3. Stool Bacteria DNA extraction (SPO2-001) (Genetic Analysis AS) baserer seg på SiMAG/MG- DNA (paramagnetiske silicapartikler), som binder spesifikt til nukleinsyrer.

For å detektere forurensinger og eventuelle feil som har oppstått under renseprosessen, ble en negativ (sterilfiltrert MQ-vann) og en positiv (overnattkultur av *Escherichia coli*) kontrollprøve inkludert til alle tre isoleringsprosedyrene. Protokoller for de tre DNA-isoleringsmetodene er gitt i sin helhet som vedlegg, jf. Vedlegg D.2. På bakgrunn av resultatene ble MagMAXTM Total Nucleic Isolation Kit valgt for videre isolering av genomisk DNA.

I hovedforsøket ble 0,5 ml prøvematerialet tatt ut fra hver av de tre første batchreaktorene per serie (totalt 192 prøver). Materialet ble sentrifugert i 7 min på maksimal hastighet for å konsentrere cellene. Cellene ble lysert i FastPrep 24 instrument (MP), og etter celleknusing ble resten av ekstraheringsprosessen utført med duplikate prøver. 0,17 ng av et syntetisk templat med kjent konsentrasjon ble tilsatt en av duplikatene som intern kontroll (det syntetiske templatet ble preparert av Zhian Salehian, UMB).

Prøver og reagenser prepareres i henhold til protokoll for MagMAX DNA-isolering. Til ekstrahering ble et helautomatisk system, KingFisher Flex (Thermo Scientific) benyttet. KingFisher Flex er basert på invers magnetisk partikkelseparering, en teknologi der magnetiske kuler flyttes fra plate til plate med spesifikke reagenser (Thermo Scientific 2010) Nukleinsyrer bundet til magnetiske kuler blir dermed automatisk overført mellom de ulike løsningene, f.eks. vaskeløsninger og elueringsbuffer. En automatisert DNA ekstraktor vil isolere nukleinsyrer med høy renhet, og er tids- og arbeidsbesparende i forhold til manuell ekstrahering (Kessler et al. 2001). 20 µl kulemiks etter oppskrift fra MagMAX protokoll ble tilsatt hver prøve manuelt. DNA isoleringsprosedyren ble lagt inn i programvaren og valgt gjennom instrumentets kontrollpanel.

2.6 Kvantifisering og kvalifisering av DNA

2.6.1 Agarosegel-elektroforese

Elektroforese defineres som bevegelsen av ioner og ladde makromolekyler gjennom et medium. Vandringen skyldes elektrisk spenning, og i det elektriske feltet vil negativt ladde molekyler vandre mot den positive polen. Fordi DNA-molekylets fosfatgruppe er negativt ladet ved nøytral pH, vil DNA fragmenter vandre mot anoden. Polymerer i gelmatrisen

separerer makromolekyler basert på ladning, størrelse og struktur. Små, sterkt negativt ladde molekyler vil vandre raskere gjennom matrisen, og dermed vandre lengre enn større molekyler. Agarose er en av de vanligste medium-matrisene for separering av nukleinsyremolekyler av størrelsesorden 0,2–10 kb. I arbeidet med denne oppgaven ble gelelektroforese utført med en agarosekonsentrasjon på 1 % og TAE buffer for visualisering av genomisk DNA, PCR-produkter osv. For visualisering av nukleinsyrene tilsettes ethidium bromid til gelen. Ethidium bromid er en fluorescerende farge som fester seg mellom basene på DNA molekylet, og avgir lys ved UV-bestråling på 590 nm. Loading buffer med glyserol og fargestoff tilsettes prøvene før amplifisering på gel, for å forhindre at prøvene flyter opp av brønnene. Molekylets størrelse og konsentrasjon estimeres basert på sammenligninger med en størrelsesstandard. I denne oppgaven ble 1Kb DNA ladder (New England BioLabs) benyttet. For visualisering av DNA med interkalert ethidium bromid ble Universal Hood II (BioRad) gel-dokumentasjonssystem benyttet. For fullstendig protokoll for støpning av 1 % agarosegel, samt illustrasjon av 1 Kb DNA ladder henvises det til Vedlegg D.1.

2.6.2 OD-måling

Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) ble benyttet for å se på mengde genomisk DNA, samt renheten av prøvene (genomisk DNA og PCR-produkt). Dette instrumentet måler prøvens optiske tetthet, ved at overflatespenninger holder væsken på plass mellom to optiske fibre. Lys passerer gjennom toppfiberet, og ned gjennom prøven før det detekteres av et innebyggt spektrometer. Etter få sekunder avleses målingene (ND 1000 v.3.3.1). Nukleinsyrer absorberer lys ved bølglengden 260 nm, mens proteiner absorberer ved 280 nm. Optimal verdi for 260/280 er 1,8, og en ratio under 1,8 kan tyde på proteinkontaminering. En overestimering av DNA i prøven kan forekomme, fordi alle molekylene som absorberer lys ved 260 nm vil gi utslag (eks RNA, frie nukleotider, proteiner m.m.). 260/230 ratioen gir en indikasjon på om løsningen inneholder høye saltkonsentrasjoner. 260/230 gir ofte noe høyere verdi (mellom 1,8 og 2,0) enn 260/280 ratio.

Instrumentet ble initiert med nukleasefritt dH₂O, og blanket ut med elueringsbufferen som ble benyttet for DNA eluering. 1-2 µl DNA løsning ble applisert på instrumentets pidestall, og måling startet fra PC. Dersom prøven har stått lagret en stund kan DNA felles ut eller bli krystallisert, og prøven ble derfor ristet opp før applisering.

2.6.3 Fluorescerende agent

Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen) reagens er en sensitiv fluoriserende nukleotidfarge for kvantifisering av dsDNA. Når PicoGreen binder DNA, økes fluorescensen flere tusen

ganger, proporsjonalt med mengde DNA til stede. PicoGreen kan detektere så lite som 25 pg/mL dsDNA med et standard spektrofluorometer, og 250 pg/mL dsDNA med fluorescens mikroplateleser. Spektralområdet til Quant-iT PicoGreen dsDNA reagens bundet til nukleinsyrer ligger mellom 502 og 523 nm.

98 µl PicoGreen bruksløsning (0,5 µl Quant-iT PicoGreen reagent, 1 x TE-buffer) ble applisert til hver brønn i en Nunc F96 MicroWell™ plate. Deretter ble 2 µl PCR produkt tilsatt til respektive brønner, og blandet ved repeterte pipetteringer for fullstendig homogenisering. Platene ble avlest i et spektrofluorometer (Cambrex, Inc) med to fluorescein filter, som målte eksitasjon ved 485 nm og emisjon ved 528 nm (sensitiviteten ble satt til 50). Resultatene ble lest av med programvaren KC4™ (BioTek) og λ DNA standard fra 100 ng/µl til 0,78 ng/µl ble benyttet for utregning av konsentrasjon.

2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

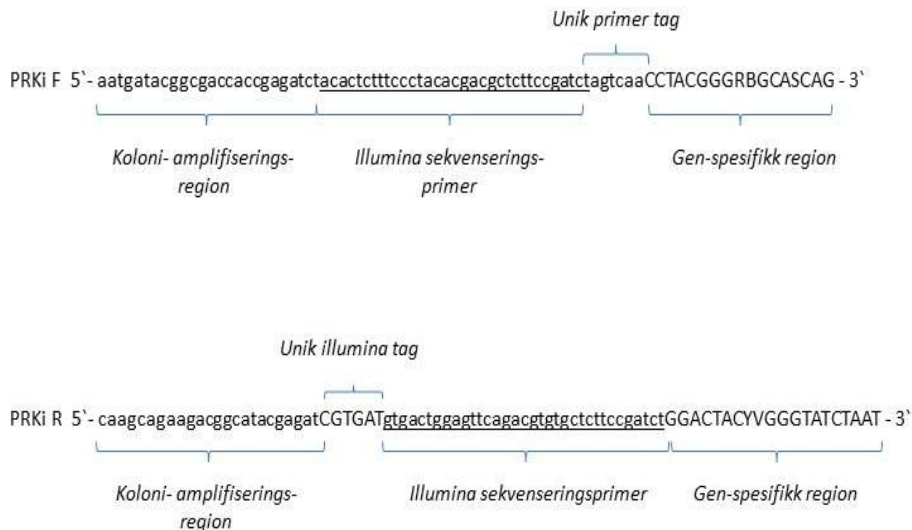
For å oppnå tilstrekkelige mengder genomisk materiale fra batchreaktorene, utføres en 16S rRNA genamplifisering med et universelt primersett for prokaryote organismer; PRK341F og PRK806R, et primersett for deteksjon av arker; ARC787F og ARC 1059R og et primersett for bakterier; BAC338F og BAC805R. Alle primersettene er utviklet for deteksjon av mikrobefunn i bioreaktorer, og basert på regioner av identitet innen organismenes 16S rRNA sekvenser (Yu et al. 2005). Primersekvenser og øvrig karakteristik er gitt som vedlegg, jf. Vedlegg B.1.

I denne oppgaven ble HOT FIREpol® DNA polymerase (Solis Biodyne) med tilhørende reagenser benyttet i følgende reaksjonsblanding: 1,25 U HOT FIREpol® DNA polymerase, 1 x HOT FIREpol® buffer B2, 2,5 mM Magnesium-dichloride (MgCl₂), 200 µM dNTP og 0,2 µM av hver primer (forward og reverse). Fra en fortynningsrekke ble et volum på 1,5 µl (5-100 ng/µl) DNA templat valgt som optimal mengde i reaksjonen. MQ-vann ble tilsett til et totalvolum på 25 µl per reaksjon. Reaksjonen ble utført i en termosyklus (Applied Biosystem) med følgende temperaturforhold: En initiell denaturering, og aktivering av HOT FIREpol polymerasen ble utført ved 95 °C i 15 min. Deretter ble denaturering av dsDNA, primerhybridisering og elongering gjentatt i 30 sykluser på hhv. 95 °C (30 sek.), 57 °C (30 sek.) og 72 °C¹ (45 sek.)

¹ Temperatur varierer m.h.p smeltepunktet til primeren som benyttes. Temperaturen gitt her er basert på smeltepunktet til PRK- primersettet.

2.7.1 16 S rRNA genamplifisering med PRKillumina primersett

Et primerbibliotek ble konstruert fra det universelle primerparet for prokaryote organismer (PRK341F og PRK806R). Regionen i primerens 3` ende inneholdt den genspesifikke sekvensen, mens 5` enden var modifisert med en spesifikk adapter. Adapteren inneholdt en koloniamplifiserende region og en Illumina sekvenseringsregion (Figur 2. 5). Biblioteket bestod totalt av 12 reverse primere og 16 forward primere. Hver reversprimer bar et unik Illumina-merke («illumina tag»); en kort sekvens (seksomer) av revers komplementære baser til indekssekvens gitt i TruSeq Index Sequencer, indeks 1-12, jf. Vedlegg C.1. Egne indeksskoder («primer tag») ble konstruert for forward primerene, for å identifisere og separere koloniene (indeks 13-28 in TruSeq Index Sequencer). Sekvenser av samtlige illuminaprimere benyttet til 16S rRNA genamplifiseringen foreligger som vedlegg, jf vedlegg C.2.



Figur 2. 5. Skjematisk fremstilling av PRKillumina Forward (PRKi F) og PRKillumina Reverse (PRKi R) primere. Det genspesifikke området på primeren tilsvarer PRK341F og PRK806R primersekvensene, som er et universelt primerpar designet for områder på 16S rRNA gensekvensen til prokaryote organismer. Koloniamplifiseringsregionen er komplementær til oligonukleotid-sekvenser på illuminaplattformens flytcelle. Hver reverse primer har et unik illumina merke (tag). For å kunne gjenkjenne og separere koloniene, designes unike primer merker til hver forward primer.

PRKillumina-primerparene ble kombinert på 192 ulike måter, etter følgende mønster; to mikrobrønnplater ble benyttet, der de 12 ulike PRKi R primerne ble applisert, en i hver kolonne (1-12). Deretter ble 16 ulike PRKi F primere tilsatt, en i hver rad (A-H, A-H). Som templat ble DNA fra de 192 ulike prøvene (en fra hvert duplikat; prøven uten intern kontroll) benyttet.

En amplifiseringsreaksjon med standard betingelser i henhold til seksjon 2.7 ble utført. Basert på en T_m -gradient av PRKillumina primersett på tidligere DNA prøver, ble en temperaturen for primerhybridisering bestemt til 50 °C. Ved å velge en så lav temperatur gjøres amplifiseringen mindre spesifikk. Ulempen vil være at det ved for lav hybridiseringstemperatur vil dannes primerdimer.

PCR produktet ble benyttet både til blandet Sanger-sekvensering og dybdesekvensering på Illumina-plattform/MiSeq.

2.8 DNA sekvensering av mikrobiota

DNA sekvensering ble utført for å bestemme baserekkefølgen til 16S rRNA genregionen til organismene tilstede i biogassreaktorene. På bakgrunn av dette ble mikrobielle arter identifisert og den mikrobielle diversiteten kartlagt.

2.8.1 Blandet Sanger-sekvensering

Alle PCR-produktene fra amplifisering med PRKillumina-primere ble fortynnet før prosessering for Sanger-sekvensering. En 1 % agarosegel-elektroforese av fragmentbånd fra PCR-produkt viste at forsøkets amplikon var omtrent 550 bp langt, og PCR-produktene ble fortynnet til 5 ng i MQ-vann (etter anbefaling i manual for BigDye® Terminator V 1.1 Cycle Sequencing Kit).

Etter en endt amplifiseringsreaksjon vil løsningen inneholde ss-primere, overflødig ssDNA og nukleotider. For å hindre at disse komponentene forstyrret kommende reaksjoner, ble PCR-produktet enzymatisk rensert. Exonuclease 1 degraderer ss-primere og ssDNA, mens Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) hydrolyserer gjenværende dNTP (ExoSAP- IT™, USB® Products Affymetrix). For hver reaksjon ble 1 µl PCR-produkt (~ 5 ng), 0,5 µl ExoSAP- It™ reagens miks, kombinert med 1 x BigDye Terminator v1.1/v1.3 Sequencing Buffer og blandet til et totalvolum på 5 µl med MQ-vann. Enzymaktivering og – inaktivering ble utført ved inkubering i en termosyklar, i hhv. 37 °C i en time og 80 °C i 15 min.

For utføring av en fluorescensbasert sekvenseringsreaksjon, ble BigDye® Sekvenserings Terminator (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem) benyttet. Terminatoren inneholder polymerase og en blanding av dNTP og ddNTP. I sekvenseringsreaksjonen amplifiseres DNA ved inkorporering av naturlige dNTP og terminerende ddNTP, der hver ddNTP(ddATP, ddCTP, ddGTP og ddTTP) er fluorescensmerket med ulike fargestoff. Hensikten er å få ekstensjonsprodukter i alle mulige

lengder, som kan separeres m.h.p størrelse og detekteres ut fra fluoroescenssignal fra eksitert fluorokrom. 1 µl BigDye v1.1 reaksjons miks, 1 x BigDye Terminator v1.1/v1.3 sekvenseringsbuffer og 3,2 µM sekvenseringsprimer (forward) ble applisert til 5 µl ExoSap behandlet PCR-produkt. MQ-vann ble tilsatt til et totalvolum på 10 µl.

Amplifiseringsreaksjonen ble utført i en termosyklus. Etter initiell denaturering ved 95 °C i 1 min, ble 25 temperatursykluser for sekvenseringsreaksjonen utført i følgende gjentatte steg; denaturering ved 96 °C (15 sek.), primerhybridisering ved 50 °C (5 sek.) og elongering ved 60 °C (45 sek.). Etter sekvenseringsreaksjonen ble prøvene spunnet ned i en dobbel platesentrifuge på 14 000 rpm i 1 min. (PlateSpinII, Kubota).

For å rense produktet fra sekvenserings-PCR reaksjonen for saltioner, ikke-inkorporert farge terminator og dNTP/ddNTP, ble XTerminator™-løsning og SAM™ -løsning (BigDye® XTerminator™ Purification Kit, Applied Biosystem) benyttet. XTerminator binder uinkorporert farge og salter fra post-sekvenseringsreaksjonen, mens SAM forbedrer XTerminator-reagenten og stabiliser sekvenseringsprøven etter rensing. Til hver prøve fra sekvenseringsreaksjonen ble 10 µl XTerminator-løsning og 45 µl SAM applisert, i henhold til protokoll for BigDye XTerminator. Platen ble forseglet med selvklebende folie (MicroAmp™ Optical Adhesive Film) og ristet på vortex mikser (MS 3 digital, IKA) med plateadapter ved 2000 rpm i 30 min (ved romtemperatur), slik at reagensene fanget opp og immobiliserte uønskede komponenter. Prøvene ble deretter sentrifugert (PlateSpinII, Kubota) med en hastighet på 2900 rpm i 2 min. På denne måten ble uløselige fraksjoner og reaksjonskomponenter felt ut til bunnen, mens de fluorescensmerkede sekvenseringsproduktene forble i supernatanten.

Analysering av prøven ble foretatt med 3130xl Genetic Analyzer (ABI). DNA analysatorens kapillærkolonne inneholdt en polymermatrise, som separerte DNA fragmenter basert på størrelse. Fragmentene ble deretter utsatt for laserstråling slik at fargemolekylene (på ddNTP) fluorescerer. Fluorescenssignalene samles og spektral-separeres i et spektrogram og instrumentets programvare viser dataene i et elektroferogram.

Principal Components Analysis (PCA) og Multivariate curve resolution (MCR) ble benyttet for analysering av utbyttet etter sekvensering. PCA gir en klassifisering av ulike subgrupper, basert på mønstergjenkjennelse fra forholdet mellom flere ukorrelerte komponenter (PC, principle components). Forholdet blir fremhevet i forskjeller mellom de ulike komponentene (Jolliffe 2002). Også MCR baseres på variasjon, og deler opp datasettet utfra antall

komponenter, deres responsprofil og estimert konsentrasjon (Tauler & Smide 1995). Både PCA og MCR ble utført av Knut Rudi.

2.8.2 Dybdesekvensering

I tillegg til Sanger-sekvensering, ble også en dybdesekvensering med *high throughput*-teknologi utført. Alle PCR-produktene fra amplifisering med PRKillumina primersett ble blandet til en prøve for multipleksing. En total konsentrasjon av DNA på 2000 ng var ønskelig, og fordi DNA-konsentrasjonen varierte for de ulike PCR-produktene, var en normalisering av prøvene nødvendig. Konsentrasjonen av DNA etter amplifisering ble bestemt med fluorescensmålinger i et spektrofluorometer (jf. seksjon 2.6.3), og på bakgrunn av disse verdiene ble alle prøvene fortynnet til en gitt konsentrasjonen på 10 ng DNA per prøve.

PCR-produktet ble rensert med et kolonnebasert system som binder spesifikt DNA eller RNA i en HiBind® matrise, mens kontamineringer som salter og proteiner vaskes gjennom. For utførelse av PCR rensingen ble hovedprinsippene fra E.N.Z.A.™ Cycle-Pure Kit Manual (Omega Bio-Tek) fulgt. 4 volumer av CP buffer ble tilsatt PCR-produktet, og løsningen ble overført til HiBind® DNA kolonne. Gjentatte vaskesteg med DNA vaskebuffer utføres før 30 µl elueringsbuffer (0,1 mM Tris-HCl, pH 8,5) tilsettes kolonnen, som deretter sentrifugeres på maksimal hastighet i 1 min for eluering av DNA. For å øke utbyttet av DNA, ble eluatet overført til samme kolonne og sentrifugert på nytt. DNA konsentrasjonen ble målt med PicoGreen og Nanodrop, og en estimering av lengde og renhet ble utført på 1 % agarosegel-elektroforese.

Amplikonbiblioteket (10 ng/µl, med et totalt volum på 50 µl i 0,1 mM Tris buffer (pH 8,5)) ble sekvensert i MiSeq® system (Illumina). Dette er et helautomatisk system som gir leselengder på 150 bp. Sekvenseringer ble utført av Universitetssykehuset i Oslo.

Sekvensprosessering av rådata ble utført i MATLAB (Matrix Laboratory) og ulike Operational Taxonomic Unit (OTU) ble definert basert på mønsteret av basene adenin og cytosin i sekvensene. På bakgrunn av manglende erfaring med MATLAB, og tidsbegrensinger knyttet til opplæring, ble behandlingen av rådata utført av Knut Rudi. *RDP-Classifier* (Ribosomal Database Project) (Wang et al. 2007) ble benyttet for OTU-klassifisering.

2.9 Kvantitativ PCR (qPCR)

qPCR ble benyttet for å undersøke forholdet mellom den relative mengden av to metanogene grupper, i tillegg til ratioen av arker og bakterier. Til dette ble spesifikke primer-/probesett for

Methanomicrobiales (MMB282F, MMB749F-probe, MMB832R) og Methanosarcinaceae (Msc380F, Msc492F-probe, Msc828R) benyttet, i tillegg til et universelt primersett for detektering av prokaryote organismer (PRK341F, PRK806R), og arker (ARC787F, ARC1059R). Alle primer- og probesettene er designet basert på regioner av identitet innen målorganismenes 16S rRNA gensekvenser (Yu et al. 2005). Sekvenser og øvrig karakteristik av primere og prober foreligger som vedlegg, jf. vedlegg B.1.1.

EvaGreen® (Solis BioDyne) ble benyttet i kombinasjon med de universelle primersettene. Denne forbindelsen avgir fluorescerende signaler etter interkalering i dobbelt trådet DNA. For qPCR reaksjon med PRK- og ARC- primersettene ble følgende reagenser blandet per reaksjon: 1 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), 0,2 µM av hver primer, 1,5 µl (5-100 ng/µl) DNA templat og MQ-vann til et totalt volum på 25 µl. ROX ble valgt som passiv referanse, for å normalisere fluorescens reporter signal som genereres i qPCR. qPCR-reaksjonen ble utført etter følgende oppsett: En initiell DNA denaturering ved 95 °C i 15 min og 40 sykluser av denaturering ved 95 °C (15 sek.), primerhybridisering ved 60 °C (20 sek.) og elongering ved 75 °C (30 sek.). Slike uspesifikke systemer vil binde til alt dsDNA, og reaksjonen ble derfor avsluttet med en smeltekurve for å avdekke tilstedeværelsen av primerdimer og uspesifikk binding. I smeltekurven økes temperaturen sakte fra 60 °C til 95 °C, slik at dsDNA denatureres og fluorescensmolekylet løsner. Primerdimer denatureres tidligere enn amplikonet på grunn av dens størrelse, og tilstedeværelsen vises derfor som et drypp i signalet ved 70 °C (Kubista et al. 2006).

TaqMan® prober er spesifikke system, som skiller mellom uspesifikk amplifisering og amplifisering av ønsket sekvens. Probene inneholder en enkeltrådet probesekvens som er komplementær til en av trådene på DNA sekvensen. Denne probesekvensen har et fluorokrom festet til 5' ende, og et quencher molekyl i 3' ende. Når disse molekylene er i nærheten av hverandre, vil quencher-molekylet absorbere eksitert energi fra fluorokromet i form av lys og spre signalet i form av lys (fluorescens) eller varme (dark quencher) (Eurogenetec). Under hybridisering binder proben til DNA sekvensen. En elongering av primerene på samme DNA tråd vil degradere probesekvensen som dermed frigjør og separerer fluorokrom og quencher-molekylene. Uten quencher innen rekkevidde sender det fluorescerende molekylet ut lys som detekteres. I denne oppgaven ble FAM benyttet som fluorokrom sammen med «dark quencher».

For probebasert qPCR med de spesifikke primersettene for metanogene grupper (MMB, Msc) og 5'-nuklease prober (TaqMan) (MMB og Msc) ble følgende reagenser blandet per reaksjon: 1,25 U HOT FIREpol® DNA polymerase, 1 x HOT FIREpol® buffer B2, 2,5 mM Magnesium-dichloride, (MgCl₂), 0,2 mM dNTP, 0,2 µM av hver primer og 0,1 µM tilsvarende probe. 1,5 µl (5-100 ng/µl) DNA ble benyttet som templat i hver reaksjon. MQ-vann ble tilsatt til et totalt volum på 25 µl. qPCR-reaksjonen ble utført i følgende oppsett: Initiell denaturering ved 95 °C, med påfølgende 40 sykluser av 95 °C (15 min.) og 60 °C (1 min.).

Alle reaksjonene ble utført på MicroAmp® Fast Optical 96-well reaksjons plate (forseglet med MicroAmp™ Optical Adhesive Film) og spunnet ned for å fjerne eventuelle luftbobler. qPCR-reaksjonen ble foretatt i instrumentet StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). For kontroll av plate-til-plate variasjoner, og som referanse for kvantifisering, inkluderes amplifisering med den interne kontrollen (jf. det syntetiske templatet tilsatt under DNA ekstrahering). Innstillingene ble kommandert manuelt via instrumentets tilhørende StepOne™ Software v.2.0 (Applied Biosystems). Den samme programvaren ble benyttet for datahåndtering.

Effektiviteten for hver qPCR reaksjonene ble rekalkulert i programvaren LinRegPCR (Ruijter et al. 2009). Basislinjen viser signalene som måles før spesifikk amplifisering detekteres, og har opphav fra blant annet ubundne fluorokromer og uspesifikke bindinger. PCR effektiviteten påvirkes i stor grad av basislinjeestimatet, og LinRegPCR estimerer basislinjen ved å rekonstruere en log-lineær fase fra et tidlig platå i amplifiseringskurven. En regresjonslinje tilpasses punkter i datasettet, og PCR effektiviteten til hver prøve beregnes fra linjens stigning. Den relative mengden DNA ble beregnet med det syntetiske plasmidet (viser til seksjon 2.5) som referanse, etter følgende formel:

$$\text{Log}_2(\text{relativ mengde}) = -\left(\frac{C_T(\text{prøve})}{\text{PCR}_{\text{eff.}}(\text{prøve})} - \frac{C_T(\text{referanse})}{\text{PCR}_{\text{eff.}}(\text{referanse})}\right)$$

C_T refererer til antall sykluser for å nå terskelverdien (gitt i StepOne™) og PCR_{eff} er reaksjonseffektiviteten til hver prøve (beregnet i LinRegPCR).

2.10 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

For bestemmelse av ratioen Bacteria:Archaea, samt visualisering og lokalisering av mikrobiologiske celler, ble *fluorescence in situ hybridization* (FISH) benyttet. Fra en reaktor per blandingsserie (jf. 1.1, 2.1, 3.1 og 4.1) ble hybridisering av to parallelle prøver utført, der 10 tilfeldige bilder ble tatt av preparatene fra hver parallell.

For å skille mellom bakterielle celler og arker, ble to prober med ulike modifiseringer i 5'-ende benyttet. Den arke-spesifikke proben, ARC915 med 6-FAM i 5'-ende gav grønn fluorescens. Proben som hybridiserte til bakterielt DNA, EUB338, var modifisert med Cy 3 Indocarbocyanin 507.59 i 5'-ende, som gav rød fluorescens (begge probene ble levert av Eurogenetic). Probenes sekvens og øvrig karakterisering er gitt som vedlegg, jf. vedlegg B.1.2.

Prosedyren for FISH deles inn i fire steg: Fiksering og permeabilisering av cellen, hybridisering, vasking for å stoppe hybridisering og fjerne ubundet prober, og til slutt deteksjon av celler i fluorescensmikroskop. Før hybridisering må celleveggen gjøres mer gjennomtrengelig for den fluorescerende proben, samtidig som at cellens rRNA må beskyttes fra degradering av endogene RNaser. Effektiviteten av fikseringen er kritisk for resultatet siden tilstrekkelig penetrering av probene er nødvendig for optimal hybridisering (Moter & Gobel 2000). I dette forsøket ble 3,0 % paraformaldehyd benyttet for fiksering av cellene. Fiksativet ble titrert med 10 M HCl til pH 7,0 (løsningen har svært lav bufferkapasitet).

Resuspensering av pellet før og etter fiksering ble utført med 1 x PBS, erstattet av 1 x PBS og 96 % EtOH (1:1) i siste vaskesteg før hybridisering. Cellesuspensjonen ble tørket på teflonbelagt glasskive, deretter dehydrert i hhv. 50 %, 80 % og 96 % EtOH før cellene ble hybridisert med 5 µl 20 µM ARC915 og EUB338 i hybridiseringsbuffer (35 % formamid, 0,9 M NaCl 0,01 % SDS, 20 mM Tris pH 7,2). Etter hybridisering ble preparatene vasket i vaskebuffer (40 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,01 % SDS, 20 M Tris pH 7,2). En dråpe (~ 5 µl) monteringsløsning ble tilsatt hver brønn for å hindre "bleking", og til slutt ble dekkglass lagt over. Preparatene ble undersøkt i et konfokal laserskanningmikroskop, LSM 700 (Zeiss).

Metoden som ble benyttet for gjennomføring av FISH var hentet fra Bomo et al. (2004). En fullstendig protokoll med modifikasjoner foreligger i sin helhet som vedlegg, jf. vedlegg D.3. Oppskrifter av fiksativ, hybridiseringsbuffer og vaskebuffer foreligger i vedlegg G.1.3.

3. Resultater

3.1 Analyser av biomassen

3.1.1 Beregning av totalt tørrstoff (TS) og organisk tørrstoff (VS)

I tabell 3. 1. sees startkulturenes innhold av tørrstoff og organisk tørrstoff. Oppgitte prosentandeler er beregnet ut fra substratets våtvekt.

Som tabellen viser, inneholdt fiskeensilasje et høyere tørrstoffinnhold enn storfe gjødsel. Dette kommer også frem av batchreaktorene, der totalt tørrstoff og organisk tørrstoff i reaktorene stiger med økende andel fiskeensilasje.

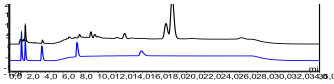
Tabell 3. 1. Innhold av totalt tørrstoff og organisk tørrstoff i startkulturen til samtlige blandingsforhold, i tillegg til rene substratkulturer av storfe gjødsel, fiskeensilasje og inokulum. Mengden vises som prosentvis andel TS og VS, samt vekt av tørrstoffinnhold per batchreaktor (med totalt biomasseinnhold på 60 ml). Seriene består av følgende ratio (basert på volum) av hhv. storfe gjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %.

Materiale	% TS	% VS	g TS i 60 ml	g VS i 60 ml
Inokulum	3,26	67,14	1,96	1,31
Storfe gjødsel	5,68	76,32	3,41	2,60
Fiskeensilasje	32,64	92,25	19,58	18,07
Serie 1	18,92	90,29	11,35	10,25
Serie 2	14,02	88,30	8,41	7,43
Serie 3	10,06	86,12	6,03	5,20
Serie 4	5,72	80,15	3,43	2,75

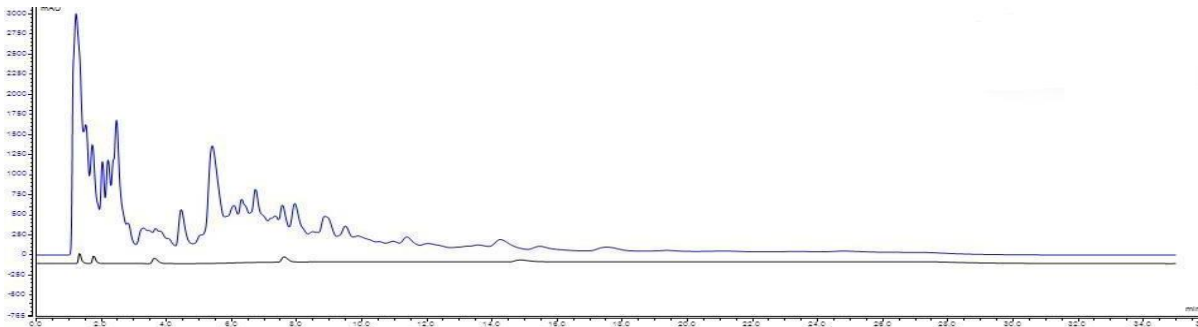
Mengde organisk tørrstoff per batchreaktor ble også benyttet for beregning av spesifikk gassproduksjon.

3.1.2 Detektering av et utvalg flyktige fettsyrer

En HPLC-analyse av start- (0 dager), midt- (59 dager) og sluttkulturer (101 dager) av biomassematerialet ble utført med hensyn på deteksjon av et utvalg flyktige fettsyrer i biomassen. Analysen ble gjennomført i tråd med anbefalt protokoll, men på grunn av ekstreme mengder bakgrunnsstøy fra fiskeensilasjematerialet ble resultatene ansett som umulige å lese. Figur 3. 1 og Figur 3. 2 illustrerer kromatografiske profiler av prøver med hhv. storfe gjødsel og fiskeensilasje (begge 100 % substrat), i kombinasjon med standarder av 100 mM metansyre, etansyre/eddiksyre, propansyre, butansyre og valerinsyre.



Figur 3. 1 Kromatografisk profil av 100 % substrat av storfe gjødsel (sort kromatogram) og 100 mM standard (blått kromatogram) av følgende flyktige fettsyrer (vises som topper, i rekkefølge fra venstre til høyre): metansyre, etansyre/eddiksyre, propansyre, butansyre og valerinsyre. Av denne profilen ser vi at rent storfe gjødsel inneholder flere av fettsyrene i standarden, i tillegg til noe bakgrunnsstøy forårsaket av absorbering av andre stoffer.



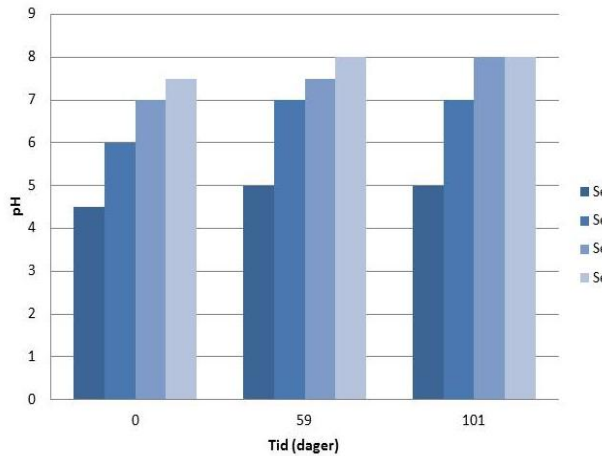
Figur 3. 2 Kromatografisk profil av 100 % substrat av fiskeensilasje (blått kromatogram) og 100 mM standard (sort kromatogram). Denne profilen illustrerer den enorme overbelastningen fra bakgrunnsstøy i det ensilerte fiskeavfallet. Også øvrige prøver med innhold av fiskeensilasje viste lignende trend.

Selv om prøvene for rent storfe gjødsel viste relativt god separering av ulike komponenter, var det stor overbelastning i samtlige prøver med innhold av fiskeensilasje. Det foreligger derfor ingen kvantifisering av flyktige fettsyrer i batchreaktorene.

3.1.3 pH-utvikling i de ulike reaktorene

En måling av pH i startkultur (0) dager, midtkultur (59 dager) og sluttkultur (101 dager) ble foretatt av de fire ulike blandingene (

Figur 3. 3). I tillegg ble pH av inokulum og substratene (storfe gjødsel og fiskeensilasje) målt med pH-indikatorstrips (Merck Chemicals). Verdiene innad i hver serie representerer målinger fra ulike batchreaktorer med samme innhold, og kan derfor ikke betegnes som direkte parallelle målinger. På bakgrunn av disse faktorene bør resultatene bare ansees som veiledende for å vise en trend, og ikke den faktiske utviklingen av pH i de ulike reaktorene.



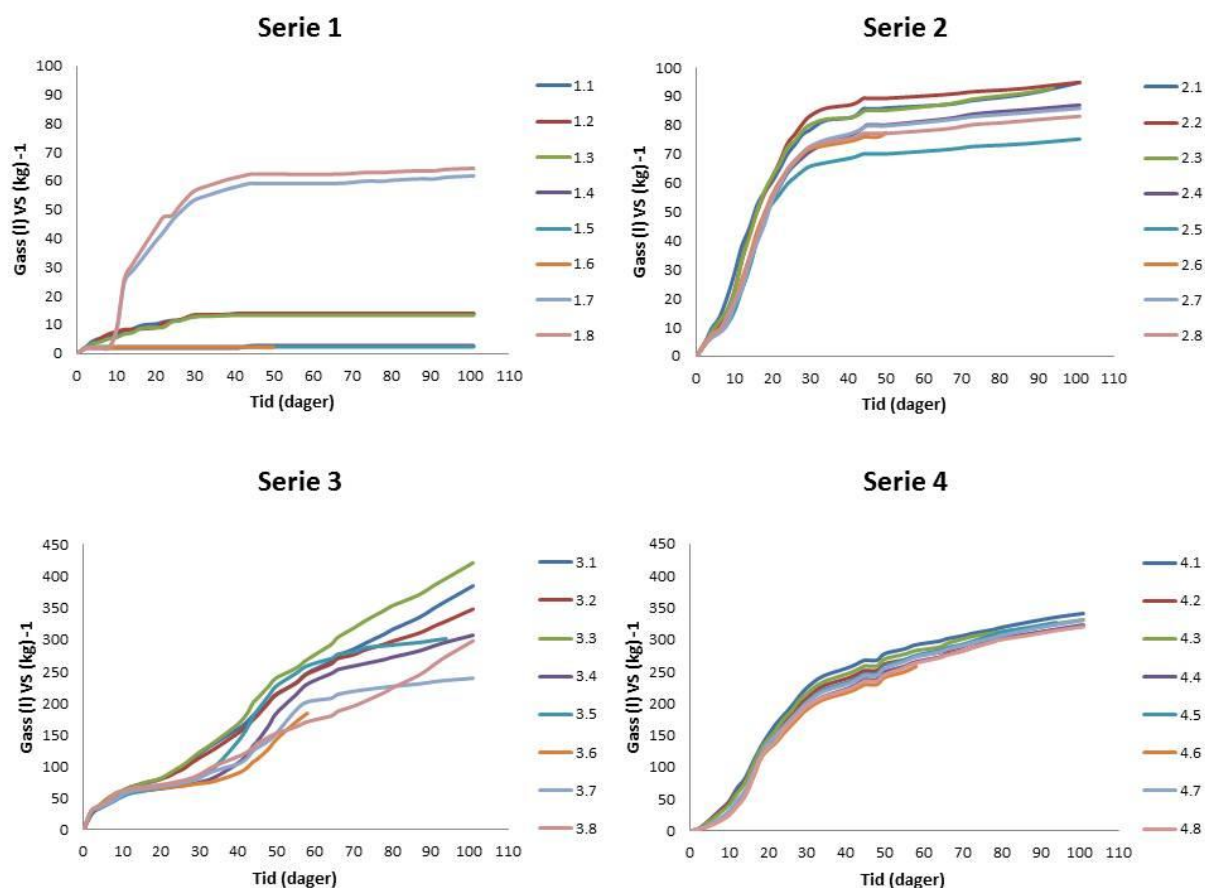
Figur 3. 3. Indikert pH av startkultur (0 dager), midtkultur (59 dager) og sluttkultur (101 dager). Seriene består av følgende ratio (basert på volum) av hhv. storfe gjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %.

Målingene viser en tendens til svak stigning i pH fra startkultur til midtkultur. Dette stemmer med forventningene, siden nedbrytning av proteinrike substrater gir store mengder ammoniakk. Det observeres ingen synlige endring fra midtkultur til sluttkultur, med unntak av stigende pH i serie 3. Inokulumet viser pH 8, mens storfe gjødsel ligger noe under, med en pH mellom 7 og 8. Fiskeensilasje har som forventet en lavere pH (rundt 4). Reaktorene med høyest andel fiskeensilasje har dermed, ikke overraskende, den laveste pH-verdien.

3.2 Analyser av biogassen

3.2.1 Beregning av spesifikk gassproduksjon

Målinger av mengde gass ble foretatt av alle batchreaktorene (4 ulike substratblandinger, med 8 parallelle batchreaktorer per blanding) gjennom hele forsøksperioden. Fra reaktorenes akkumulerte gassmengde ble spesifikk gassproduksjon beregnet, definert som liter gass produsert per kilogram organisk tørrstoff tilsatt i batchreaktor med total materialevolum på 60 ml. Tre av reaktorene innen hver serie ble benyttet til uttak av materiale for isolering av genomisk DNA i en 30 dagers periode. De fem siste stod urørte, og fungerte som kontroller, da de kun ble benyttet til kvantitativ og kvalitativ analyse av gass. For å vise variasjonen i gassproduksjon innen de parallelle batchreaktorene, fremstilles spesifikk gassproduksjon for hver serie i en periode på 101 dager, jf. Figur 3. 4. Reaktor 6 av alle seriene avsluttes etter 59 dager (ble benyttet som midtkultur for fettsyreanalyse, HPLC), men dataene tas likevel med i beregningen.

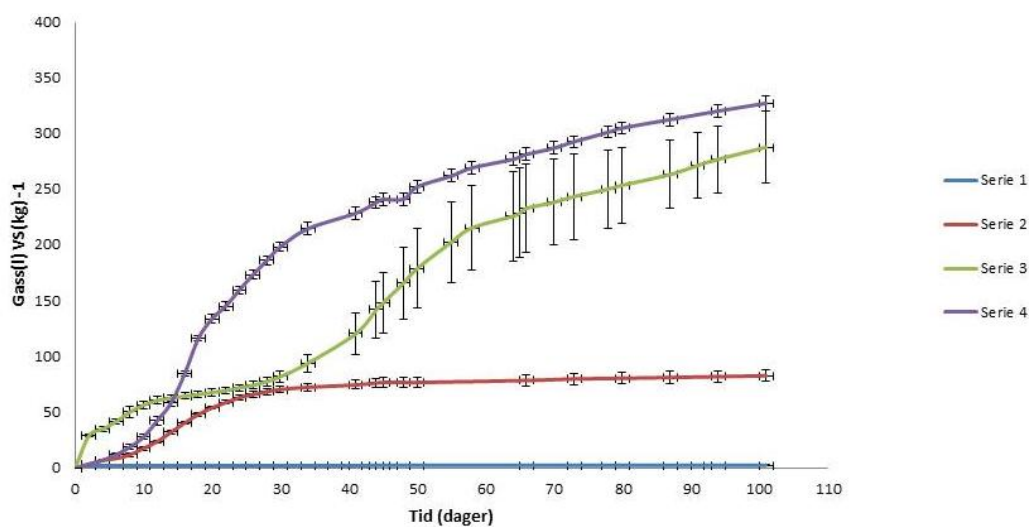


Figur 3. 4. spesifikk gassproduksjon (gass (l) VS (kg)⁻¹) i fire ulike substratblandingen, referert til serie 1, 2, 3 og 4. Serienavnene (t.h. for graf) til hver kurve viser hvilket nummer av de parallelle batchreaktorene dataene presenterer. Seriene består av følgende ratio (basert på volum) av hhv. storfe gjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %. Reaktor 6 i hver serie avsluttes etter 59 dager. Av batchflaskene i serie 1, er 1.7 og 1.8 titrert med NaOH.

Fra Figur 3. 4 ser man at det ble produsert svært lite gass i serie 1, trolig på grunn av den store andelen ensilert fiskeavfall med pH rundt 4. Reaktor 1.7 og 1.8 ble tilsatt NaOH for å heve reaktormiljøets pH. Disse er derfor ikke representative for den opprinnelige gassproduksjon i serie 1, men fremstilles likevel for å vise effekten av pH-endringer. Lutingen av 1.7 og 1.8 ble foretatt etter en ukes inkubering. I en ny serie av samme blandingsforhold, senkes pH på dag 0, for å få større gassutbytte. Fremstillinger av disse batchreaktorene foreligger som vedlegg, jf. vedlegg A.1. Samtlige parallelle reaktorer i serie 2 produserer biogass den første perioden, der den minst aktive produserte til sammen 75,3 l gass per kg tilsatt VS. Gjennomsnittet av de tre reaktorene som ble benyttet til prøveuttak produserer svært lik mengde gass (94,6 - 94,8 l), og ligger høyere enn gjennomsnittet av urørte reaktorer. Etter 30 dager stopper derimot gassproduksjonen i disse batchreaktorene opp, noe som sees som en stasjonær fase i grafen.

De første 20 dagene er gassproduksjonen den samme for alle reaktorene i serie 3. Aktiviteten avtar noe i en periode, før en ny akkumulering fører til relativt store mengder gass. Av Figur 3. 4 ser man at det i denne perioden er det de åpne flaskene som produserer mest gass, mens urørte flasker har en lavere aktivitet. Etter 101 dager er det stor forskjell mellom reaktoren som produserer mest (reaktor 3.3), og den som produserer minst (reaktor 3.7). En ny serie av batchreaktorer med blandingsforholdet 80 % storfegjødsel: 20 % fiskeensilasje settes opp for kontroll, og denne viser en lignende trend. Alle reaktorene i serie 4 produserer nesten identiske mengder gass. Aktiviteten avtar noe etter hvert, med reaktorene produserer fortsatt gass etter 101 dager.

For å vise variasjonen mellom reaktorer med ulike blandingsfraksjoner, fremstilles gjennomsnittlig spesifikk gassproduksjon av de fire substratblandingene over 101 dager, jf. Figur 3. 5. Batchreaktorer som ble åpnet underveis i forsøket ekskluderes for å unngå skjevheter i resultatene fra eventuelle forstyrrelser knyttet til tilførsel av oksygen. Reactorer tilsatt lut i serie 1 utelates i denne beregningen, da disse produserte mer gass en ubehandlet batchreaktor (som observert i Figur 3. 6).



Figur 3. 5. Spesifikk gassproduksjon. Grafen representerer et gjennomsnitt av mengde gass (l) per organiske tørrstoff (kg) fra intakte batchreaktorer. Hver serie tilsvarer batchreaktorer med følgende ratio (basert på volum) av hhv. storfegjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %.

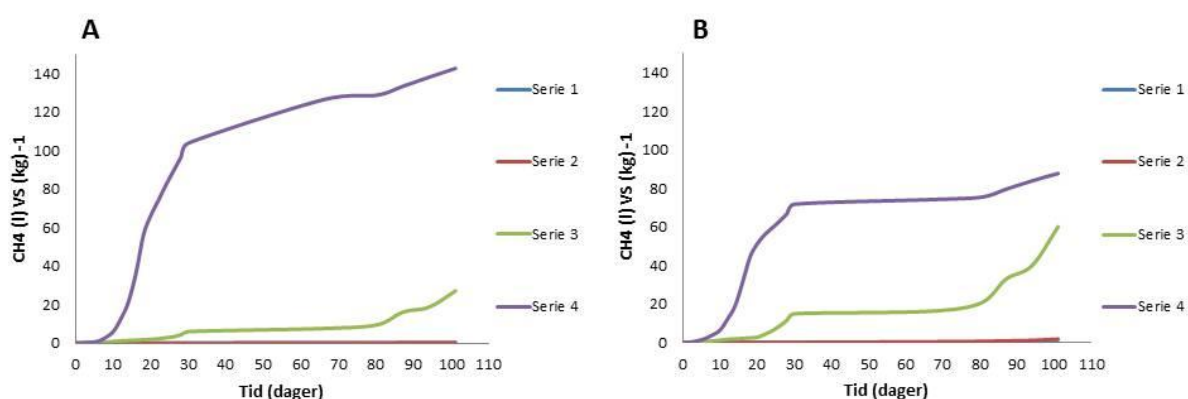
Sammenligninger med gjennomsnittet av produsert gass i batchreaktorer som åpnes, viser at serie 3 har en høyere spesifikk gassproduksjon enn uåpnede reaktorer (figur vises i vedlegg A.2).

3.2.2 Kvalitativ analyse av biogass med gasskromatografi

Biogass produsert i batchreaktorene ble analysert i en gasskromatograf gjennom hele forsøksperioden (101 dager), med redusert hyppighet etter 30 dager. I tillegg til identifisering av ulike komponenter i gassen, ble mengden av respektive gasskomponenter beregnet.

Biogass består stort sett av en blanding metan (CH_4) og karbondioksid (CO_2), og kommende grafiske fremstillinger viser den spesifikke produksjonen av disse gassene over gitt tidsperiode.

Figur 3. 6 viser spesifikk metanproduksjon i de ulike seriene, med gjennomsnittsverdier fra intakte reaktorer (A) og åpne reaktorer (B).



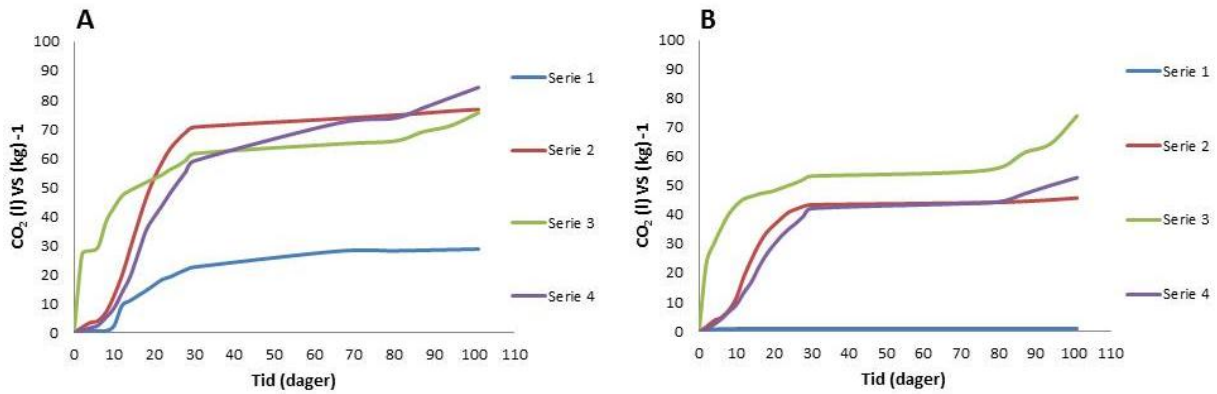
Figur 3. 6. Spesifikk mengde metan (l) produsert i de fire ulike substratblandinger, registrert med gasskromatograf. Hver serie representerer gjennomsnittet av intakte/uåpna batchreaktorer fra hele forsøksperioden (A). Tilsvarende fremstilling gjøres for batchreaktorer som åpnes annenhver dag (B). Seriene består av følgende ratio (basert på volum) av hhv. storfe gjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %.

Av akkumuleringskurve (A) for spesifikk metanproduksjon observeres en klar forskjell i metanproduksjonen for de ulike seriene, som samsvarer med andel fiskeensilasje.

Batchreaktoren med 100 % storfe gjødsel (serie 4) produserer mest metan den første tiden, mens serie 1 og serie 2, som inneholder hhv. 60 % og 40 % fiskeensilasje produserer under 2,5 l metan per organisk tørrstoff (kg) tilsatt. Også serie 3 produser små mengder metan den første perioden. Etter 70 dager registreres en økning i metanproduksjon for denne serien.

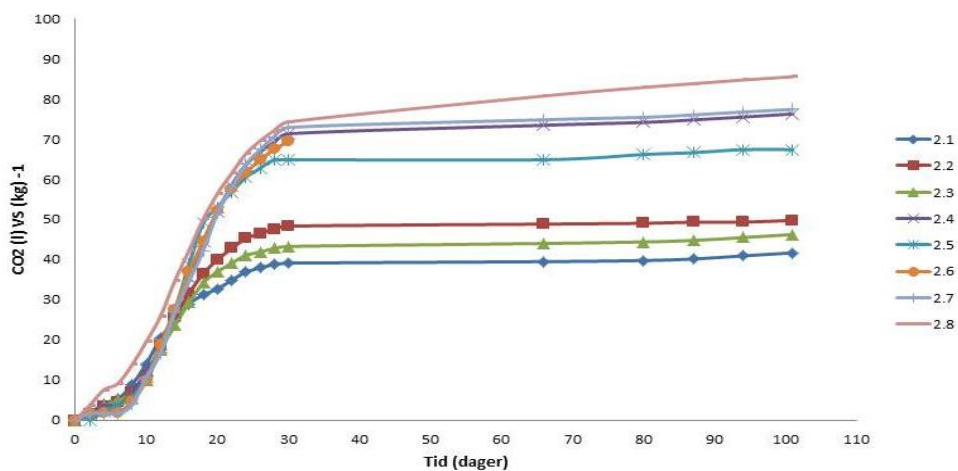
Denne økningen fortsetter ut forsøksperioden. En tilsvarende fremstilling av andel metan i åpne reaktorer (B) viser lignende trend, men med en lavere metanproduksjon for serie 4 og høyere for serie 3.

I tillegg til metan, ble karbondioksid i batchreaktorene registrert. Spesifikk CO₂-produksjon er representert ved gjennomsnitt av reaktorer som ikke åpnes (A) og reaktorer som åpnes (B), i Figur 3. 7.



Figur 3. 7. Spesifikk karbondioksidproduksjon vist som gjennomsnitt av målinger fra uåpnede batchreaktorer i hver representative serie (A). Den samme beregningen ble også utført for batchreaktorer som åpnes for uttak av materialet i løpet av de første 30 dagene(B). Seriene består av følgende ratio (basert på volum) av hhv. storfe gjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %.

En sammenligning av graf A og B i Figur 3. 7 viser en relativt stor forskjell mellom andel karbondioksid i batchreaktorer som forblir urørte gjennom perioden (A), og reaktorer som åpnes annenhver dag (B). For å illustrere dette bedre, vises variasjonen mellom åpnete og uåpnede parallelle reaktorer for serie 2 i figuren under (Figur 3. 8). Her observeres en forskjell i spesifikk CO₂ produksjon mellom åpnet og uåpnet batchreaktorer. Også de andre reaktorseriene viser en lignende trend.

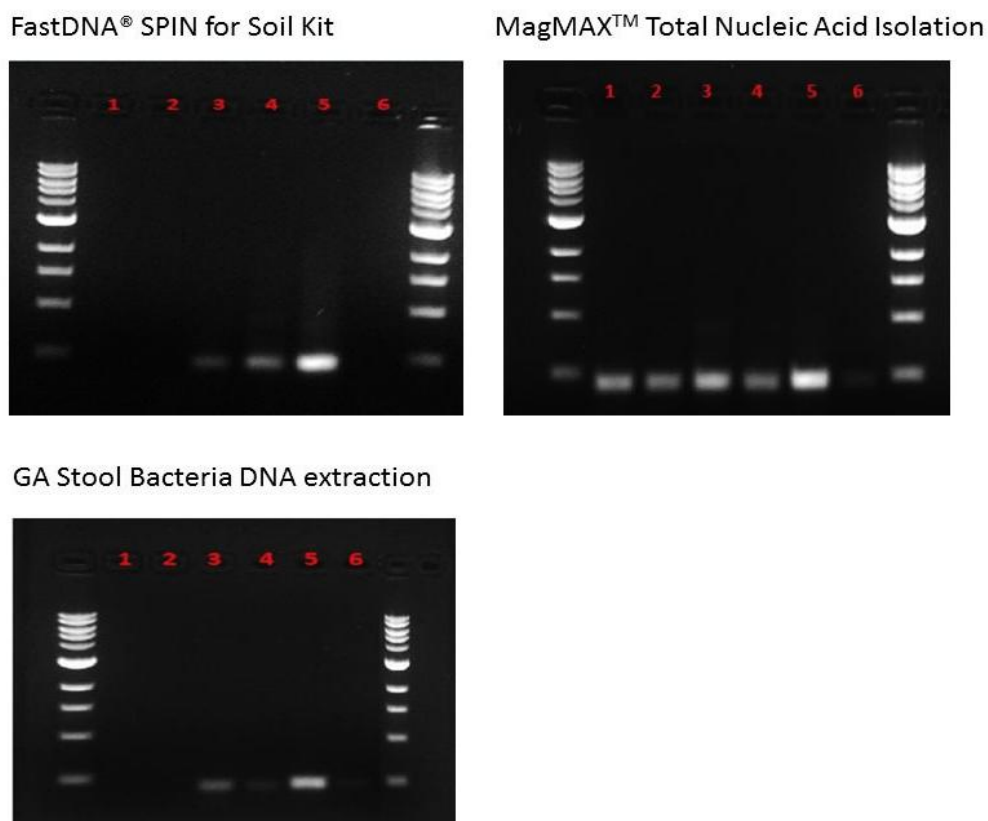


Figur 3. 8. Spesifikk karbondioksidproduksjon i alle batchreaktorene i serie 2. Hver kurve presenterer spesifikk CO₂- produksjon i individuelle batchreaktorer, der alle inneholder det samme, men 2.1, 2.2 og 2.3 åpnes annenhver dag for prøveuttak til genomisk analyse. Resterende forblir lukket gjennom hele forsøksperioden.

3.3 Valg av metode for isolering av genomisk DNA fra batchkulturene

For best utbytte av genomisk DNA fra biomassene, ble tre ulike metoder testet.

Prøvematerialet som ble benyttet var fra fermentorene med anrikningsmedium (Atlas 1993; Cooney et al. 2007) inokulert med storfegjødsel og fiskeensilasje (oppskrift på medium vises i vedlegg G.2) som viste mest metandannelse ved gasskromatografisk analyse etter inkubering på 37 °C i 28 dager. Etter isolering, ble en universell primer for prokaryote (PRK341F og PRK806R) benyttet for 16S rRNA amplifisering. For analysering av resultatene ble amplifisert DNA fra de tre renseprosedyrene visualisert i et gel-dokumentasjonssystem, etter fragmentseparering ved 1 % agarosegel-elektroforese, jf. Figur 3. 9.



Figur 3. 9. PCR produkt fra 16S rRNA genamplifisering av genomisk DNA, isolert etter tre ulike protokoller. Brønn 1-4 er DNA isolert fra ulike batchreaktorer av anrikningskulturer (vedlegg x), brønn 5 er positiv kontroll (*E. coli*) og brønn 6 er negativ kontroll.

Fra visualiseringen av fragmentene fra DNA-isoleringen observeres det at flere av de negative kontrollene for PCR er svakt forurenset. Grunnen til dette er trolig at vannet som ble benyttet i den negative kontrollen var dobbelt sterilfiltrert, men ikke autoklavert. Ved autoklaving fragmenteres DNA ytterligere, slik at sekvensen ikke kan binde primeren og på den måten delta i PCR. Vi velger likevel å bruke disse resultatene for validering.

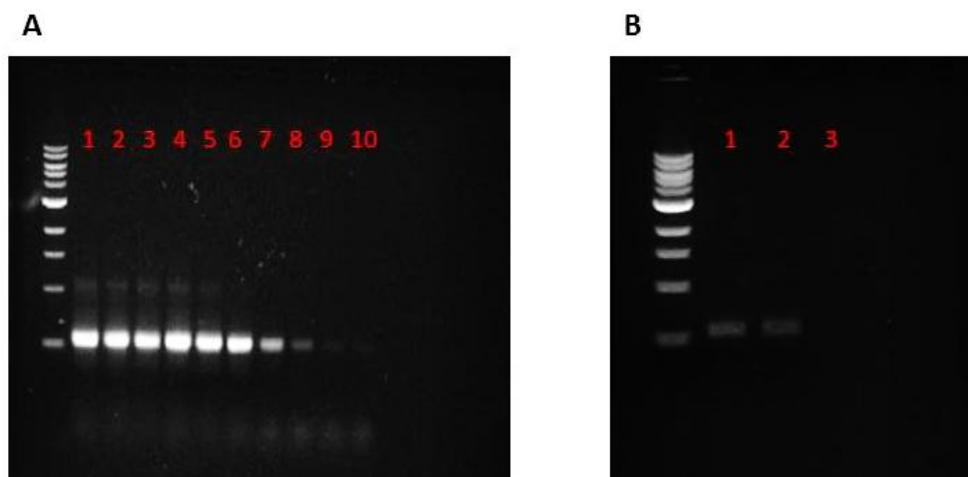
I tillegg ble renhet og konsentrasjonen av nukleinsyrer anslått med OD-målinger (Nanodrop ND-1000). Disse verdiene foreligger i sin helhet som vedlegg, jf. vedlegg A.3.

Komplekse materialer inneholder ofte store mengder hemmende substranser, som resulterer i et lavt PCR utbytte. MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion) gav et betydelig større utbytte av PCR-produkt enn FastDNA SPIN kit og GA Stool Bacteria DNA extraction, trolig på grunn av en optimalisering mot slike hemmestoffer. På grunnlag av disse resultatene ble derfor MagMAX isoleringsprosedyre benyttet for isolering av genomisk DNA fra bioreaktorene.

3.4 16 S rRNA genamplifisering av genomisk DNA med PRKillumina primersett

I sekvenseringsreaksjonene benyttes amplicon fra 16S rRNA amplifisering av isolert DNA. PRKillumina primersett (sekvensene foreligger i sin helhet som vedlegg C.2) ble benyttet, og basert på en T_m -gradient av PRKillumina primer bestemmes en primerhybridiserings-temperatur på 50 °C. Fra bildet av agarosegel med PCR-produkter fra T_m -gradienten (Figur 3. 10, A), ser det ut til at primerparet er svært robust. Temperaturområdet for primerannealing er bred, uten store mengder av primerdimer ved lav temperaturer.

Etter PCR reaksjon, normalisering og sammenblanding, ble ampliconbiblioteket for dybdesekvensering rensert og eluert i 0,1 mM Tris buffer (pH 8,5). Figur 3. 10, B viser eluert fragment etter 1 % agarosegel-elektroforese. OD-målinger (Nanodrop ND-1000) av eluatet viste en nukleotidekonsentrasjon på 10 ng/μl, med en absobans på 1,85 ved 260/280 nm.



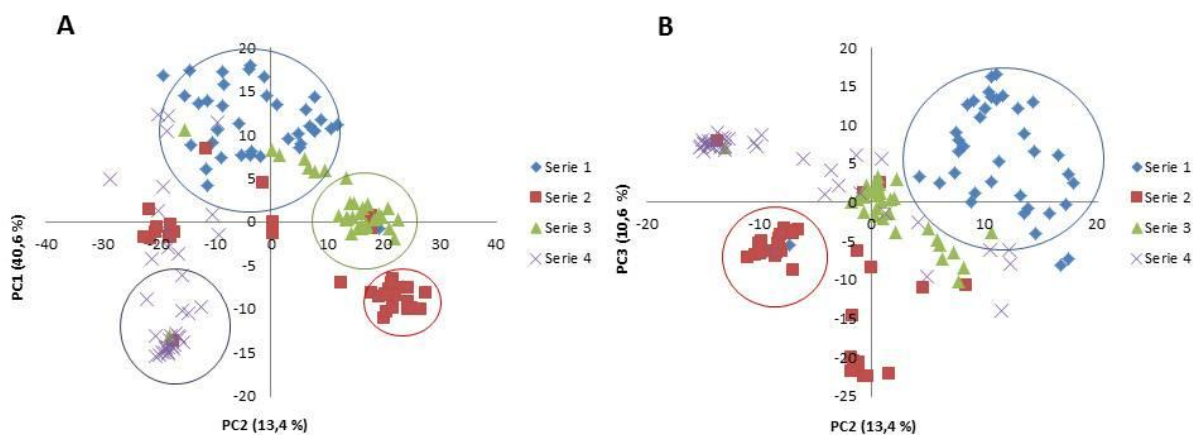
Figur 3. 10. 16S rRNA amplifisering av isolert DNA med PRKillumina primersett: (A) T_m gradient av PRKillumina primerpar. Følgende temperaturer i gradientet, fra brønn 1 til 10 (hhv): 47 °C; 48,4 °C; 52,5 °C; 55,1 °C; 57,8 °C; 60,5 °C; 63,0 °C; 65,1 °C; 66,7 °C; 67,5 °C. (B) 3 μl av ampliconbiblioteket (renset i 0,1 mM Tris buffer) vises i brønn 1 og 2. Brønn 3 er negativ kontroll. Sammenlignet med 1Kb ladder, viser fragmentet en størrelse på ca. 550 bp, i overensstemmelse med forventet lengde.

3.5 Sekvensering viste lav diversitet for bakterier og arker i batchreaktorene

3.5.1 Blandet Sanger-sekvensering

Datasettet fra Sanger-sekvenseringen inneholdt en blanding av mange ulike sekvenser. For å sortere disse, ble algoritmer som fremhever forskjeller mellom komponenter benyttet.

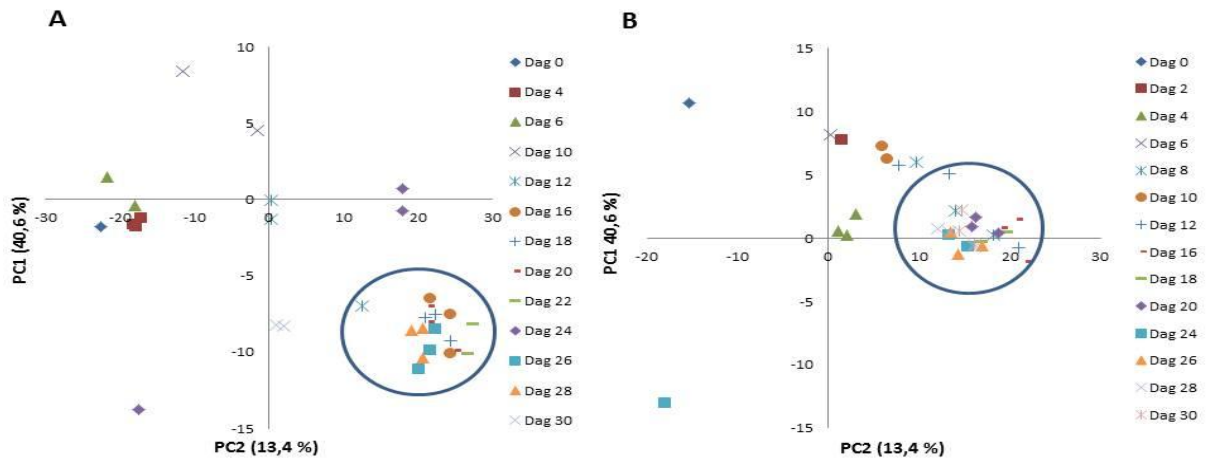
Sekvensene analyseres i PCA (Principal Component Analysis), og et biplot beskriver grupperingene m.h.p. prøve og variabel (jf. Figur 3.11). Den første komponenten (PC1) står for så mye av variasjonen i datasettet som mulig, mens PC2 vil ha den nest høyeste variasjon. PC3 har minst variasjon av komponentene benyttet i denne oppgaven. Punkter i nærheten av hverandre representerer prøver med lignende spekter, og ansees dermed som en subgruppe innen datasettet.



Figur 3.11. Likheter mellom ulike komponenter i en PCA-analyse. Ved å se på forholdet mellom flere komponenter, er klassefisering av ulike subgrupper mulig. PC1 har maksimum variasjon mellom komponentene, og forklarer dermed mest. PC2 har noe lavere variasjon, mens PC3 har minst. PC1 mot PC2 -plottet (A) viser den beste grupperingen av prøver fra ulike batchreaktorene. Den korte avstanden mellom punktene innenfor subgruppene (markert med sirkel) indikerer svært like prøver. (Prøver som havner på posisjon rundt 0,0 er sekvenseprofiler som ikke passer inn i noen grupperinger, og de forteller dermed ingen ting.) Seriene består av følgende ratio av hhv. storfegjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %.

Gruppering av prøver fra ulike bioreaktorer sees i begge biplottene, markert med sirkler. PC1/PC2 (A) viser grupperinger av alle fire reaktorseriene av blandingsforhold, men med noen avvikende punkter. Prøvene i serie 3 og 2 viser tette grupper, som tyder på svært like profiler mellom prøver av samme substratblanding. Subgruppene for serie 1 og serie 4 er ikke like definerte.

For identifisering av de avvikende punktene, ble alle prøvene fra de enkelte blandingsforholdene fremstilt i et eget biplott, jf. Figur 3. 12, med separering med hensyn på respektive dager i forsøksperioden. I figuren under fremstilles prøver av batchreaktorene fra serie 2 (A) og serie 3 (B). Biplottene viser en trend til at sene prøver har en større likhet mellom spektrene. Prøver fra de første dagene faller derimot litt utenfor.



Figur 3. 12. Tidsavhengig gruppering av prøver fra batchreaktorer i serie 2 (A) og serie 3 (B). Subgrupper markert med sirkel tilhører prøver tatt ut fra batchreaktorene etter inkubering i dag 16 og utover. De fleste avvikene representerer derimot prøver fra forsøksperiodens tidlige fase (med noen unntak). (I noen tilfeller uteblir punkter for visse dager, da det ikke finnes verdier/data for vedrørende prøver.)

Av biplottene kan se ut som at det forekommer tendenser til konvergent utvikling i batchreaktorene i serie 2 og serie 3, der det mikrobielle samfunnet i de parallelle batchreaktorene utvikler seg mot den samme profilen, til tross for ulikheter i utgangspunktet. At de fire ulike blandingsene opptrer i hver sin subgruppe, indikerer at dette er en miljøavhengig prosess. En fremstilling av serie 4 viste et lignende bilde (ikke vist her), mens denne trenden ikke kunne observeres for serie 1.

Sekvensene til 8 MCR-komponentene fra Sanger-sekvenseringen klassifiseres, basert på RDP-databasesøk med en lav terskelverdi (50 %), hvorav 2 bakterielle slekter innen fylumet Firmicutes identifiseres jf. tabell 3. 2. De øvrige komponentene oppgis som uklassifiserte bakterier (5 stk.) eller uklassifiserte Clostridiales (1 stk.).

Tabell 3. 2 Et RDP-databasesøk av de 8 MCR-komponentene ga totalt 2 treff på slektsnivå. Av resterende komponenter klassifiseres 5 som uklassifiserte bakterier, og den siste som uklassifisert Clostridiales.

Fylum	Klasse	Orden	Familie	Slekt
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Sporacetigenium</i>
			Clostridiales inc. sed	<i>Sporanaerobacter</i>

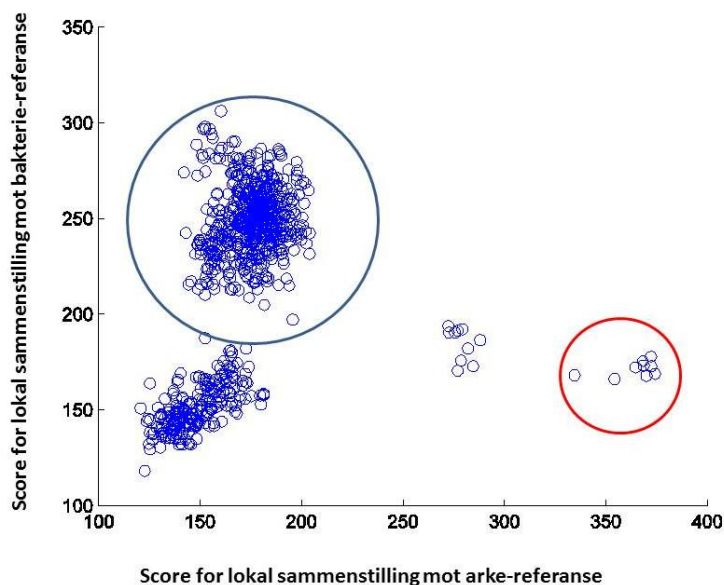
Resultatene fra klassifisering av MRC indikerer en lav diversitet. Samtlige (2 klassifiserte og 1 uklassifisert) treff på ordennivå tilhørte Clostridiales (fylum Firmicutes). Det var ingen treff for arker.

Basert på likheter fra RDP-søk ble MCR-komponenter fra Sanger-sekvenseringen sammenstilt med tilsvarende OTU definert fra Illumina-sekvensene. Sammenstillingene viste svært liten/ingen korrelasjon mellom sekvensene.

3.5.2 Dybdesekvensering

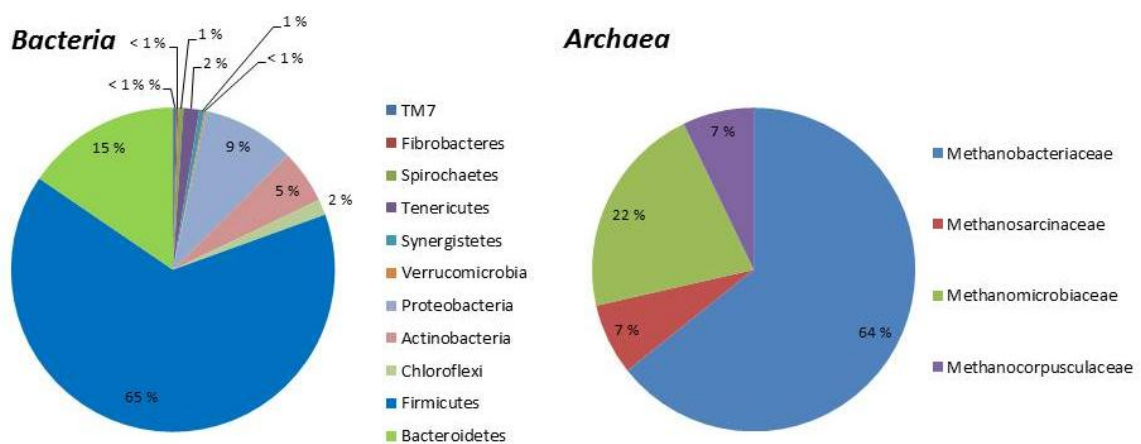
Fra dybdesekvenseringen oppnås i overkant 5 millioner sekvenser med en leselengde på 150 basepar. Til sammen ble 869 unike OTUer (med en terskelverdi over 100 sekvenser) definert, basert på adenin-cytosin mønsteret i sekvensene.

I en parvis sammenstilling ble distansen mellom to referansesekvenser (en for arker og en for bakterier) og OTU-sekvensene beregnet. I Figur 3. 13 fremstilles grupperinger av OTU sekvenser basert på denne sammenstillingen.



Figur 3. 13 Grupperingen av OTU sekvenser. Ulike grupper defineres i et biplott, der OTU innen rød ring trolig er arker, blå ring er bakterier. Det observeres også en del støy (gruppering utenfor sirkler).

Grupperingene i biplottet indikerer en stor andel bakterielle enheter, totalt 689 ulike OTUer. OTU innenfor rød sirkel tilhører arkeadomenet, og det detekteres i alt 19 ulike enheter for denne gruppen. Av disse identifiseres 17 OTUer til Euryarchaeota, hvorav 14 klassifiseres (~2,8 % av total prokaryot OTU forekomst). I tillegg observeres en del støy, trolig på grunn av uspesifikk amplifisering. Et RDP-databasesøk av de ulike OTU sekvensene ble utført, med konfidensnivå på 50 % sekvenslikhet. Forekomst av ulike OTUer ble benyttet for en estimering av den totale diversiteten av bakterier og arker i batchreaktorene i dette forsøket. Diversiteten fremstilles i Figur 3. 14, der forekomsten av ulike bakterier vises på fylumnivå, mens arker presenteres på familienivå.

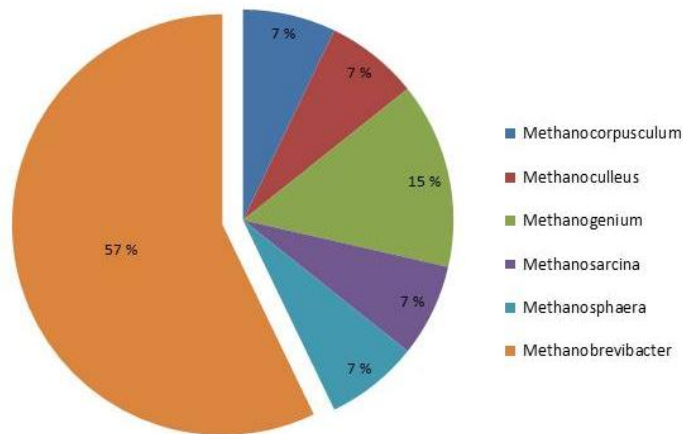


Figur 3. 14. Den totale diversiteten i batchreaktorene, basert på forekomst av ulike OTUer. Diversiteten er beregnet ut fra sekvenstreff (med 50 % konfidensintervall) i RDP-databasen. Bakteriene er her klassifisert i fylum (sektordiagram t.h.) mens de ulike gruppene av arker (t.v.) defineres på familienivå. (TM7 er en bakteriell avstamning, i nær slekt med Chloroflexi.)

Til tross for en svært variert representasjonen av *Bacteria*-domenet, var de ulike OTUene distribuert på kun 11 fylum. Firmicutes var det mest dominerende fylumet, representert med 65 % av totalt antall bakterielle OTUer. Også Bacteroidetes, Proteobacteria og Actinobacteria hadde relativ høy forekomst, med respektive 15 %, 9 % og 7 % av OTUene.

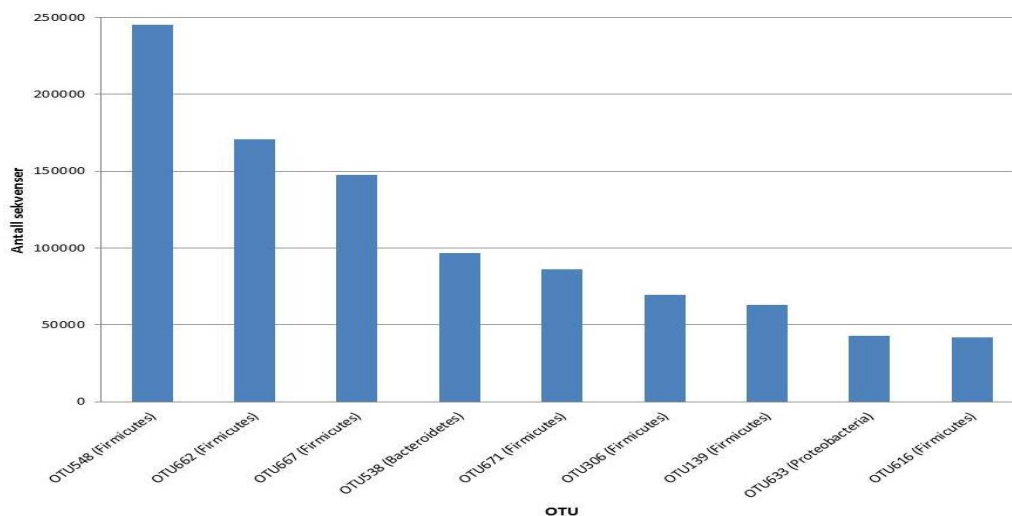
Som det fremgår av fremstillingene over, var den arkeale diversiteten begrenset i forhold til bakterier. Av arker er Methanobacteriaceae mest dominerende, representert med 64 % av total arke-OTU forekomst. Methanomicrobiaceae og Methanocorpusculaceae tilhører ordenen Methanomicrobiales, sammen utgjør den nest største arkeale gruppen (29 %). Dette betyr at CO₂/H₂-utnyttende arker dominerer over acetotrofe, som bare utgjør 7 % (jf. Methanosarcinaceae).

En dypere klassifisering av arkene viser at Methanobacteriaceae i hovedsak representeres av slekten Methanobrevibacter, jf Figur 3. 15. Methanosphaera, et annet medlem av Methanobacteriales, var også tilstede, men i mindre grad. Methanosarcina er eneste representant for acetotrofe metanogener.



Figur 3. 15 OTU-forekomst av metanogener på slektsnivå. Methanobrevibacter og Methanosphaera representerer reaktorenes dominerende familie: Methanobacteriaceae. Methanocorpusculum, Methanogenium og Methanoculleus er slekter innen Methanomicrobiales, som sammen utgjør den nest største metanogene gruppen. Methanosarcina, som eneste acetotrofe metanogen, er underrepresentert i batchreaktorene.

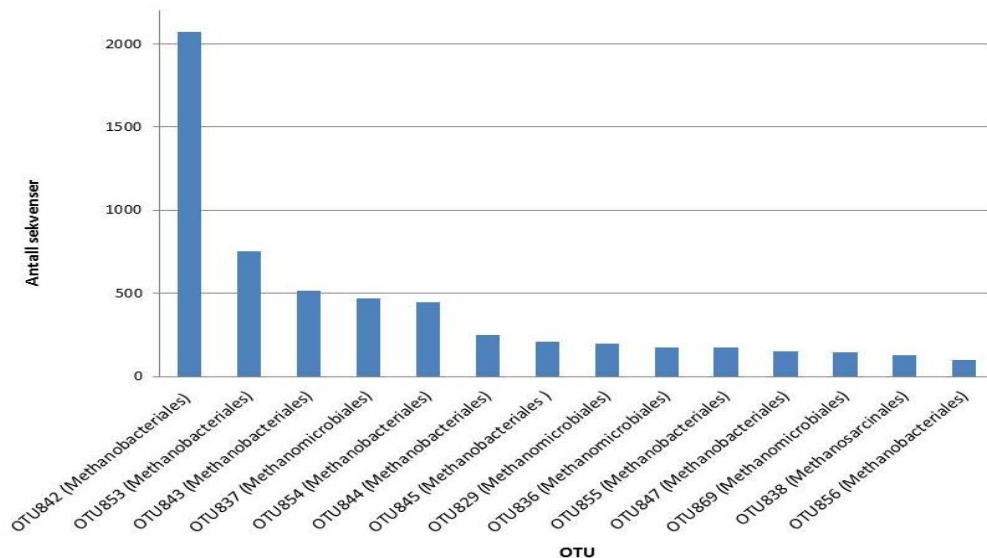
Selv om det observeres lav forekomst av ulike taksonomiske grupper for bakterier og arker (hhv. på fylum- og familienivå) i batchreaktorene, var antall sekvenser innen hver OTU relativt høy. I Figur 3. 16 fremstilles forekomsten av de 9 mest dominerende OTUene innen bakteriedomenet.



Figur 3. 16. Antall sekvenser innenfor de 9 mest dominante bakterie- OTUene. Fra RDP-databasesøk klassifiseres OTUene, her vist på fylumnivå bak respektive OTU nummer.

De fleste sekvensene ble identifisert til å stamme fra diverse taksonomiske grupper innen fylumet Firmicutes, der Clostridia ble observert som den mest dominerende klassen. For detaljer om bakterie-OTUer med over 1000 sekvenser henvises det til vedlegg A.4.

Arkene viste en lavere diversitet. Med hensyn på antall sekvenser innen hver OTU, ble Methanobacteriaceae observert som en svært dominerende familie. Dette samsvarer med diversitet på OTU nivå (jf. Figur 3. 14). I Figur 3. 17 fremstilles forekomsten av sekvenser innen hver OTU. Her fremgår det at Methanobacteriales er den desidert mest dominante ordenen i våre batchreaktorer. Også Methanomicrobiales og Methanosarcinales er representert. En detaljert taksonomisk oversikt over alle arke-OTUer foreligger som vedlegg, jf. vedlegg A.4.



Figur 3. 17. Antall sekvenser innenfor arke- OTUene. Fra RDP-databasesøk klassifiseres OTUene, her vist på ordnenivå bak respektive OTU nummer.

Flere arkesekvenser klassifiseres også som den acidofile ordenen Thermoplasmatales. Men fordi sekvensidentiteten for de tilhørende OTUene var lavere enn 50, utgår de fra fremstillingen. Svært korte sekvenser kan være årsaken til lav identitet, og tilstedeværelsen av Thermoplasmatales kan likevel ikke utelukkes.

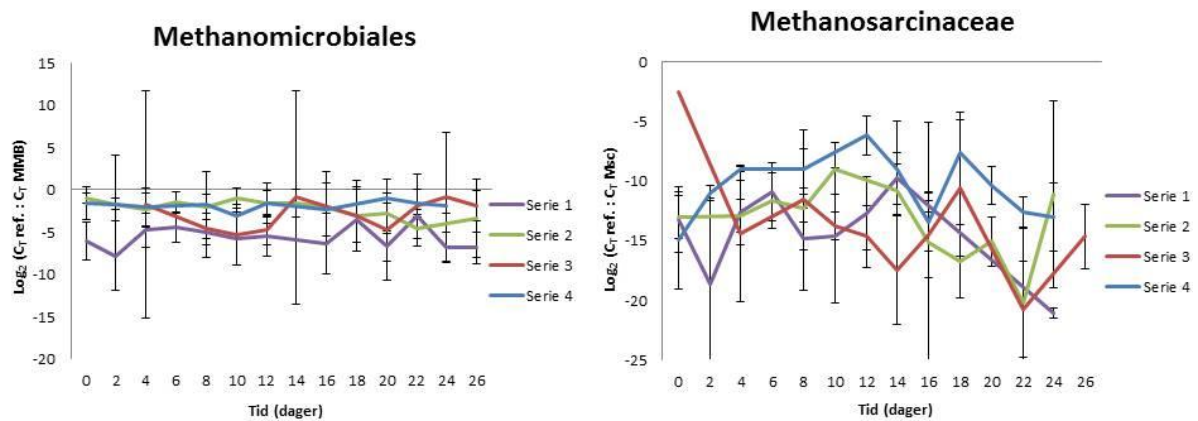
Tilstedeværelsen av arker, samt de mest dominerende bakteriene, ble studert med hensyn på endring over tid. Det ble ikke observert suksesjon i noen av batchreaktorene gjennom perioden på 30 dager, hverken for de mest dominerende bakterie-OTUene eller arke-OTUer.

3.6 Det relative forholdet mellom andel bakterier og arker

En relativ kvantifisering av ulike fylogenetiske grupper ble benyttet for beregning av forholdene mellom bakterier og arker, både med hensyn på effekt av ulike blandingsforhold og endring over en 30 dagers periode.

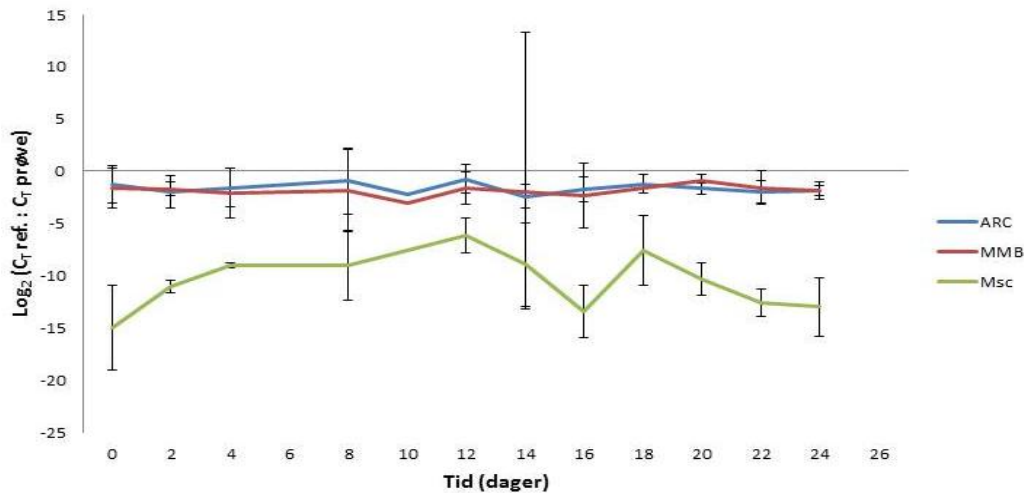
På bakgrunn av en regresjonsanalyse ble det bestemt det at de høyere fylogenetiske ordenene (PRK - og ARC- primersett) detekteres med den DNA-bindende fargen EvaGreen. Ved mer spesifikk detektering (MMB- og Msc-primersett) ble en fluoriserende probe (TaqMan) som hybridiserer til målsekvensen benyttet. LinRegPCR ble benyttet for rekalkulering av PCR reaksjonseffektivitet i hver prøve. Flere av prøvene inneholdt lave konsentrasjoner av primerens målsekvens, og gav derav svake signaler. Kombinert med en høy, fluorescerende bakgrunnsstøy, var automatisk detekteringen av basislinjen ikke mulig ved flere tilfeller. Dette gjaldt særlig for amplifisering med hybridiserende probe, fordi fluorescenssignalene vil akkumulere i en slik reaksjon. For de gjeldene prøvene ble basislinjen derfor bestemt manuelt.

Det ble ekstrahert duplikate prøver av hver batchreaktor, og genomisk DNA med tilsatt syntetisk DNA ble amplifisert i qPCR-reaksjoner. Den interne kontrollen i hver prøve ble benyttet som referanse for beregning av forholdet mellom de metanogene gruppene. Figur 3. 18 viser forskjeller i tilstedeværelsen av Methanomicrobiales og Methanosarcinaceae i de ulike blandingsforholdene.



Figur 3. 18 En relativ kvantifisering viser tilstedeværelsen av Methanomicrobiales (t.v.) og Methanosarcinaceae (t.h.) i de fire ulike batchreaktorene. Det relative forholdet er gitt som Log_2 av forholdet mellom C_T verdien til referansen og C_T verdien til amplifisert målsekvens. Verdiene for hver serie representerer et gjennomsnitt av 3 parallelle flasker. Det observeres ulikheter med hensyn på substrat, men det sees ingen markant forandring over gitt tidsperiode. Seriene består av følgende ratio av hhv. storfe gjødsel:fiskeensilasje: Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 %.

Resultatene viste at serie 4 generelt inneholdt størst andel av både Methanomicrobiales og Methanosarcinaceae. Fra en sammenligning mellom de to fremstillingene, observeres den relative mengden av Methanomicrobioales som høyere enn Methanosarcinaceae for samtlige reaktorer. Dette vises også i Figur 3. 19, der forholdet mellom de to metanogene gruppene fremstilles for batchreaktorserie 4 (gjennomsnitt av 3 parallelle flasker).



Figur 3. 19 Relativ mengde av Methanomicrobiales (MMB) og Methanosarcinaceae (Msc), samt arker generelt (ARC) i batchreaktorserie 4. Mengden beregnes fra forholdet til en referanse, og fremstilles i Log₂ – skala.

En sammenligning av kurvene viser at mengden av arker ligger lavere enn forventet, siden ARC- primeren skal være universal. Denne underestimeringen kan trolig begrunnes med at probebasert qPCR er mer sensitiv enn detektering med DNA-bindende farge. Det observeres ingen merkbar forandring gjennom perioden, hverken i Figur 3. 18 eller Figur 3. 19.

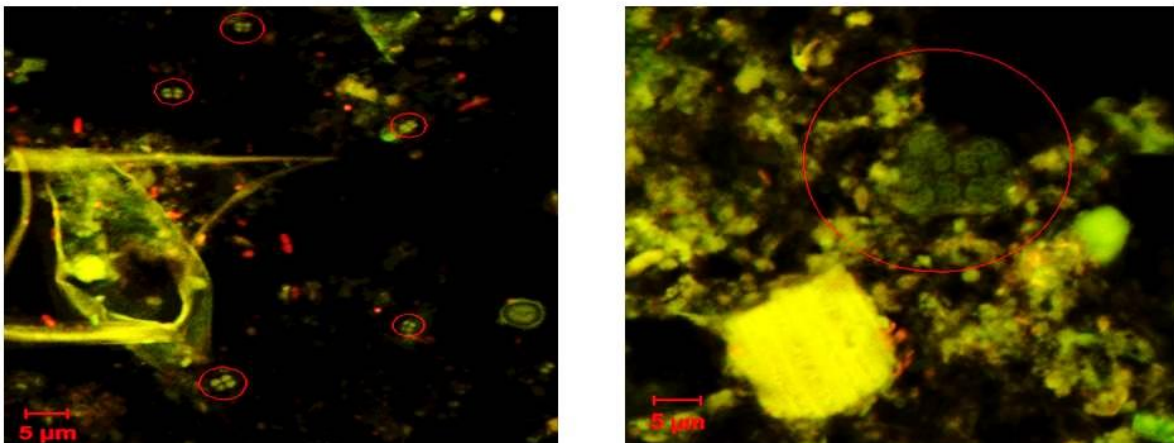
3.7 Visualisering av mikrobielle celler ved bruk av *fluorescence in situ hybridization* (FISH)

To hybridiserende prober, EUB338 og ARC915 modifisert med ulike fluorescerende molekyler, ble benyttet for identifisering av henholdsvis *Bacteria* og *Archaea*. Probene var homologe med 16S sekvenser på representative domener, og hybridiserer dermed bare til (ribosomalt) aktive celler. Hensikten var å beregne det relative forholdet mellom andelen bakterielle celler og arker, i tillegg til identifisering av celler utfra deres morfologi. Fordi FISH ble utført av prøver fra de samme reaktorene over gitt tidsperiode, kunne resultatene også gi et innblikk i dynamikken i mikrobiotaen over tid.

På grunn av mye bakgrunnsstøy ble reaktormaterialet fortynnet. Basert på observasjonene fra mikroskopering av en fortynningsrekke, ble en 10⁻¹ fortynning benyttet. Løsningen gav

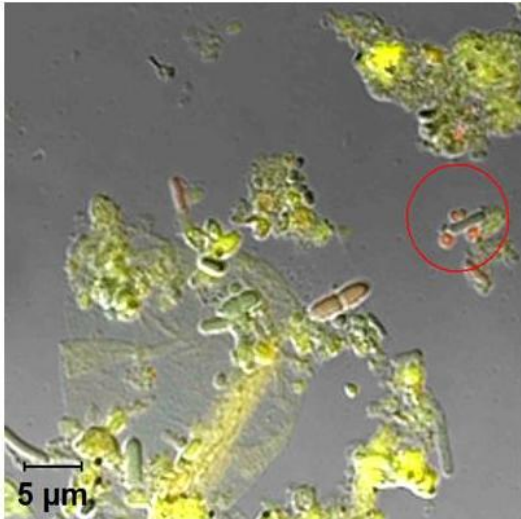
likevel fortsatt store mengder bakgrunnsstøy av organisk materiale. Materialet avga grønt autofluorescenssignal, og skapte dermed problemer for identifisering av cellulære strukturer blant støy. Av det generelle helhetsbildet fra SEM-mikroskopering sees mange celler, men bare en liten fraksjon var fluorescerende. Disse faktorene gjorde kvantifisering svært vanskelig, og det ble besluttet å konsentrere seg om identifisering av enkelceller ut fra karakteristisk morfologi (*Methanosarcina* spp.), samt forsøke å se om trender forandret seg gjennom perioden (30 dager).

Det ble observert pseudosarcina-strukturer i alle reaktorene. Forekomsten varierte, og bakgrunnsstøy gjorde detektering vanskelig. Bildene under (jf. Figur 3. 20) viser typiske pseudosarcina-strukturer. Det er nærliggende å anta at disse cellene tilhører *Methanosarcinaceae*, til tross for at dybdesequenseringen viste lav forekomst av denne metanogene gruppen.



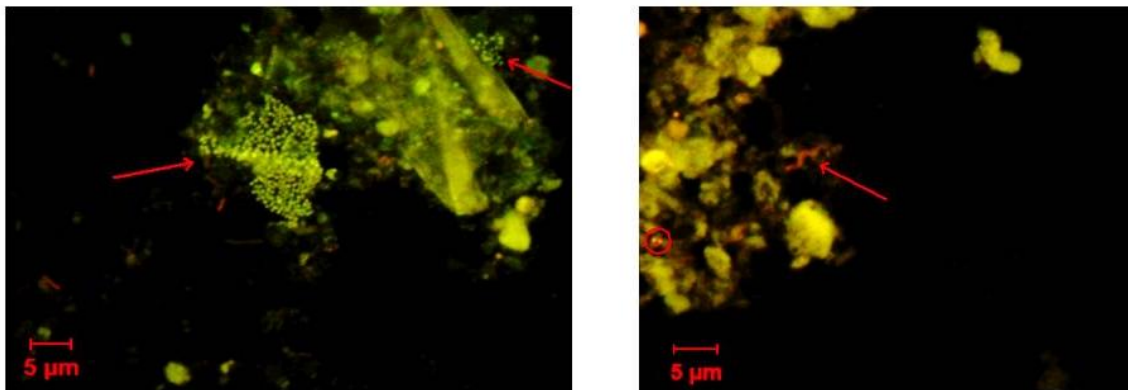
Figur 3. 20. FISH bilder over viser typiske pseudosarcina-strukturer, som er den dominerende morfologien til metanogene arker innen familien *Methanosarcinaceae*. Sarcina-aggregater ble i varierende grad observert i alle fire batchreaktorblandingene, og forekom som enkeltaggregater (jf bildet t.v. av reaktor 4.1, uke 1.) eller i større samlinger (jf. bildet t.h. fra reaktor 2, uke 3). Størrelsesanvisning er gitt på bildet.

Det ble det observert staver med grønn fluorescens med svært nærliggende bakterielle celler. Figur 3. 21 viser et slikt tilfelle, der fire bakterielle kokker ligger svært nær en stavcelle med ARC915-hybridisering. Lignende assosiasjoner ble også observert i andre reaktorer.



Figur 3. 21. Arke med nærliggende bakterielle celler. Ved flere tilfeller ble bakterielle celler observert i nær relasjon til arker. Dette bildet er tatt fra reaktor 2 (uke 1), og viser en slik forbindelse (rød sirkel). Flere metanogene og syntofiske bakterier er avhengige av hverandres metabolisme, og vil derfor forkomme i nær assosiasjon til hverandre. Den korte fysiske avstanden mellom cellene kan også komme av tilfeldigheter, og sikre konklusjoner om observert syntrofi kan ikke trekkes.

Også andre cellulære strukturer ble observert, deriblant staver av ulik størrelse og probehybridisering, kokker og diplokokker, samt et fåtall spiralformede komponenter. FISH-bildet under (Figur 3. 22, t.h.) viser en større samling av kokkoide celler med ARC915 fluorescenssignal. Spirosheta-strukturer, jf. Figur 3. 22 (t.v.) ble også observert ved noen tilfeller.



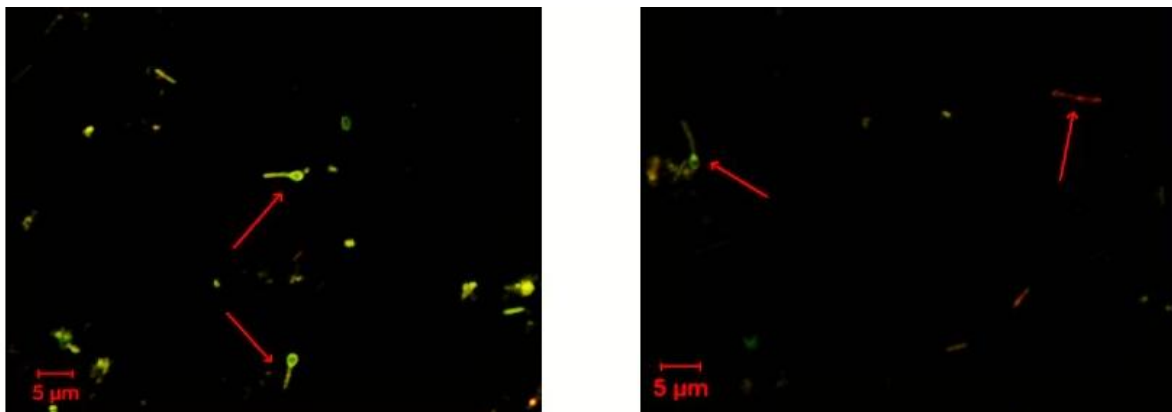
Figur 3. 22 FISH-analyse. Bildet til venstre viser en samling kokkoide arker fra reaktor 4, uke 3. Bildet til høyre illustrerer observerte spiroshetastrukturer, her markert med rød pil. Sistnevnte er fra reaktor 1, uke 3. Det ble også observert spirosheta med grønt fluorescenssignal. Størrelsesanvisning er gitt på bildene.

I reaktor 1.1 (40 % storfegjødsel: 60 % fiskeensilasje, av 100 % substrat) storfegjødsel og sees generelt få organismer, og de fleste cellene hybridiserer i tillegg dårlig. Av celler som observeres, er de fleste bakterielle kokker og diplokokker, i tillegg til noen få spiraler, (Figur 3. 22), som ser ut til å hybridisere begge probene. Methanosarcina er nærmest fraværende i preparatet fra den første uken, mens det observeres flere pseudosarcina-aggregater i den fjerde (og dermed siste) uken. De fleste av disse hybridiserer derimot ikke, eller svært dårlig.

I preparater fra reaktor 2.1 (60 % storfe gjødsel: 40 % fiskeensilasje, av 100 % substrat) ble celler med bacillus-morfologisk struktur (ca. 5 μm lange) observert, hvorav noen få som diplobacilli. De fleste av disse avgir grønn fluorescens, som indikerer arkeale celler.

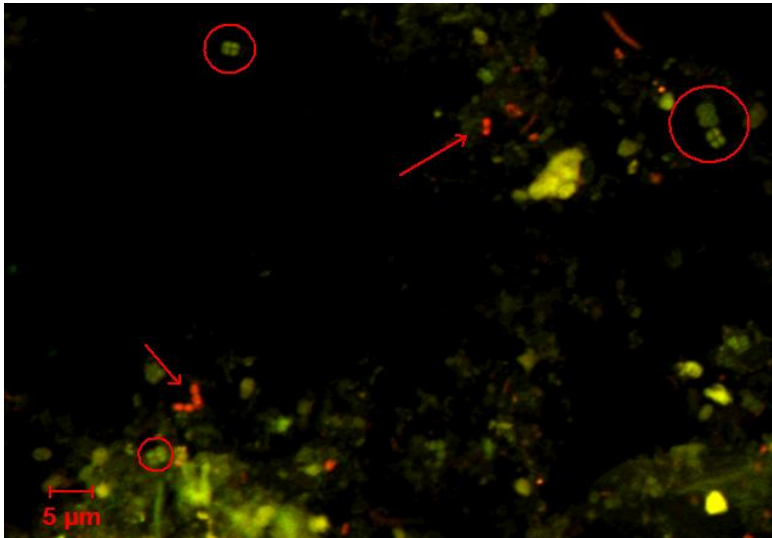
Tilstedeværelsen av celler med stavstruktur foreligger i hele perioden, men observasjoner viser en trend til økt antall i forsøkets andre uke. I tillegg til økt antall staver, ser det ut til at flere av stavcellene i uke 2 sporulerer (jf sporulerende staver fra reaktor 3, Figur 3. 23). Denne strukturtypen viste dårlig hybridisering. I uken etter (uke 3) er færre av stavene assosiert med en sporelignende kule, samtidig som flere løse kuler observeres. Bakterielle diplokokker går også igjen gjennom hele perioden i reaktor 2. Det observeres få Methanosarcina-aggregater i denne reaktoren, men fordi strukturene var vanskelige å separere fra bakgrunnsstøy kan tilstedeværelsen være underestimert.

Allerede den første uken viste reaktor 3 (80 % storfe gjødsel: 20 % fiskeensilasje, av 100 % substrat) strukturer som minner om sporulering. I motsetning til reaktor 2, det alle hybridiserte til EUB338 probe, hybridiserer en andel av disse stavene til ARC915 proben (Figur 3. 23). Den samme trenden ble også observert i preparater fra uke 2 og 3.



Figur 3. 23. FISH bilder fra reaktor 3.1, uke 1. Bildene viser sporulerende staver. I bildet til venstre hybridiserer ARC- proben til begge celle, som dermed fluorescerer grønt. Dette er det dominerende mønsteret i alle preparatene med sporulerende celler. På bildet til høyre, fluorescerer to like, sporulerende staver til hver sin probe. Dette ble observert ved et par tilfeller.

Det observeres relativt mange arker med stavstruktur (3-4 μm). Både arker og bakterier med kokkoid morfologi forekommer hyppig, og tilstedeværelsen av bakterielle diplokokker er gjennomgående for hele perioden (hybridiserte bakterielle diplokokker, samt celler med pseudosarcina-struktur vises i Figur 3. 24)



Figur 3. 24. FISH-analyse av preparat fra reaktor 3.1, uke 1. Dette bildet viser både pseudosarcina celler (med rød ring) og bakterielle diplokokker (rød pil).

Reaktor 4 (100 % storfegjødsel) viser en stor andel hybridiserte *Methanosarcina* fra den første uken. Det ser også ut til at preparatet inneholdt flere stavbakterier og bakterielle kokker, ofte diplokokker, enn de andre reaktorene.

Preparatene fra de andre ukene er generelt dårlige, eller inneholder mye støy. *Methanosarcina* observeres fortsatt, men en mindre andel hybridiserer. Det samme gjelder de bakterielle stavene og kokkene. Det er vanskelig å si om grunnen til den lave hybridiseringseffektiviteten kommer av tekniske feil ved hybridiseringen, eller fordi aktivitetsnivået til cellene har avtatt.

4. Diskusjon

En grundig forståelse av den anaerobe nedbrytningsprosessen av organisk materiale til biogass er viktig for å oppnå et maksimalt utbytte av metanpotensialet til ulike avfallsmaterialer. Tidligere arbeid har i hovedsak basert seg på identifisering av metanogene arker i biogassanlegg med storfegjødsel iblandet co-substrater som matavfall, mais og kornavlinger (Leclerc et al. 2004; Nettmann et al. 2008; Nettmann et al. 2010; Souidi et al. 2007). Det er derimot utført lite forskning på fiskeensilasje som substrat. Det finnes også lite publisert arbeid rundt utviklingen av det mikrobiologiske samfunnet i biogassreaktorer over tid, og sammenhengen mellom mikrobiell tilstedeværelse og gassproduksjon over en 30-dagers periode ble derfor forsøkt avdekket.

Dataene presentert i denne oppgaven gir en karakterisering av det mikrobielle samfunnet med hensyn på substrat og temporal utvikling, samt gassproduksjon i batchreaktorer med varierende ratio mellom mengde ensilert fiskeavfall og storfegjødsel. Det ble blant annet funnet at batchreaktorer med høyt innhold av fiskeensilasje produserte lite gass, og mulige årsaker til dette er diskutert i det kommende avsnittet. Oppnådde resultater fra karakteriseringen av det mikrobiologiske samfunnet er også diskutert, i tillegg til tolkningen av observasjonene fra FISH. Det ble også observert en konvergent utvikling av mikrobiotaen med hensyn på substratblanding, og forslag til mulige forklaringer på denne strukturendringen er derfor også diskutert. Til slutt er noen av metodene og det utførte arbeidet kort evaluert, for å gi en pekepinn på hva som fungerte og hva som bør endres ved videre arbeid.

4.1 Gassproduksjon og andel metan varierte med hensyn på ulike blandingsforhold av storfegjødsel og fiskeensilasje

Storfegjødsel og fiskeensilasje har svært ulik biotilgjengelighet, bl.a. på grunn av innhold av fett, proteiner og karbohydrater. Mens mye forskning basert på metanpotensialet til ulike typer storfegjødsel er publisert (Amon et al. 2007; Angelidaki & Ahring 2000; Hartmann & Ahring 2005; Lehtomäki et al. 2007; Møller et al. 2004b; Nielsen et al. 2004), er litteratur på metanproduksjon fra fiskeavfall utilstrekkelig. På grunn av stort fettinnhold, har fiskeavfall i teorien et større biokjemisk metanpotensiale enn storfegjødsel. Studier har derimot demonstrert et lavt metanutbytte ved anaerob nedbrytning av fiskeavfall, fordi en ubalanse i systemet fører til akkumulering av flyktige fettsyrer (VFA) og lange fettsyrekjeder (LCFA), i tillegg til store mengder ammoniakk.

En tidligere analyse (utført av Eurofins i 2010 på oppdrag av Jon Fredrik Hanssen) av substratene benyttet i dette forsøket viste at fiskeensilasje inneholdt 19 % råfett og 14,1 % protein (N x 6,25). Storfegjødsel inneholdt betydelig mindre mengder; 0,6 % råfett og 0,3 % protein. (Hele analyserapporten foreligger som Vedlegg E). Til tross for mye energirikt fett, produserte batchreaktorene med stor andel fiskeensilasje (over 40 %) svært lav eller ingen biogass, og metanutbyttet avtok med økende innhold av organisk tørrstoff. De store mengdene av fett og proteiner i fiskeavfallet kan ha resultert i en akkumulering av hhv. organiske syrer og ammoniakk fra fermenteringsprosessen. Den mest sannsynlige årsaken er likevel at det sure miljøet (gitt til pH 4,5), som et resultat av ensileringen, var ugunstig for det mikrobielle samfunnet i bioreaktorene. I batchflaskene som lutes for å øke pH, ble det derimot produsert gass. Dette er en observasjon som kan være riktig å studere videre, med hensyn på økonomiske utgifter i forhold til utbytte av fiskeensilasje som substrat i biogassanlegg.

Heller ikke reaktorer med 60 % storfegjødsel og 40 % fiskeensilasje produserte metangass i løpet av forsøksperioden. Denne substratblandingen hadde derimot en relativt høy produksjon av karbondioksid per kg organisk tørrstoff, noe som gir en indikasjon på mikrobiologisk aktivitet. CO₂ er et av hovedproduktene fra acetogenesen, og dannes gjennom anaerob oksidasjon utført av blant annet en rekke *Clostridium*-arter og medlemmer av slekten *Syntrobacter*. At karakteriseringen av den bakterielle delen av reaktorsamfunnet viste stor tilstedeværelse av Clostridia-medlemmer, kan være en forklarende årsak til høy spesifikk CO₂-produksjon.

Batchreaktorene i serie 3 var (med unntak av enkeltflasker) de mest aktive gassprodusentene, men med lav andel metangass. Variasjoner innad i de parallelle batchreaktorene oppstod av ukjent grunn. Prøveopparbeidelsen var grundig, og ble foretatt etter samme prosedyre som de andre reaktorene, som viser relativt god korrelasjon mellom parallellene. Sprikende resultater kan alternativt ha oppstått ved at tilfeldigheter har favorisert veksten av ulike typer metanogener, som dermed påvirket mengde gass produsert. Det samme resultatet ble observert ved en reprodusert inkubering av det samme blandingsforholdet.

Det høyeste biogassutbyttet ble oppnådd i reaktorer uten tilsatt fiskeensilasje; batchreaktorer i serie 4 produserte i overkant av 140 liter metan per kg. organisk tørrstoff i perioden på 101 dager. Dette var også den substratblandingen med høyest pH (pH 8), nær optimum for methanogene mikroorganismer. Dette viser at en forbehandling av fiskeavfallet trolig er nødvendig før det kan benyttes i biogassanlegg.

For serie 2 og serie 3 observeres en økning i spesifikk gassproduksjon for flasker som ble åpnet annenhver dag, sammenlignet med uåpnede. Både spesifikk metanproduksjon og karbondioksidproduksjon var derimot lavere i åpnede reaktorer. Denne skjevheten har trolig oppstått ved tilførsel av små mengder oksygen, knyttet til åpningen av serumsflaskene. Optimalt ville uttakene blitt foretatt uten oksygen tilgjengelig; under kontrollerte anaerobe forhold, eller uten direkte åpning av serumsflaskene. På grunn av store mengder partikulært materiale i storfegjødsel, var ikke uttak uten åpning av membranen mulig. Åpning av flaskene i et anaerobt kammer med kontrollert sammensetning av gasser ville hindret en oksygentilførsel til flaskene, men tilgjengeligheten til en anaerob hanskeboks gjorde dette alternativet vanskelig å gjennomføre. Luft i flaskene ble derimot evakuert med nitrogengass umiddelbart etter åpning for å skape en anaerob atmosfære (fravær at oksygen ble bekreftet ved gasskromatografi). Nitrogen i seg selv er ikke en reaktiv gass, og har ingen kjent påvirkning på mikroorganismenes metabolske aktivitet. Det ser likevel ut til at evakuering med nitrogengass etter åpning ikke var tilstrekkelig for å oppnå et stabilt anaerobt miljø.

4.2 Biomassens innhold av flyktige fettsyrer kunne ikke bestemmes

Tilstedeværelsen av flyktige fettsyrer kan ofte gi en god indikasjon på systemets stabilitet (Ahring et al. 1995), og flere forsøk har vist at en akkumulering av bestemte fettsyrer oppstår ved ammoniumhemming (Ahring et al. 1995; Hill & Holmberg 1988; Nakakubo et al. 2008). Dette vil særlig være nyttig ved bruk av proteinrike substrater, som for eksempel fiskeavfall (14 % protein). En overbelastning av systemet oppstod for prøver fra reaktorer med fiskeensilasje, og en optimalisering av HPLC-metoden for fiskeavfall som substrat vil derfor være nødvendig for videre arbeid.

4.3 Noen få, men svært dominerende mikrobiologiske grupper

Som nevnt i innledningen, har sammenligninger av mesofile og termofile reaktorer vist et generelt større mikrobielt mangfold ved temperatur rundt 35 °C. Resultater fra tidligere forsøk har demonstrert at den bakterielle diversiteten i denne type økosystem er vid, til tross for at de fleste sekvensene tilhører noen få, svært dominerende grupper (Godon et al. 1997).

Diversiteten blant arker er derimot rapportert som lavere (Godon et al. 1997; Sekiguchi et al. 1998), og ofte utelukkende bestående av arter tilhørende fylumet Euryarchaeota (Leclerc et al. 2004; Sekiguchi et al. 1998). At diversiteten blant bakterier er funnet større enn for metanogene, kan trolig forklares med at den bakterielle massen i en anaerob nedbrytning benytter seg av mange ulike substrater, mens de metanogene arkene har spesialisert seg mot utnyttelsen av noen få forbindelser. Leclerc et al. (2004) demonstrerte også tendenser til at

fordelingen av arkeale arter var avhengig av reaktorprosessen som ble benyttet i anleggene. En lav diversitet blant arker ble også observert i denne studien, der kun 14 ulike OTUer ble identifisert til ulike klasser innen Euryarchaeota.

Som nevnt innledningsvis, er den acetotrofe metanogenesen tradisjonelt ansett som den viktigste synteseveien for metanproduksjon. Nyere studier strider derimot med denne påstanden, og CO₂/H₂ – utnyttende metanogener er ved flere tilfeller funnet som dominerende i bioreaktorer. Blant annet har Nettmann et al. (2008) konkluderte med at hele 70 % av de arkeale sekvensene isolert fra reaktorer bestående av storfegjødsel og maisensilasje, tilhørte den hydrogenotrofe ordenen Methanomicrobiales. Også andre taksonomiske grupperinger av mikrobielle samfunn i bioraktorer har indikert at Methanomicrobiales var dominerende, mens acetotrofe metanogener tilsynelatende spilte en mindre viktig rolle (Jaenicke et al. 2011; Krause et al. 2008; Kröber et al. 2009). At ulike anaerobe økosystem favoriserer vekst og etablering av spesifikke hydrogenotrofe eller acetotrofe organismer kan være en forklarende faktor til sprikende forskningsresultater. Med tilstedeværelsen av syntrofiske acetat-oksiderende bakterier (som for eksempel ulike *Clostridium* – arter) vil acetat alternativt bli utnyttet som hydrogenkilde for dannelsen av CO₂, som videre konverteres til metan av hydrogenotrofe metanogener (Schnürer et al. 1996; Schnürer et al. 1999).

Også resultatene fra dette forsøket indikerte at hydrogenotrofe organismer stod for det meste av metanproduksjonen. Men i motsetning til funnene fra studier som Krause et al. (2008) og Kröber et al. (2009), var Methanobacteriales den absolutt mest dominerende metanogene organismen, og representerte 64 % av total arkeal OTU forekomst. Den acetotrofe metanogenesen så derimot ut til å spille en mindre viktig rolle i batchreaktorene presentert i denne studien, da bare en liten andel Methanosarcinales ble detektert (7 %).

Underrepresentasjonen av Methanosarcinaceae kan muligens forklares med deres intoleranse mot høye konsentrasjoner av ammonium, som kan ha akkumulert i reaktorene med mye proteinrikt fiskeavfall. Av Methanobacteriales-medlemmer viste Methanobrevibacter seg å være mest tilstedeværende, representert med 56 % av totalt antall arke OTUer. Arter innen denne ordenen sees som korte staver, eller coccibacillus-strukturer, og bruker H₂ eller formiat for reduksjon av CO₂ til CH₄ (Boone et al. 1993). Methanobrevibacter er vanligvis funnet i fordøyelsessystemet til pattedyr, og har tidligere blitt identifisert som en dominerende art i magen til bl.a. sau (Liu et al. 2012; Wright et al. 2004). Mens både Krause et al. (2008) og Kröber et al. (2009) konkluderte med at Methanoculleus trolig spilte en viktig rolle i

metankonverteringen i deres forsøk, representerte Methanomicrobiales bare 22 % av totalt antall arke-OTUer, og Methanoculleus var underrepresentert i prøvene i dette forsøket.

Årsaken til at ulike studier rapporterer om svært ulike sammensetninger av metanogene grupper, kan forklares med at den anaerobe nedbrytningen er en miljøstyrt prosess, der ulike organismer etableres med hensyn på substrat. Det er verdt å nevne at andre type substrater ble benyttet i de tidligere nevnte publikasjonene fra studiene til Nettmann, Krause og Kröber, noe som kan ha påvirket den mikrobielle sammensetningen. Et annet alternativ er at metodene som benyttes for isolering og amplifisering av DNA, favoriserer eller underestimerer ulike mikroorganismer. I dette forsøket ble en direkte, mekanisk lysis av cellene utført. En slik knusing av materialet vil ofte frigjøre hemmende substanser (V Wintzingerode et al. 1997), og enzymatisk lysis blir derfor typisk foretrukket. Dette gjelder blant annet for de omtalte forsøkene der Methanobacteriales var underrepresentert. En studie fra 2010 (Bergmann et al.) bekrefter at tilnærmingen til DNA isolering av metanogene arker har mye å si for utfallet. Med mekanisk lysis som eneste behandling var Methanobacteriales den absolutt dominerende metanogene orden (81-90 %). Dersom celleknusingen derimot ble basert på enzymatisk lysis (lysozyme/SDS-basert lysis), ble det motsatte mønsteret observert, med liten andel Methanobacteriales (14 – 18 %) og klar overrepresentasjon av Methanomicrobiales. Celleveggen hos medlemmer av Methanobacteriales inneholder pseudomurein (Kandler & König 1998), som er resistente mot de fleste lysozymer (Nakamura et al. 2006). For å knuse Methanobacteriales-celler er røff, mekanisk behandling derfor ofte den beste løsningen (Bergmann et al. 2010a; Weiss et al. 2007). Det er nærliggende å anta at dette er en mulig årsak til at Methanobacteriales ble observert som den dominante gruppen av arker i dette forsøket, mens Methanomicrobiales ofte refereres til som dominerende i forsøk der lysozymer er benyttet for cellelysis.

En analyse av et metagenom-datasett (basert på pyrosekvensering av bioreaktorprøver) fra 2011 (Jaenicke et al.), indikerte at Firmicutes var det rådende bakteriefylumet, i tillegg til en stor andel Bacteroidetes. Flere lignende publikasjoner har konkludert med tilsvarende resultater (Kampmann et al. 2012; Krause et al. 2008; Kröber et al. 2009). Også funnene fra dybdesekvenseringen i dette forsøket viste til samme trend i den bakterielle andelen av reaktorens mikrobiota. Totalt ble 689 ulike «molekylære arter» funnet innen *Bacteria*-domenet, og av disse tilhørte 65 % av OTUene bakteriefylumet Firmicutes. Bacteroidetes var den nest mest frekventerte gruppen (15 %), i tillegg til at Proteobacteria og Actinobacteria

også så ut til å spille relativt viktige roller, med henholdsvis 9 % og 5 % av total mengde bakteriell OTU-forekomst.

Til tross for at dybdesequenseringen resulterte i mange sekvenser, tilhørte de fleste av disse noen få men svært dominerende taksonomiske grupper. De fleste sekvensene tilhørende Firmicutes ble klassifisert som Clostridiales, som representerte hele 75 % av alle sekvensene innenfor de 9 mest dominante bakterielle OTUene. Tidligere er det også utført karakterisering basert på funksjon, der resultatene indikerte at Clostridia var involvert som en viktig nøkkelspiller i hydrolyse av poly- og oligosaccharider (Krause et al. 2008) og i acetogenesen (Jaenicke et al. 2011). Selv om den taksonomiske klassifiseringen i denne oppgaven ikke forteller noe om mikrobens funksjon, er det tenkelig at en stor andel av Clostridia, som den dominerende ordenen i dette forsøket, også bidrar i konverteringen av fermenteringsprodukter til acetat, H₂ og CO₂. Som tidligere nevnt, er ulike arter av *Clostridium* også kjent som syntrofiske acetat-oksiderende bakterier, og den høye tilstedeværelsen av Clostridia (disse kunne ikke bestemmes lavere enn orden) kan muligens forklare fraværet av acetogene metanprodusenter.

4.4 Grupperingsmønsteret indikerer konvergent utvikling

Som nevnt tidligere er det få publiserte forsøk som baserer seg på utviklingen av det mikrobielle samfunnet over tid. Ved å velge hyppige prøvetakninger håpet vi å kunne avdekke etableringen og utviklingen av bakterie- og arkesamfunnet i batchreaktorene, med hensyn på tid og substrat. Grupperingene fra PCA-analysen viste at det var sterke likheter mellom prøver fra samme batchreaktor. At de ulike subgruppene hadde opphav i ulike blandingsforhold av substratene, gjenspeiler at prosessen er avhengig av bioreaktorens miljø. Avvikene fra subgruppene viste seg i hovedsak å stamme fra prøvetakninger tidlig i perioden. Dette indikerer at den mikrobiologiske diversiteten er høyere i starten, men etter en kort stund snevres diversiteten inn til noen få, svært like organismer. Denne konvergente utviklingen kan ha oppstått som et resultat av at bestemte næringsstoffer ble brukt opp. Det er viktig å ha i minnet at reaktorene i dette forsøket var laboratorieskala batchreaktorer, uten tilførsel av nytt materiale underveis i forsøksperioden. I en kontinuerlig, eller semikontinuerlig reaktor, vil mønsteret fra PCA analysen trolig være annerledes, siden nye næringsstoffer stadig tilføres mikrobefamfunnet.

Dybdesequenseringen avdekket derimot ingen forandringer av diversitet og mikrobiell sammensetning over tid. En reell årsak til dette kan være en for kort tidsperiode med hensyn

på den lave vekstraten til metanogene arker (Boone & Xun 1987). En sammenligning av antall sekvenser per OTU for de ulike reaktorblandningene avslørte heller ingen forskjeller mellom mikrobiologisk tilstedeværelse basert på forholdet mellom storfegjødsel og fiskeensilasje. Det ser dermed ut til at det mikrobielle samfunnet har tilsynelatende liten betydning for gassproduksjon. Dette er overraskende, med hensyn på variasjonen i gassproduksjon for de ulike substratblandningene. Ved videre arbeid bør PCA-analyser av datasettet fra dybdesekvenseringen trolig utføres, for å undersøke om dette fanger opp eventuelle forskjeller i sammensetning med hensyn på tid og substrat.

4.5 FISH viste morfologi og tilstedeværelse av aktive celler i reaktorene

Fluorescence in situ hybridization (FISH) er ved flere tilfeller benyttet for bestemmelse av ratioen mellom bakterier og arker i bioreaktorer. I en FISH-basert studie utført av Kolukirik et al. (2007) ble den relative tilstedeværelsen av arker anslått å være mellom 15 og 17 % av totalt mengde prokaryote celler. Et annet forsøk (utført med samme prober som i denne oppgaven) viste en ratio på 2:1 av hhv. bakterier og arker (Tay et al. 2001). Benyttelse av andre metoder har også vist lignende resultater, med et forhold på (hhv. bakterier:arker) 83:17 (Nettmann et al. 2008) og 81:19 (Sekiguchi et al. 1998). Men som nevnt i innledningen, har ulike studier demonstrert at ratioen mellom andel bakterier og arker i bioreaktorer er svært varierende, og påvirkes trolig av blant annet tilgang til lett nedbrytbare næringsstoffer.

Som forklart i forbindelse med resultatene, førte store mengder autofluorescerende materiale til at kvantifisering av bakterier og arker var umulig å gjennomføre. Dette problemet er også rapportert i tidligere forsøk utøvd på materiale fra biogassreaktorer (Karakashev et al. 2005). Celler ble derimot visualisert, lokalisert og så langt som mulig kategorisert på bakgrunn av morfologisk struktur. Sistnevnte faktor gjaldt særlig for medlemmer av Methanosarcinaceae (*M. sarcina* osv.), da den dominerende strukturen til medlemmene av denne gruppen forekommer som lett gjenkjennelige pseudosarcina eller irregulære kokker.

Substratet med storfegjødsel (uten fiskeensilasje) inneholdt flest Methanosarcina, identifisert ut fra morfologi. Dette stemmer overens med resultatet fra et forsøk basert på spesifikke prober (på familienivå) utført av Karakashev et al. (2005), der Methanosarcinaceae dominerte i reaktorer med storfegjødsel. Celler med stavform som responderte på ARC915 (rikelig tilstede i reaktor 2 og 3), kan ha vært Methanobacteriales eller Methanosaetaceae.

Methanosaetaceae er derimot rapportert som ammoniumsensitiv (Karakashev et al. 2005), og vil trolig ikke vokse i reaktorene med fiskeensilasje. At cellene derimot tilhørte medlemmer

av Methanobacteriales (utenom Methanobrevibacter), stemmer bedre overens med resultatene fra sekvenseringen. Det vil ved senere arbeid kunne være interessant å separere de metanogene gruppene ytterligere ved bruk av prober på ordnsnivå, for blant annet å avdekke identiteten til de stavlignede arkene. Fordi det autofluorescerende materialet avga signal i samme fargespekter som hybridisert ARC915-probe, ble andelen arker mest sannsynlig underestimert ved identifisering av enkeltceller.

I reaktor 2 og 3 ble strukturer som lignet sporulerende staver observert. Det er nærliggende å anta at dette var organismer tilhørende en sporulerende *Clostridium*-art, siden disse ofte deltar i flere av stegene i anaerob nedbrytning av biomasse. Dette er også i samsvar med resultatene fra sekvenseringen, som indikerte at Clostridia var rikelig tilstede i reaktorene. De strukturlignende sporulerende stavene avga både grønn og rødfluorescens, og en lav cellulær aktivitet under sporulering kan være en mulig årsak til den tvetydige hybridiseringen. At de avga grønn fluorescens kan eventuelt komme av uspesifikk probebinding, eller begrunnes med autofluorescens, siden organisk materiale i de samme prøvene også avga grønt signal. Det ble også lokalisert tilsynelatende nære relasjoner mellom arke- og bakterielle celler. Om dette dreier seg tilfældigheter i plassering eller faktiske synergistiske forhold, kan ikke bestemmes utfra bildene.

Flere ulike protokoller for gjennomføring av FISH ble prøvd ut på reaktormaterialet, men med generell lav hybridiseringseffektivitet. Metoden som ble benyttet er optimalisert for *Aeromonas* (Bomo et al. 2004), og det er derfor ikke gitt at den fungerer optimalt på arker. Dette kan være årsaken til den lave fraksjonen av hybridiserte celler i flere av preparatene fra samtlige reaktorer. En optimalisering av hybridiseringen er trolig nødvendig for å få tilstrekkelig utbytte av FISH. Lysozymer kan eventuelt benyttes for permeabilisering av celleveggen til gram positive mikrober. RNA-prober er rettet mot ribosomalt RNA, som finnes i høyt antall i aktive celler. Hybridisering reflekterer derfor enkeltcellers fysiske tilstand, og uaktive celler kan også forklare den dårlige hybridisering.

4.6 Forholdet mellom tilstedeværelsen av Methanomicrobiales og Methanosarcinaceae detekteres ved pPCR.

En relativ kvantifisering på orden- og familienivå av hhv. Methanomicrobiales og Methanosarcinaceae, viste at Methanomicrobiales var den mest dominerende gruppen av disse to. Dette samsvarer med tidligere forsøk, utført på ulike biomassesubstrater. Nettmann et. al. (2008) utførte et lignende forsøksoppsett basert på qPCR med biomasse av storfegjødsel og maisensilasje, og konkluderte med en tilstedeværelse av Methanomicrobiales på 85 % av total

bestanddel av arker. Bare 12 % Metanosarcinaceae (utelukkende Methanosaetaceae) og 3 % Methanobacteriales ble detektert i samme forsøk. 84 %, 14 % og 2 % av hhv. Methanomicrobiales, Methanosarcinales og Methanobacteriales ble detektert i biogassanlegg med en blanding av grisegjødsel, maisensilasje og korn (Bergmann et al. 2010b). Forsøk utført på termofile reaktorer har derimot vist en dominerende tilstedeværelse av Methanobacteriales (Bauer et al. 2008). Disse resultatene underbygger teorien om at den hydrogenotrofe metanogenesen er den dominerende metabolismen til arker i biogassreaktorer.

Beregningen av forholdet mellom de spesifikke metanogene arkene og den totale arkepopulasjonen i denne studien, indikerte at nesten 100 % av totale arker tilhørte Methanomicrobiales. Dette samsvarer ikke med sekvenseringsresultatene, der Methanomicrobiaceae stod for 22 % av den totale diversiteten innen domenet arker. En mulig forklaring kan være at den universelle primeren for arker (ARC915) ble benyttet i kombinasjon med DNA-bindende farge, mens Methanomicrobiales ble detektert med ved et probebasert fluorescenssignal. I qPCR reaksjonene ble den interne kontrollen benyttet til detektering av variasjoner mellom reaksjonene, i tillegg til referanse for relativ kvantifisering av de metanogene gruppene. En standardkurve ville i tillegg gjort det mulig å beregne DNA konsentrasjon basert på antall kopier, slik at mer korrekte forhold mellom de ulike mikrobielle gruppene kan estimere. Denne bør derfor inkluderes ved en senere anledning.

En amplifisering av 16S rRNA gensekvens fra reaktorprøvene med to universelle primere ble også utført, for å avdekke andel av arker (universelt primersett for arker) i det prokaryote (universelt primersett for prokaryote) samfunnet. Begge primersettene ble på forhånd validert med en renkultur av *Heloferax denitrificans*, for å bekrefte deres sensitivitet mot 16S rRNA gen i arkealt DNA. Disse skulle i utgangspunktet vise den relative andelen av arker i bioreaktorene. C_t -verdiene fra prøver amplifisert med PRK-primersettet viste derimot en lavere mengde DNA enn mengde arke-DNA. Der er derfor grunn til å tro at mengden arker er underrepresentert i amplikon fra amplifisering med PRK341F/PRK806R. Ved videre arbeid bør det prokaryote primersettet erstattes med primere designet for bakterier (f.eks. BAC388F/BAC805R (Yu et al. 2005)), for en estimering av forholdet mellom bakterier og arker. Det vil også være hensiktsmessig å se på forekomsten av andre metanogene grupper. Av særlig interesse er Methanobacteriales (f. eks. primersettet MBT857F/ MBT929F (TaqMan) / MBT1196R (Yu et al. 2005)), da resultatene fra dybdesekvenseringen viste at denne orden opptrer som den dominerende gruppen i forsøkets bioreaktorer.

4.7 Evaluering av metoder og eget arbeid:

4.7.2 Dybdesekvenseringen viser et tilfredsstillende estimat av diversiteten

Illumina *high-throughput* sekvensering gir en dypere analysing av mikrobiotaen enn andre metagenomanalyser. I forhold til 454-pyrosekvensering, som er benyttet ved flere tilfeller, genereres langt flere (men kortere) sekvenser på Illumina-plattform. I arbeidet med denne oppgaven mottok vi 5 mill. sekvenser med en sekvenslengde på 150 basepar. Til sammenligning fikk Schlüter et al. (2008) i overkant av 600 000 sekvenser, med en gjennomsnittelig lengde på 230 basepar. Det er ikke funnet rapporteringer om tidligere forsøk der Illumina-sekvensering er benyttet for karakterisering av arker og bakterier i en samlet anaerob nedbrytningsprosess.

For klassifisering av sekvensene til taksonomiske enheter (på fylumnivå og lavere) ble *RDP-Classifiser* benyttet. På grunn av sekvensens korte leseramme (~ 150 bp), ble et konfidensnivå på 50 % sekvenslikhet benyttet, etter anbefaling i RDP-databasen. Flere av sekvensene gav treff med lav sekvensidentitet, trolig fordi mange arter fremdeles er ukjente og dermed ikke finnes i databasen. Dette viser at mer forskning er nødvendig for å kunne kartlegge den mikrobielle sammensetningen i en anaerob nedbrytningsprosess.

På grunn av tidsbegrensninger ble ingen optimalisering for Illumina-sekvenseringen utført. Totalt sett gav analysene av datasettet likevel en god indikasjon på sammensetningen av det mikrobiologiske samfunnet i våre batchreaktorer, og de viktigste metanogene hovedgruppene (Methanobacteriales, Methanomicrobiales og Methanosarcinales) ble representert. At biodiversiteten ikke viste store, uforklarlige avvik fra andre forsøk, tyder på at metoden gav et representativt bilde på den faktiske mikrobielle sammensetningen i reaktorene. For senere benyttelse av denne prosedyren bør likevel noen justeringer foretas. Fra totalresultatet ser man blant annet at noen av de konstruerte indeksene («primer tag» på PRKi F) på illuminaprimerene var dårligere enn andre, noe som gjorde basesekvensen vanskelig å lese. Vedrørende indekser bør derfor ekskluderes fra kommende forsøk.

En større andel av OTUene viste seg å være støysekvenser. Ved søk i RDP-databasen klassifiseres flere av disse gensekvensene til Bacteriophager, noe som tyder på at PRK primerettet gir uspesifikk amplifisering. Etter en utskilling av «ekte» sekvenser fra «støy» sekvenser, ble antall OTU redusert til 689 for bakterier, og 19 arker. Selv om antall OTU var betraktelig mindre enn førsteinntrykk skulle tilsi, var det mange sekvenser innad i hver gruppe for de mest dominerende OTUene. Totalt sett tilhørte kun 2,8 % av OTUene arkedomenet.

Dette er trolig en underestimering av andelen arker - en teori som resultatene fra den relative kvantifiseringen underbygger. Fra den qPCR-baserte kvantifiseringen ble en høyere C_T verdi (og dermed lavere startkonsentrasjon) observert for genamplifisering med PRK341F/PRK806R, enn for ARC-primersettet. Dette gir en sterk indikasjon på at PRK-primersettet ikke var optimal for arkepopulasjonen i våre reaktorer.

5. Konklusjon og videre arbeid

I dag er det hovedsakelig fossile brennstoff som forsyner vårt globale samfunn med energi. Men denne kilden er ikke utømmelig, ei heller miljøvennlig, og det er nødvendig med alternative metoder å generere energi på for å møte det økende energibehovet verden står ovenfor. Det oppleves derfor en økende interesse rundt konverteringen av organisk materiale til biogass, både som kilde til fornybar, miljøvennlig energi, og som avfallsbehandling. For en økonomisk forsvarlig biogassproduksjon, er det viktig at den anaerobe nedbrytningen er effektiv. Selv om mye forskning rundt biogassproduksjon med hensyn på substrater og den metanogene energimetabolismen er utført tidligere, vil en ytterligere forståelse rundt hele det mikrobiologiske samfunnet være viktig for en optimal biogassproduksjon. Storfegjødsel og kommunalt avfall er tradisjonelt benyttet som biomassesubstrat, men etter hvert har også en rekke andre avfallsmaterialer blitt prøvd ut. Her til lands blir det produsert store mengder fiskeavfall fra fiskerinæringen, og mellom 75-78 % (RUBIN 2011) av dette utnyttes, hovedsaklig som dyrefôr. Fordi fiskeavfall inneholder store mengder energirikt fett, er dette også et potensielt substrat i biogassanlegg. Det finnes allerede anlegg som benytter seg av fiskeensilasje i Norge (Åna Kretsfengsel), men problemer knyttet til prosesshemming gjør dette til et uforutsigbart materiale. At metanutbyttet avtok med økende andel fiskeensilasje i presenterte batchreaktorer, er et eksempel på dette. Større kunnskap knyttet til fiskeensilasje, og annet proteinrikt avfall er derfor viktig for å kunne utnytte potensielt energirike substrater.

Fra tidligere publikasjoner fremgår det at den acetotrofe metanogenesen er den viktigste metabolske synteseveien i biogassreaktorer. Nyere funn fra forsøk (hovedsakelig utført med dybdesequensering), indikerer derimot at acetotrofe metanogener ikke utgjør en like viktig rolle i biomassekonverteringen som tidligere antatt. Også resultatene fra denne studien viser en underrepresentasjon av Methanosarcinales, til tross for store mengder storfegjødsel. Hydrogenotrofe arker utgjør den dominerende gruppen, med Methanobacteriales som rådende orden. Av disse tilhører de fleste sekvensene slekten Methanobreviobakter (sekvensscore > 84 %). Der andre forsøk rapporterer om dominerende tilstedeværelse av Methanomicrobiales, viser resultatene fra dette arbeidet derimot en underrepresentasjon av denne metanogene gruppen. At flere studier, der identifiseringsmetoder uten at lysis og DNA-ekstrahering benyttes (FISH), også viser at Methanobacteriales forekommer i rikelige mengder i ulike reaktorsamfunn, underbygger våre antakelser om Methanobacteriales som den dominerende

arken. Dette demonstrerer viktigheten av optimale isoleringsmetoder for å få et DNA-utbytte som representerer det faktiske mikrobielle samfunnet. Flere indisier tyder også på at den universelle primerene for prokaryote celler underestimerer arker. Til senere arbeid bør derfor en lavere annealingstemperatur prøves ut, siden dette kan gi en bredere målgruppe ved amplifisering.

Sekvensene klassifisert som bakterieenheter viser en noe tydeligere diversitet enn arker. Dette er ikke overraskende, da de separate nedbrytningsstegene (hydrolyse/ acidogenese/ acetogenese) utføres av en mengde ulike arter. Det er likevel Firmicutes, i hovedsak representert av Clostridia som fremstår som den desidert mest dominerende bakteriegruppen i reaktorene i denne studien. Dette samsvarer med tidligere publikasjoner, og kan trolig begrunnes med at mange anaerobe mikroorganismer med cellulolytisk aktivitet tilhører Clostridia.

Gassproduksjonen i de ulike batchreaktorene viser en sammenheng mellom andel fiskeensilasje og spesifikk gassproduksjon, der aktiviteten i reaktorene med høyt innhold av fiskeavfall hemmes, trolig på grunn av lav pH (~ 4). Den mikrobielle aktiviteten hemmes muligens også av høy konsentrasjon av ammoniakk. Konsentrasjonen av flyktige fettsyrer kan brukes som indikasjon på sistnevnte parameter, men HPLC-metoden trenger flere optimaliseringer for fiskeavfall som prøvemateriale før en kvantifisering kan gjennomføres. På grunn av tidsbegrensninger ble en optimalisering ikke utført i sammenheng med denne oppgaven. Ved senere forsøk vil det derimot være av interesse å forbedre metoden til å gjelde ulike substrater. Det kan blant annet være aktuelt å forsøke en fortynningsserie av fiskeensilasjesubstratet, eller benytte en kolonne med kapasitet for denne type materiale.

Flere av de aktive reaktorene produserte fortsatt biogass etter 101 dager, og for å få en mer langsiktig vurdering burde en lengre periode blitt valgt for gassmålinger. Dette var derimot ikke aktuelt med hensyn på oppgavens tidsbegrensninger. At perioden var for kort, observeres også fra dybdekarakteriseringen av det mikrobiologiske samfunnet, der det ikke vises tegn til endringer i sammensetningen over en 30 dagers periode. Det som derimot observeres fra PCA analysen av datasettet fra blandet Sanger-sekvensering, er indikasjoner på en konvergent utvikling i oppstartsfasen hos gassproduserende reaktorer. Det vil være av særlig interesse å utføre videre analyser av denne observasjonen, og en PCA analyse av datasettet fra dybdesekvenseringen vil trolig kunne brukes til å avdekke en eventuell dynamisk utvikling. At det heller ikke observeres en sammenheng mellom MCR komponentene og OTUene, kan

trolig forklares med at MCR komponentene dekker en bredere gruppe enn OTU. Ved videre arbeid foreslås det derfor å konstruere et slektskapstre mellom OTUer innen hver MCR komponent. Den utførte dybdesekvenseringen på Illumina-plattform skaffet et innblikk i sammensetningen og diversitet i batchreaktorenes mikrosamfunn, og tilnærmingen benyttet i denne oppgaven vil muligens være til nytte for videre undersøkelser av ulike mikrobielle samfunn.

Referanseliste

- Agger, J. (2011). *Standard Operating Procedure; HPLC analysis of VFA, Furfural and HMF* UMB.
- Ahn, J. H. & Forster, C. F. (2000). Kinetic analyses of the operation of mesophilic and thermophilic anaerobic filters treating a simulated starch wastewater. *Process Biochemistry*, 36 (1-2): 19-23.
- Ahring, B. K., Sandberg, M. & Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty-acids as indicators of process imbalance in anaerobic digesters *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43 (3): 559-565.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and bioremediation*: Academic Press Inc.
- Alltech®. *CTR Concentric Packed Columns*: Tilgjengelig fra; <http://www.discoverysciences.com>.
- Amann, R., Fuchs, B. M. & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (3): 231-236.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59 (1): 143-169.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, W., Mayer, K. & Gruber, L. (2007). Biogas production from maize and dairy cattle manure—Influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, ecosystems & environment*, 118 (1): 173-182.
- Angelidaki, I. & Ahring, B. K. (1993). Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38 (4): 560-564.
- Angelidaki, I. & Ahring, B. K. (2000). Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Science and Technology*, 41 (3): 189-194.
- Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Morii, H., Koga, Y. & Hayano, K. (1995). Characterization of *Methanosarcina mazeii* TMA isolated from a paddy field soil. *Current Microbiology*, 31 (1): 34-38.
- Atlas, R. M. (1993). *Handbook of Microbiological Media*. 1. utg. Boca Raton: CRC Press. 1079 s.
- Baena, S., Fardeau, M. L., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J. L. & Patel, B. (2000). *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (1): 259-264.
- Balch, W. E., Schoberth, S., Tanner, R. S. & Wolfe, R. (1977). *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *International journal of systematic bacteriology*, 27 (4): 355-361.
- Barber, R. D. (2001). Methanogenesis: Ecology. *eLS*.
- Barker, H. A. (1956). Biological formation of methane *Industrial and Engineering Chemistry*, 48 (9): 1438-1442.
- Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A. & Lebuhn, M. (2008). Methanogens in biogas production from renewable resources - a novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology*, 58 (7): 1433-1439.
- 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.

- Blonskaja, V., Menert, A. & Vilu, R. (2003). Use of two-stage anaerobic treatment for distillery waste. *Advances in Environmental Research*, 7 (3): 671-678.
- Bomo, A., Storey, M. & Ashbolt, N. (2004). Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. *Journal of Water and Health*, 2 (2): 83-96.
- Boone, D. R. & Xun, L. (1987). Effects of pH, temperature, and nutrients on propionate degradation by a methanogenic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (7): 1589-1592.
- Boone, D. R., Whitman, W. B. & Rouvière, P. (1993). Diversity and taxonomy of methanogens. *Methanogenesis. Chapman & Hall, New York, NY*: 35-80.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M. & Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73 (3): 485-494.
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Ben Cheikh, R. & Hamdi, M. (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*, 40 (3): 989-995.
- Braun, R., Huber, P. & Meyrath, J. (1981). Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biotechnology Letters*, 3 (4): 159-164.
- Bryant, M. (1972). Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 25 (12): 1324-1328.
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J. & Wolfe, R. S. (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of 2 species of Bacteria *Archiv Fur Mikrobiologie*, 59 (1-3): 20-&.
- Bækken, Ø. & Bekkevold, S. (1993). Håndbok i ensilering. Trondheim: stiftelsen RUBIN. Tilgjengelig fra; http://www.rubin.no/Rapporter/410_19.PDF.
- Cavicchioli, R. (2011). Archaea - timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology*, 9 (1): 51-61.
- Chen, Y., Cheng, J. J. & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99 (10): 4044-4064.
- Chynoweth, D. P., Owens, J. M. & Legrand, R. (2001). Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*, 22 (1-3): 1-8.
- Collins, G., Woods, A., McHugh, S., Carton, M. W. & O'Flaherty, V. (2003). Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *Fems Microbiology Ecology*, 46 (2): 159-170.
- Conrad, R., Schink, B. & Phelps, T. J. (1986). Thermodynamics of H₂-consuming and H₂-producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in situ conditions. *Fems Microbiology Letters*, 38 (6): 353-360.
- Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *Fems Microbiology Ecology*, 28 (3): 193-202.
- 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.
- Delong, E. F., Wickham, G. S. & Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains - Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243 (4896): 1360-1363.
- Dohm, J. C., Lottaz, C., Borodina, T. & Himmelbauer, H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic acids research*, 36 (16): e105-e105.

- Eiroa, M., Costa, J., Alves, M., Kennes, C. & Veiga, M. (2012). Evaluation of the biomethane potential of solid fish waste. *Waste Management*.
- Eisentraut, A. (2010). Sustainable Production of Second-generation Biofuels. I: Agency, I. E. (red.). Paris: OECD publisher.
- Eurogenetec. *qPCR guide*: Tilgjengelig fra; <http://www.eurogenetec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>.
- Ferry, J. G. (1992a). Biochemistry of methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27 (6): 473-503.
- Ferry, J. G. (1992b). Methane from acetate. *Journal of Bacteriology*, 174 (17): 5489-5495.
- Ferry, J. G. (1993). *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. New York: Chapman & Hall. X, 536 s. s.
- Ferry, J. G. (2010). The chemical biology of methanogenesis. *Planetary and Space Science*, 58 (14-15): 1775-1783.
- Frimmer, U. & Widdel, F. (1989). Oxidation of ethanol by methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology*, 152 (5): 479-483.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7): 2802-2813.
- Gujer, W. & Zehnder, A. J. B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science & Technology*, 15 (8-9): 127-167.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (6): 763-781.
- Hagen, Ø., Hung, C., Josefsen, K. D. & Pettersen, J. (2010). Forutsetninger for biogassproduksjon i Norge. . I: Forskningsråd, F. N. N. (red.). Trondheim: SINTEF.
- Hansen, K. H., Angelidaki, I. & Ahring, B. K. (1998). Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research*, 32 (1): 5-12.
- Hartmann, H. & Ahring, B. K. (2005). Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of co-digestion with manure. *Water Research*, 39 (8): 1543-1552.
- Hattori, S. (2008). Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments*, 23 (2): 118-127.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6 (10): 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.
- Hill, D. T. & Holmberg, R. D. (1988). Long-chain volatile fatty-acid relationships in anaerobic digestion of swine waste. *Biological Wastes*, 23 (3): 195-214.
- Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B. & Martens, C. S. (1998). Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 62 (10): 1745-1756.
- Howell, J. A. & Stuck, J. D. (1975). Kinetics of Solka Floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase *Biotechnology and Bioengineering*, 17 (6): 873-893.
- Huber, R., Kurr, M., Jannasch, H. & Stetter, K. (1989). A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (Methanopyrus) growing at 110 C. *Nature*, 342 (6251): 833-834.
- Hungate, R. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in microbiology*, 3 (Part B): 117-132.
- IEA. (2010). World Energy Outlook. Paris: International Energy Agency.

- Jaenicke, S., Ander, C., Bekel, T., Bisdorf, R., Dröge, M., Gartemann, K. H., Jünemann, S., Kaiser, O., Krause, L. & Tille, F. (2011). Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS one*, 6 (1): e14519.
- Jolliffe, I. T. (2002). *Principal component analysis*, b. 2: Wiley Online Library.
- Kadam, P. C. & Boone, D. R. (1996). Influence of pH on Ammonia Accumulation and Toxicity in Halophilic, Methylotrophic Methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (12): 4486-4492.
- 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). *Cellular and molecular life sciences*, 54 (4): 305-308.
- 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): 331-338.
- Kessler, H. H., Muhlbauer, G., Stelzl, E., Daghofer, E., Santner, B. I. & Marth, E. (2001). Fully automated nucleic acid extraction: MagNA pure LC. *Clinical Chemistry*, 47 (6): 1124-1126.
- Kim, S. W., Park, J. Y., Kim, J. K., Cho, J. H., Chun, Y. N., Lee, I. H., Lee, J. S., Park, J. S. & Park, D. H. (2000). Development of a modified three-stage methane production process using food wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-6: 731-741.
- Kolukirik, M., Ince, O. & Ince, B. K. (2007). Methanogenic community change in a full-scale UASB reactor operated at a low F/M ratio. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 42 (7): 903-910.
- Koster, I. & Lettinga, G. (1988). Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biological Wastes*, 25 (1): 51-59.
- Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. A., Gartemann, K. H., Kromeke, H., Neuweiger, H., Puhler, A., Runte, K. J., Schluter, A., Stoye, J., et al. (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology*, 136 (1-2): 91-101.
- Kroeker, E., Schulte, D., Sparling, A. & Lapp, H. (1979). Anaerobic treatment process stability. *Journal (Water Pollution Control Federation)*: 718-727.
- Kröber, M., Bekel, T., Diaz, N. N., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krause, L., Miller, D., Runte, K. J., Viehöver, P. & Pühler, A. (2009). Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*, 142 (1): 38-49.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B. & Strömbom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27 (2-3): 95-125.
- Leclerc, M., Delgenes, J. P. & Godon, J. J. (2004). Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology*, 6 (8): 809-819.
- Lee, Y. H. & Fan, L. (1982). Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of the initial rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 24 (11): 2383-2406.

- Lehtomäki, A., Huttunen, S. & Rintala, J. (2007). Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. *Resources, Conservation and Recycling*, 51 (3): 591-609.
- Leven, L., Eriksson, A. R. B. & Schnurer, A. (2007). Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *Fems Microbiology Ecology*, 59 (3): 683-693.
- Lin, C. & Lay, C. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (1): 41-45.
- Liu, C., Zhu, Z. P., Liu, Y. F., Guo, T. J. & Dong, H. M. (2012). Diversity and abundance of the rumen and fecal methanogens in Altay sheep native to Xinjiang and the influence of diversity on methane emissions. *Archives of Microbiology*, 194 (5): 353-361.
- Liu, D. W., Liu, D. P., Zeng, R. J. & Angelidaki, I. (2006). Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research*, 40 (11): 2230-2236.
- Liu, X. L., Liu, H., Chen, Y. Y., Dul, G. C. & Chen, J. (2008). Effects of organic matter and initial carbon-nitrogen ratio on the bioconversion of volatile fatty acids from sewage sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83 (7): 1049-1055.
- Liu, Y. C. & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. I: Wiegel, J., Maier, R. J. & Adams, M. W. W. (red.) *Annals of the New York Academy of Sciences*, b. 1125 *Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels*, s. 171-189. Oxford: Blackwell Publishing.
- Mackie, R. I. & Bryant, M. P. (1981). Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and CO₂ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60 C. *Applied and Environmental Microbiology*, 41 (6): 1363-1373.
- Madigan, J. M. M. T. (2009). *Biology of Microorganisms*. 12 utg. San Francisco Pearson Benjamin Cummings.
- Madsen, E. L. (2011). *Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry*: Wiley-Blackwell.
- Maestrojuàn, G. M. & Boone, D. R. (1991). Characterization of *Methanosarcina barkeri* MST and 227, *Methanosarcina mazei* S-6T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761T. *International journal of systematic bacteriology*, 41 (2): 267-274.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9: 387-402.
- Mata-Alvarez, J. (2003). *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*: IWA publishing.
- McHugh, S., Carton, M., Mahony, T. & O'Flaherty, V. (2003). Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *Fems Microbiology Letters*, 219 (2): 297-304.
- McInerney, M. J., Struchtemeyer, C. G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A. J. M., Schink, B., Rohlin, L. & Gunsalus, R. P. (2008). Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. I: Wiegel, J., Maier, R. J. & Adams, M. W. W. (red.) *Annals of the New York Academy of Sciences*, b. 1125 *Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels*, s. 58-72. Oxford: Blackwell Publishing.
- Metzker, M. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome research*, 15 (12): 1767-1776.
- Miller, T. L. & Wolin, M. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied microbiology*, 27 (5): 985.
- Moter, A. & Gobel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41 (2): 85-112.

- Mshandete, A., Kivaisi, A., Rubindamayugi, M. & Mattiasson, B. (2004). Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes. *Bioresource Technology*, 95 (1): 19-24.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 263-273 s.
- Møller, H. B., Sommer, S. G. & Ahring, B. K. (2004a). Biological degradation and greenhouse gas emissions during pre-storage of liquid animal manure. *Journal of environmental quality*, 33 (1): 27-36.
- Møller, H. B., Sommer, S. G. & Ahring, B. K. (2004b). Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and bioenergy*, 26 (5): 485-495.
- 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): 1487-1496.
- Nakamura, K., Terada, T., Sekiguchi, Y., Shinzato, N., Meng, X. Y., Enoki, M. & Kamagata, Y. (2006). Application of pseudomurein endoisopeptidase to fluorescence in situ hybridization of methanogens within the family Methanobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11): 6907-6913.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B. & Klocke, M. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (6): 1835-1850.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C. & Klocke, M. (2010). Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (8): 2540-2548.
- Nielsen, H., Mladenovska, Z., Westermann, P. & Ahring, B. K. (2004). Comparison of two-stage thermophilic (68° C/55° C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55° C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering*, 86 (3): 291-300.
- 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-&.
- Patel, G. B. & Sprott, G. D. (1990). *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 40 (1): 79-82.
- Petersen, J. E. (2008). Energy production with agricultural biomass: environmental implications and analytical challenges†. *European Review of Agricultural Economics*, 35 (3): 385-408.
- Petersen, M. & Daniel, R. (2006). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (5): 431-435.
- Petruy, R. & Lettinga, G. (1997). Digestion of a milk-fat emulsion. *Bioresource Technology*, 61 (2): 141-149.
- Ramsay, I. R. & Pullammanappallil, P. C. (2001). Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation*, 12 (4): 247-256.
- Rasi, S., Veijanen, A. & Rintala, J. (2007). Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy*, 32 (8): 1375-1380.
- Raskin, L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E. & Stahl, D. A. (1994). Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization
Applied and Environmental Microbiology, 60 (4): 1241-1248.

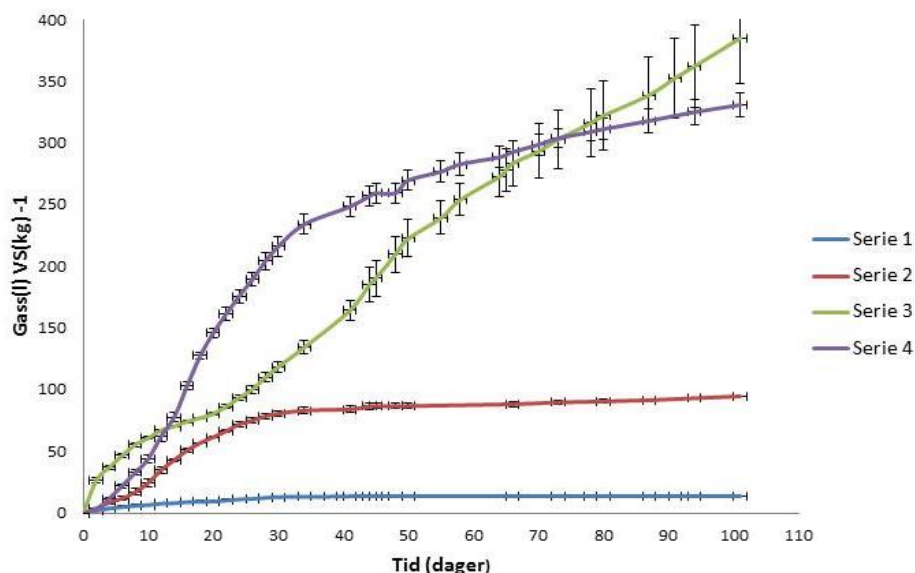
- Raskin, L., Zheng, D. D., Griffin, M. E., Stroot, P. G. & Misra, P. (1995). Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 68 (4): 297-308.
- Reis-Filho, J. S. (2009). Next-generation sequencing. *Breast Cancer Res*, 11 (Suppl 3): S12.
- RUBIN. (2011). Årsrapport. *Tilgjengelig fra; <http://www.rubin.no>*.
- Ruijter, J., Ramakers, C., Hoogaars, W., Karlen, Y., Bakker, O., Van Den Hoff, M. & Moorman, A. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, 37 (6): e45-e45.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-491.
- 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.
- Salyers, A. A., Vercellotti, J. R., West, S. E. H. & Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from Human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (2): 319-322.
- Sanchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L. & Martin, A. (2000). Effect of temperature and pH on the kinetics of methane production, organic nitrogen and phosphorus removal in the batch anaerobic digestion process of cattle manure. *Bioprocess Engineering*, 22 (3): 247-252.
- Sandberg, M. & Ahring, B. K. (1992). Anaerobic treatment of fish meal process waste-water in a UASB reactor at high pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36 (6): 800-804.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12): 5463.
- Schauer, N. L. & Ferry, J. G. (1980). Metabolism of formate in *Methanobacterium formicium*. *Journal of Bacteriology*, 142 (3): 800-807.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (2): 262-&.
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H. & Kruse, O. (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology*, 136 (1): 77-90.
- Schnürer, A., Schink, B. & Svensson, B. H. (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International journal of systematic bacteriology*, 46 (4): 1145-1152.
- Schnürer, A., Zellner, G. & Svensson, B. H. (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *Fems Microbiology Ecology*, 29 (3): 249-261.
- Schnürer, A. & Jarvis, Å. (2009). *Microbiological Handbook for Biogas Plants: Avfall Sverige og Svenskt Gastekniskt Center AB*.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H. & Nakamura, K. (1998). Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 144 (9): 2655-2665.

- Shallom, D. & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (3): 219-228.
- Shendure, J., Mitra, R. D., Varma, C. & Church, G. M. (2004). Advanced sequencing technologies: Methods and goals. *Nature Reviews Genetics*, 5 (5): 335-344.
- Smet, E., Van Langenhove, H. & De Bo, I. (1999). The emission of volatile compounds during the aerobic and the combined anaerobic/aerobic composting of biowaste. *Atmospheric Environment*, 33 (8): 1295-1303.
- Smith, P. H. & Mah, R. A. (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Applied microbiology*, 14 (3): 368-371.
- Souidi, K., Mumme, J., Mundt, K., Nettmann, E., Bergmann, I., Linke, B. & Klocke, M. (2007). Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agrartechnische Forschung*, 13 (6): 197-206.
- Sowers, K. R., Boone, J. E. & Gunsalus, R. P. (1993). Disaggregation of *Methanosarcina* spp. and growth as single cells at elevated osmolarity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (11): 3832-3839.
- Sprott, G., Shaw, K. M. & Jarrell, K. F. (1984). Ammonia/potassium exchange in methanogenic bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 259 (20): 12602.
- Tanisho, S., Wakao, N. & Kosako, Y. (1983). Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 16 (6): 529-530.
- Tauler, R. & Smilde, A. (1995). Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in Multivariate Curve Resolution *Journal of Chemometrics*, 9: 31-58.
- 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., Jungermann, K. & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41 (1): 100-180.
- Thauer, R. K. (1990). Energy- metabolism of methanogenic bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1018 (2-3): 256-259.
- Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology-Uk*, 144: 2377-2406.
- 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): 579-591.
- Thauer, R. K. (2010). Functionalization of Methane in Anaerobic Microorganisms. *Angewandte Chemie-International Edition*, 49 (38): 6712-6713.
- ThermoScientific. (2010). *KingFisher Flex User Manual*. Tilgjengelig fra: <http://www.thermoscientific.com>.
- V Wintzingerode, F., Göbel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *Fems Microbiology Reviews*, 21 (3): 213-229.
- Vidal, G., Carvalho, A., Mendez, R. & Lema, J. (2000). Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, 74 (3): 231-239.
- Vidotti, R. M., Viegas, E. M. M. & Carneiro, D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, 105 (1-4): 199-204.
- Wagner, M., Horn, M. & Daims, H. (2003). Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (3): 302-309.

- Wallace, R. & Brammall, M. L. (1985). The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. *Journal of general microbiology*, 131 (4): 821-832.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (16): 5261-5267.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J. & Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99 (17): 7928-7940.
- Weiland, P. (2003). Production and energetic use of biogas from energy crops and wastes in Germany. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 109 (1): 263-274.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (4): 849-860.
- Weiss, A., Jérôme, V. & Freitag, R. (2007). Comparison of strategies for the isolation of PCR-compatible, genomic DNA from a municipal biogas plants. *Journal of Chromatography B*, 853 (1-2): 190-197.
- Weiss, A., Jerome, V., Freitag, R. & Mayer, H. K. (2008). Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (1): 163-173.
- Widdel, F. (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (5): 1056-1062.
- 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.
- Wright, A. D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C. T., Rodgers, S. L. & Smith, K. D. (2004). Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3): 1263-1270.
- Yen, H. W. & Brune, D. E. (2007). Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 98 (1): 130-134.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 89 (6): 670-679.
- Zabranska, J., Stepova, J., Wachtl, R., Jenicek, P. & Dohanyos, M. (2000). The activity of anaerobic biomass in thermophilic and mesophilic digesters at different loading rates. *Water Science and Technology*: 49-56.
- Zeikus, J. (1977). The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41 (2): 514.
- Zellner, G. & Winter, J. (1987). Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂ reduction by Methanogens. *Fems Microbiology Letters*, 44 (3): 323-328.
- Zhang, R. H., El-Mashad, H. M., Hartman, K., Wang, F. Y., Liu, G. Q., Choate, C. & Gamble, P. (2007). Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 98 (4): 929-935.
- Zindel, U., Freudenberg, W., Rieth, M., Andreesen, J., Schnell, J. & Widdel, F. (1988). *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. *Archives of Microbiology*, 150 (3): 254-266.
- Zinder, S. H. (1993). Physiological ecology of methanogens. *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics*: 128-206.

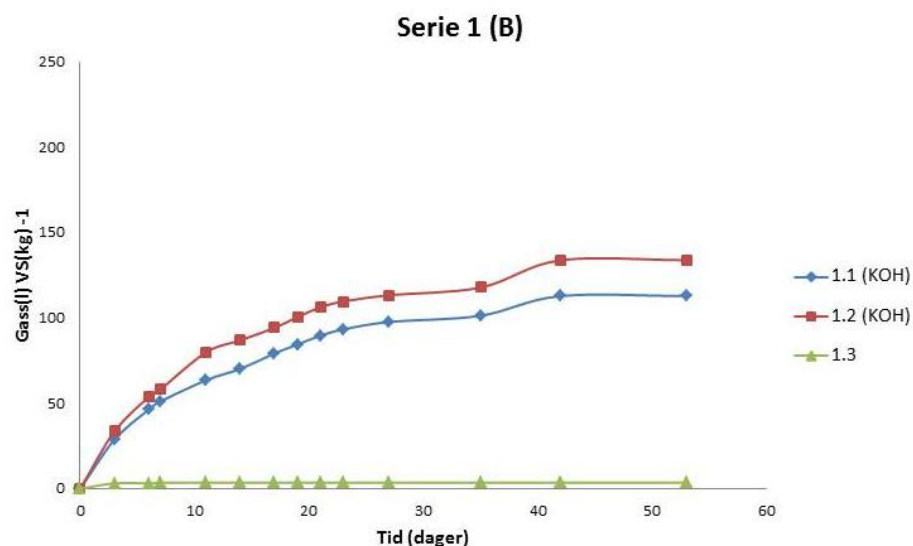
Vedlegg A

A.1 Spesifikk gassproduksjon



Figur A. 1 Spesifikk gassproduksjon. Batchreaktorer som ble åpnet annenhver dag for prøveuttak til DNA-isolering hadde en høyere spesifikk gassproduksjon for serie 3, sammenlignet med uåpnede batchreaktorer. Det var liten forskjell mellom de andre seriene. Serie 1; 40:60 %, serie 2; 60:40 %, serie 3; 80:20 % og serie 4; 100:0 % (av 100 % substrat).

A.2 Nye batchreaktorer av serie 1 (B)



Figur A. 2 Spesifikk gassproduksjon i serie 1, etter luting med 10M KOH. En ny serie (3 parallelle batchreaktorer) av blandingforholdet i serie 1 (40 % storfegjødsel og 60 % fiskeensilasje av total substratvolum, 16 % inokulum kommer i tillegg) ble satt opp. For å heve reaktorens pH ble ~ 30 dråper 10 M KOH tilsatt til to av batchreaktorene (1.1 og 1.2) umiddelbart etter blanding. Etter denne luting var pH for reaktorene hhv 7,02 og 7,11. Reaktor 1.3 forble ubehandlet og fungerte dermed som kontroll. Det ble observert en økt gassproduksjon ved luting av materialet.

A.3 OD-måling for kvantifisering av DNA

Tabell A.4. Nanodrop ND-1000 ble benyttet for å få en indikasjon på kvantitet og renhet av DNA-utbyttet for tre ulike ekstraheringsprosedyrer. Elueringsbufferen fra renseprosessen ble benyttet som blank prøve. 2 µl prøveprøve appliseres for hver måling. Resultatene var som følger:

Metode for DNA isolering	Prøve	Ng/ µl	260/280	260/230
FastDNA (soil-kit)	1	56,4	1,67	0,12
	2	48,2	1,64	0,08
	11	54,9	1,85	0,09
	12	45,0	1,94	0,08
	P	105,4	1,90	0,16
	N	10,0	2,51	0,02
SiMag	3	10,2	1,01	0,22
	4	3,3	1,07	0,02
	12	6,5	1,45	0,03
	14	51,1	1,40	0,32
	P	13,8	1,84	0,08
	N	1,9	1,64	2,62
MagMAX	5	13,5	2,50	0,33
	6	12,0	2,94	0,07
	15	24,6	2,62	0,09
	16	20,0	2,60	0,14
	P	47,2	2,21	0,33
	N	15,5	2,58	0,06

NA absorberes ved 260 nm, mens proteiner blir absorbert ved 280 nm. Optimal ratio for 260/280 er 1,8. En ratio under 1,8 tyder på en proteinkontaminering. 260/230 ratioen kan vise om løsningen inneholder høye saltkonsentrasjoner (N= negativ kontroll, P= positiv kontroll)

A.4 Taksonomisk oversikt over det mikrobielle samfunnet i bioreaktorene

Sekvensene fra dybdesequenseringen ble organisert i OTU-grupperingen basert på basemønster. OTUene ble deretter taksonomisk identifisert etter treff i *RDP- Classifier* databasen:

Tabell A.5.1 Klassifisering av *Archaea*-OTUer. Tabellen viser en oversikt over OTUer tilhørende domenet Archaea. Her inkluderes også OTUer klassifisert til *Thermogymnomonas* og *Ferroplasma*, med en sekvenslikhet fra 22- 43 % (under den anbefalte terskelverdien på 50 % for korte sekvenser).

OTU	Slekt	Fylum	Klasse	Orden	ant.
OTU867	Ferroplasma	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	438
OTU868	Ferroplasma	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	125
OTU842	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	2073
OTU843	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	513
OTU844	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	248
OTU847	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	152
OTU853	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	754
OTU854	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	448
OTU855	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	171
OTU856	Methanobrevibacter	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	101
OTU829	Methanocorpusculum	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	196
OTU836	Methanoculleus	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	173
OTU837	Methanogenium	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	469
OTU869	Methanogenium	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	146
OTU838	Methanosarcina	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	125
OTU845	Methanosphaera	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	210
OTU831	Thermogymnomonas	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	217
OTU832	Thermogymnomonas	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	1028
OTU833	Thermogymnomonas	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	399

Tabell A.5.2. Klassifisering av Bacteria- OTUer. Tabellen viser en oversikt over OTUer tilhørende domenet Bacteria. På de lavere taksonomiske nivåene er det relativt mange med lav sekvensidentitet (verdier ikke tatt med her), og klassifiseringen på suborden/familie/slekt bør derfor bare sees på som veiledende/ en indikasjon på tilstedeværelsen.

OTU	Suborden/familie/slekt	Fylum	Klasse	Orden	ant.
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	Thermosyntropha	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	7248
OTU286	Syntrophomonas	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	16028
OTU364	Tepidanaerobacter	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	10784
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	Butyrivibrio	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1367
OTU588	Robinsoniella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	4119
OTU605	Robinsoniella	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1413
OTU678	Cellulosilyticum	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	1358
OTU688	Lachnospiracea inc. sed	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 inc. sed	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 inc. sed	Prolixibacter	1920
OTU100	-	Bacteroidetes	Bacteroidetes inc. sed	Marinifilum	1017
OTU104	-	Bacteroidetes	Bacteroidetes inc. sed	Marinifilum	8938
OTU117	-	Bacteroidetes	Bacteroidetes inc. sed	Marinifilum	3659
OTU441	-	Bacteroidetes	Bacteroidetes inc. sed	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	Sedimimicola	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

Vedlegg A

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
OTU639	Azomonas	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	3899
OTU701	Sulfurospirillum	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	3929
OTU255	Anaeroplasmatales	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	Micrococccineae	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	1006
OTU576	Coriobacterineae	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteridae	3106
OTU577	Coriobacterineae	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteridae	2986
OTU586	Micrococccineae	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

Vedlegg B

Materialer

B.1 Primere og prober

Tabell B.1.1 Primere og prober benyttet i PCR/ qPCR-reaksjoner, samt sekvenseringsprimer

Primer/probe -settene for deteksjon av prokaryote generelt, bakterier, arker og spesifikke metanogene grupper, er hentet fra en studie av Yu et. al (2004). Alle oligonukleotidene er designet basert på identiske regioner innenfor målgruppens 16S rRNA gensekvens. DNAspike-settet ble benyttet for amplifisering av den interne kontrollen. Bruksskonsentrasjonen av alle primere og prober var 10 µM. Bruksskonsentrasjonen av sekvenseringsprimeren var 3,2 mM. Biomers var leverandør for samtlige primere og prober.

Navn	Sekvens (5` - 3`)	Målorganisme	Referanse
ARC787F	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC	Archaea	Yu et. al (2004)
ARC1059R	GCCAT GCACC WCCTC T	Archaea	Yu et. al (2004)
BAC388F	ACTCC TACGG GAGGC AG	Bakterier	Yu et. al (2004)
BAC805R	GACTA CCAGG GTATC TAATC C	Bakterier	Yu et. al (2004)
PRK341F ^a	CCTAC GGGRB GCASC AG	Prokaryote	Yu et. al (2004)
PRK16F TaqMan	TGYCA GCMGC CGCGG TAA	Prokaryote	Yu et. al (2004)
PRK806R ^a	GGACT ACYVG GGTAT CTAAT	Prokaryote	Yu et. al (2004)
MMB282F (F primer)	ATCGR TACGG GTTGT GGG	*	Yu et. al (2004)
MMB749F (TaqMan)	TYCGA CAGTG AGGRA CGAAA GCTG	*	Yu et. al (2004)
MMB832R (R primer)	CACCT AACGC RCATH GTTTA C	*	Yu et. al (2004)
Msc380F (F primer)	GAAAC CGYGA TAAGG GGA	**	Yu et. al (2004)
Msc492F(TaqMan)	TTAGC AAGGG CCGGG CAA	**	Yu et. al (2004)
Msc828R (R primer)	TAGCG ARCAT CGTTT ACG	**	Yu et. al (2004)
DNAspike F (F primer)	TACCT CTAAG ATGGA TGCGC AAA	Intern kontroll	Dette arbeidet
DNAspike P (TaqMan)	AGCCG CCGCT TGCGA TTTAG ACC	Intern kontroll	Dette arbeidet
DNAspike R (R primer)	CACAT TCTCC TTTCG CACG TT	Intern kontroll	Dette arbeidet
Sekvenseringsprimer (F primer)	ACACT CTTCC TACAC GACGC TCTTC CGATCT		Dette arbeidet

a Sekvensene for modifiserte PRK – primere; PRKillumina foreligger som eget vedlegg, jf. vedlegg C.

*MMB settet detekterer *Methanobacterium mobile*, *Methanoculleus bourgense*, *Methanogenium cariaci*, *Methanoplanus petrolearius*, *Methanofollis liminatans*, *Methanospirillum hungatei* og *Methanocorpusculum parvum*

**Msc settet detekterer *Methanosarcina bakeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina thermophila*, *Metanococcoides methylutens*, *Methanolobus tindarius* og *Methanosalsum zhilinae*.

Tabell B.1.2 Prober benyttet for Fluorescence in situ hybridization (FISH). Probene for fluorescence in situ hybridization er merket med et flourokrom i 5'-enden. Konsentrasjonen av probene i bruksløsning var 20 µM i TE-buffer. Eurogenetic var leverandør.

Prober	Basekvens	Modifisert i 5'	Spesifikasjoner	FA (%)*	Referanse
ARC915	TGC-TCC-CCC-GCC-AAT-TCC-T	6- FAM	Arker	35	<i>Gir grønn farge</i>
EUB338	CTG-CCT-CCC-GTA-GGA-GT	Cy 3 Indocarbocyanin 507.59	Bakterier	35	<i>Gir rød farge</i>

*Formamide-konsentrasjon i hybridiseringsbuffer.

B.2 Bakteriestammer

Tabell B.2 Bakteriestammer. Følgende bakteriestammer ble benyttet for validering av primere og/eller som positiv kontroll (for validering av primere og prober).

Art	Stamme	Bruksområde	Referanse
<i>Salmonella</i>	Type 5	Validering av EUB338	Jon Fredrik Hanssen
<i>Haloferax denitrificans</i>	DSMZ 4425	Validering av ARC915, og ARC787F/ ARC1059R, i tillegg til evaluering av PRK341F/ PRK806R sensitivitet	Daniel Mania
<i>Escherichia coli</i>	11775	Validering av bakterielle primer og prober, samt positiv kontroll.	Else Marie Aasen

B.3 Molekylvektstandard, enzymer og nukleotider

Tabell B.3 Tabellen gir en oversikt over molekylvektstandarder, enzymer og nukleotider som ble benyttet i denne oppgaven.

Navn	Stockløsning (kons.)	Produkt-nummer	Produsent
1kb DNA ladder	500 µg/ml i loadingbuffer og 1 x TEA-buffer	N3232S	New England BioLabs
λ DNA standard	100 µg/ml i TE-buffer	1027444	Invitrogen
dNTP- miks	10 mM		
HOT FIREPol ® DNA Polymerase	5 U/µl	01-02-01000	Solis BioDyne
HOT FIREPol ®EvaGreen ® qPCR Mix Plus (ROX)		08-24-00001	Finnzymes

B.4 Kit

Tabell B.4 Kit. Tabellen gir en oversikt over ulike kommersielle kit benyttet i denne oppgaven, samt deres bruksområder.

Produkt	Bruksområde	Produkt-nummer	Produsent
BigDye® Terminator V 1.1 Cycle Sequencing Kit	Sekvenseringsreaksjon	4337449	Applied Biosystems
BigDYE® X Terminator Purification kit	Rensing av produkt etter sekvenseringsreaksjon	4376486	Applied Biosystems
E.N.Z.A.™ Cycle Pure Kit	PCR- rensing	D6492-02	Omega Bio-Tek
ExoSap- IT™	PCR- rensing	US78200	GE healthcare, Affymetrix
FastDNA SPIN kit for Soil	Isolering av gDNA	6560-200	Qbiogene
MagMAX™ Total Nucleic Isolation Kit	Isolering av gDNA	AM1840	Ambion, Inc.
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Kvantifisering av nukleinsyrer	P7589	Invitrogen

B.5 Programvarer

Tabell B.5 Programvarer. Tabellen gir en oversikt over ulike programvarer benyttet i denne oppgaven og deres bruksområder

Dataprogram	Bruksområde	Produsent/referanse
BindIt™	Automatisk DNA- isolering	Thermo Scientific
Chromleon™ 7	Kromatografisk analyseprogram (HPLC)	Dionex
KC4™ Data analysis Software	Spektrofluorometer	BioTek
Leica Application Suite v.3.8	Epifluorescens- mikroskopi	Leica Mikrosystem
LinRegPCR	qPCR effektivitet	Ruijter et al. (2009)
MATLAB	Sekvensbehandling	MathWorks
ND 1000 v.3.3.1	Spektrofluorometer	NanoDrop Technology Inc.
Quantity One v.4.6.7	Gel dokumentasjonssystem	BioRad
RDP- Classifier	Analyse av sekvenseringsresultatene	Tilgjengelig fra: http://rdp.cme.msu.edu/
StepOne™ Software v.2.0	Real Time qPCR	Applied Biosystem
TotalChromNavigator v.6.2.1	Kromatografisk analyseprogram (GC)	Nelson/PerkinElmer
Zen 2010b v.6.0	Konvokal scanning-mikroskopi	Carl Zeiss MicroImaging

B.6 Kjemikalier

Tabell B.6 Kjemikalieliste. Tabellen viser en oversikt over alle kjemikaliene med kjemisk formel, som ble benyttet i arbeidet (kjemiske reagenser som inngår i kit er ikke inkludert).

Kjemikalie	Kjemisk formel	Leverandør
Agarose		Invitrogen
Ammoniumklorid	NH ₄ Cl	Merck
Butansyre (smørsyre) (>99 %)	C ₄ H ₈ O ₂	Aldrich chemistry
<i>di</i> -kaliumhydrogenfosfat	K ₂ HPO ₄	Norsk medisinaldepot
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Merck
Eddiksyre	CH ₃ COOH	Merck
Etidiumbromid (EtBr)	C ₁₂ H ₂₀ Br	VWR
Formamide	CH ₃ NO	Sigma
Gel loading dye (6X)		New England BioLabs
Gjær-ekstrakt		Merck
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	B.D.H Laboratory supplies
Guanidine hydroklorid	CH ₆ ClN ₃	Sigma
Guanidine thiocyanat	C ₂ H ₆ N ₄ S	Sigma
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Arcus
Kaliumdihydrogenfosfat	KH ₂ PO ₄	Merck
Kaliumklorid	KCl	Merck
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-Aldrich
Valerinsyre (99 %)	C ₅ H ₁₀ O ₂	Kebo Lab

B.7 Laboratorieutstyr

Tabell B.7 Laboratorieutstyr. Tabellen gir en oversikt over laboratorieutstyr og instrumenter som ble benyttet i forbindelse med denne oppgaven. I tillegg til utstyr i listen, benyttes generelle laboratorieutstyr som automatpipetter, pipettespisser, målebeger, podenåler o.l.

Laboratorie utstyr	Modell/produktnummer	Produsent
Automatisk magnetisk partikkel prosessor, for rensing av DNA	KingFisher* Flex (Magnetic Particle Processors)	Thermo Scientific
Blender		Waring, USA
Bordsentrifuge I (mini)	SN0909 10556	Labnet international, Inc
Bordsentrifuge II	Mini-spin	Eppendorf
Celleknuser	FastPrep® -24	M.P. Biomedicals
Elektroforesekar til agarosegel elektroforese	Mini sub® cell GT	BioRad
Epifluorescens-mikroskop	DMRE	Leica
Eppendorfrør, 1,5 ml	MCT-150-C	Axygen Scientific
Film for 96-brønners plate	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystem
Gasskromatograf	Autosystem	PerkinElmer
Gassprøyte (GC)	Pressure-Lok®	VIKI
Gel dokumentasjon	GelDoc/ Universal Hood II	BioRad
Glassprøyte 50 ml	Micro-Mate ® Interchangeable	Cadence Science Inc.
Glødeskap, 550 °C		Therm Concept
Inkubatorskap m/risting 37 °C	Ecotron	Infors HT
Inkubatorskap	AG-CH4103	Infors HT
Kanyle m/sideport (GC)	Gas A-2	VIKI
Kappekrymper		Wheaton
Kolonne (GC)	CTR I	Alltech Associates Inc
Kolonne (HPLC)	Zorbax Eclipse Plus C18	Agilent Technologies
Konvocal scanningmikroskop	LM700	Zeiss
Magnetisk separator		Dynal
Magnetrører	Basic 2	IKA® RH
Mikrobølgeovn		Wirlpool
Mikrobrønnplate	Twin.tec PCR plate 96, unskirted	Eppendorf
PCR-rør, 0,2 ml	PCR-02-C	Axygen Scientific
pH-meter	Delta 320	Mettler
pH-strips (pH 0 – 14)		Merck Chemicals
Plastrør m/skrukork, 15 ml	Cellstar® tubes	Greiner Bio-One
Plastsprøyte (10, 30, 60 ml)	Becton Dickinson	Plastipac
Platesentrifuge	PlateSpinII	Kubota

Vedlegg B

Real-time PCR maskin	StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems	Applied Biosystem
Sekvensator	Genetic analyzer 3130xl	Applied Biosystem
Spektrofluorometer	FLx800cse	Cambrex Bio Science Walkersville, Inc
Spektrofotometer	NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 UV/Vis	Thermo Scientific
Serumsflasker	120 ml Crimp Neck vial	Garse
Termosykler I	270S1040277	Applied Biosystem
Termosykler II	Mastercycler Nexus gradient	Eppendorf
Termosykler III	Mastercycler gradient	Eppendorf
Vannbad	12	Julabo
Varmeskap, 100-105 °C		
Varmeplate med rister	Powercell™ Shaking Micro incubator	ESCO
Vekt I	Type 1404	Sartorius
Vekt II (finvekt)		Sartorius
Vortex mikser I (230 V)	Z 0010141	Labnet international, Inc
Vortex-mikser II	MS3 digital	IKA
Væskekromatograf	Dionex UltiMate 3000	Thermo Scientific

Vedlegg C

Illumina-primere:

C.1 Sekvenser som benyttes på illumina-primere:

Tabell C.1. En unik Illumina-tag på hver reversprimer ble konstruert av revers komplementære baser til indekssekvens gitt i TruSeq Index Sequencer, indeks 1-12. koloniene. Indeks 13-28 ble benyttet som unike indekscoder på forward primerene («primer tag»), for å identifisere og separere de ulike koloniene fra illumina-sekvenseringen.

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	ATTCCT	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

C.2 PRKillumina-primersettet

Illuminaprimere konstruert fra PRK 341F/806R ble benyttet til 16S rRNA genamplifisering. Biblioteket bestod totalt av følgende 12 revers primere og 16 forward primere:

Revers PRKillumina primer (5'-3'):

1. caagcagaagacggcatacagagatCGTGATgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTAA
T
2. caagcagaagacggcatacagagatACATCGgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTA
AT
3. caagcagaagacggcatacagagatGCCTAAgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTA
AT
4. caagcagaagacggcatacagagatTGGTCAgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTAA
T
5. caagcagaagacggcatacagagatCACTCTgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTAA
T
6. caagcagaagacggcatacagagatATTGGCgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTAA
T
7. caagcagaagacggcatacagagatGATCTGgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTAA
T

8. caagcagaagacggcatacagagatTCAAGTgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTAA
T
9. caagcagaagacggcatacagagatCTGATCgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTAA
T
10. caagcagaagacggcatacagagatAAGCTAgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTA
AT
11. caagcagaagacggcatacagagatGTAGCCgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTA
AT
12. caagcagaagacggcatacagagatTACAAGgtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctGGACTACYVGGGTATCTA
AT

Forward PRKillumina primer (5'– 3'):

1. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctagtcaaCCTACGGGRBGC
ASCAG
2. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctagtccCCTACGGGRBGC
ASCAG
3. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctatgtcaCCTACGGGRBGC
ASCAG
4. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctccgtccCCTACGGGRBGC
ASCAG
5. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctgtagagCCTACGGGRBG
CASCAG
6. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctgtccgcCCTACGGGRBGC
ASCAG
7. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctgtgaaaCCTACGGGRBGC
ASCAG
8. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctgtggccCCTACGGGRBG
CASCAG
9. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctgtttcgCCTACGGGRBGC
ASCAG
10. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctctgtacCCTACGGGRBGC
ASCAG
11. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctgagtggCCTACGGGRBG
CASCAG
12. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctggtagcCCTACGGGRBG
CASCAG
13. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctactgatCCTACGGGRBGC
ASCAG
14. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctatgagcCCTACGGGRBGC
ASCAG
15. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctattcctCCTACGGGRBGC
ASCAG
16. aatgatacggcgaccaccgagatctacactttccctacacgacgctctccgatctcaaaagCCTACGGGRBG
CASCAG

Vedlegg D

Protokoller

D.1 1 % Agarosegel- elektroforese

Materialer:

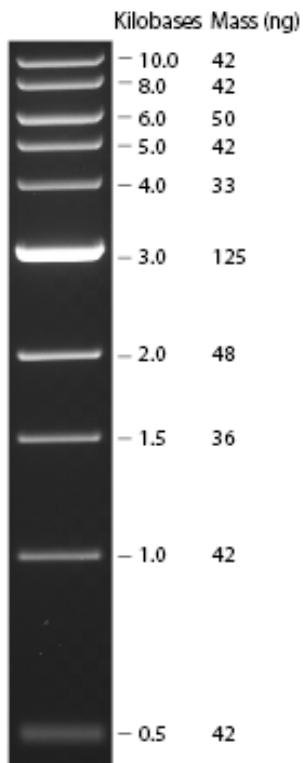
1 x TAE- buffer
SaeKEM® LE agarose
Ethidium bromide 0,07 % (10mg/ml)
1 kb DNA ladder
6X Gel Loading Dye

Prosedyre:

1. 0,5 g agarose ble blandet i 50 ml 1 x TEA-buffer, og varmet i mikrobølgeovn på 650 watt til all agarose var oppløst.
2. Når løsningen var avkjølt til ~ 60 °C, ble 1 dråpe (5 µl) ethidium bromide (10 mg/mL) tilsatt. Dette gav en sluttkonsentrasjon på 0,4 µg/mL.
3. En passende støpeform med brønnekam ble festet i en tvinge, og den flytende agaroseløsningen ble helt over. Ved avkjøling stivner løsningen til gel. Etter 20 minutter ble støpeformen med agarosegelen overført til et elektroforesekar med 1 x TEA-buffer.
4. I den første brønnen ble størrelsesstandarder bestående av følgende reagenser applisert:
 - 1 µL 1Kb DNA ladder
 - 1 µL 6X Gel loading dye
 - 4 µL 1 x TAE-buffer
5. I de kommende brønnene ble prøver applisert. For genomisk DNA: 10 µl genomisk DNA ble blandet med 2 µl 6X Gel loading dye og applisert til brønnene.
For PCR-produkt: 5 µL PCR-produkt ble blandet med 1 µl 6X Gel loading dye og applisert til brønnene.
6. Elektroforese ble utført med et spenningsfelt på 90 V, til prøvene hadde migrert tilstrekkelig (30-40 min).
7. DNA fragmentene ble visualisert i et gel-dokumentasjons system (BioRad)

DNA-fragmentet ble sammenlignet med 1 Kb DNA ladder (New England BioLabs) jf. Figur D. 1 for bestemmelse av størrelse og konsentrasjon.

Molekylvektstandard benyttet ved 1 % agarosegel-elektroforese:



Figur D. 1: 1Kb DNA-ladder. 1 Kb DNA ladder (New England BioLabs) egner seg til å anslå størrelsen på dsDNA-fragmenter av størrelse 500 bp-10 kb. Masseverdien er gitt for 0,5 µg/lane. 3,0 kb fragment har økt intensitet og fungerer som et referanse band. Hentet fra: <http://www.neb.com/nebecomm/products>

D.2 DNA ekstrahering

D.2.1 FastDNA SPIN kit for soil

FastDNA SPIN kit (Qbiogene) er et kolonnebasert kit, produsert og designet for ekstrahering av genomisk DNA fra jord, og ekstraherer DNA fra både bakterier, fungi, planter og dyr.

Prosedyre:

1. Pellet fra 1 ml fermentorkultur ble resuspendert i 980 µl Sodium Phosphate Buffer og 122 µl MT Buffer (Pellet erstattes med 40 µl MQ-vann i den negative kontrollen). Løsningen ble overført til Lysing Matrix E tube (rør med skrukork med silikonring og glasskuler) Alle prøvene ble homogenisert på vortexes mikser.
2. Rørene ble plassert i FastPrep Instrument (M.P. Biomedicals) og ristet 6,5 M/S i 2* 20 sek. for celleknusing
3. Etter mekanisk lysis ble rørene sentrifugert i 5 min på 13,4 x 1000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) for å pelletere glasskulene. Vi valgte og ikke å sentrifugere lenger enn 5 min, i fare for å miste celler i dette steget. Supernatanten ble overført til et nytt rent 2.0 ml rør.
4. 250 µl PPS (Protein Precipitation Solution) ble tilsettatt hver løsning med knuste celler. Rørene ble vendet for hånd 10 ganger for å oppnå en uniform suspensjonen.
5. Rørene ble sentrifugert i 5 min ved 13,4x 1000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) og supernatanten overført til et rent 15 ml rør (Greiner). 1,0 ml Binding Matrix suspensjon ble tilsettatt hver prøve, og rørene ble snudd opp ned i 2 min. Deretter hvilte prøvene i 3 min slik at silica matriksen sedimenterte.
6. 500 µl av suspensjonen ble fjernet, mens resterende suspensjon ble resuspendert og overført til SPIN filter kolonnerør. Rørene ble sentrifugert i 1 min ved 13,4x 1000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) slik at væsken ble presset gjennom filteret. Dette ble utført i to omganger for å få med hele suspensjonen. Væsken ble fjernet fra oppsamlingsrørene mellom hver sentrifugering.
7. 500 µl SEWS-M (vaskeløsning fortynnet i etanol) tilsettes hvert SPIN filter, og pelleten som ble dannet på filteret, ble forsiktig resuspendert. Rørene ble sentrifugert på 13,4 x 1000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) i 1 min. Oppsamlingsrøret ble tømt, og SPIN filteret sentrifugert på nytt i 2 min for å tørke vekk rester av vaskeløsningen. Oppsamlingsrørene ble kastet og filteret plasseres i et nytt, rent oppsamlingsrør der det ble lufttørket ved romtemperatur i 5 min.

8. Bindingsmatriksen ble deretter resuspendert med 60 µl DES (DNae/ Pyrogen- Free Water). Mengde DES er avhengig av pelletstørrelsen (mellom 50 µl og 100 µl), men minst mulig fortynning av DNA er ønskelig.
9. For eluering av DNA, ble SPIN kolonnerørene sentrifugert på nytt.

D.2.3 SOP2-001- for Stool Bacteria DNA extaction

Denne protokollen har som hensikt å beskrive isolering av DNA fra spedbarn avføring.

Metoden ble overført til isolering av DNA fra storfegjødsel og fiskeensilasje. *SOP2-001- for Stool Bacteria DNA extaction* baserer seg på SiMAG/MG-DNA for å rense DNA fra andre proteiner og cellekomponenter. SiMAG/MG-DNA er paramagnetiske silicapartikler som binder spesifikt til nukleinsyrer og kan fanges opp av en magnet. Ved høy saltkonsentrasjon vil natriumionene bryte hydrogenbindinger mellom hydrogen i vannmolekyl og det negativt ladde oksygenet på silica-partikkelen. Dermed fungerer natrium som en katione-bro og fester til negativt ladd oksygen i fosfatgruppen til DNA molekylet. Prøvene plasseres i en magnetisk separator i 30 sek slik at silicapartiklene med nukleinsyrer tiltrekkes magneten.

Silicapartiklene samles opp med magnet tre ganger med vasking med vaskebuffer 1, 2 og 3 (henholdsvis) mellom hver oppsamling for å rense DNA fra andre cellekomponenter. Ved å fjerne saltet med en elueringsbuffer løsner DNA fra partiklene og DNA-eluatet brukes videre.

Prosedyre:

1. 1 ml prøvematerialer ble oppløst i 1200 µl bindingsbuffer, og suspensjonen overføres til egnet rør med skrukork og siliconring. Disse rørene var på forhånd tilsatt glasskuler av ulike størrelser (0,25 ml kuler med en diameter på 0,10-0,11 mm, 0,25 ml av kuler med en mellomstørrelse, 1 kule med en diameter på 2,5- 3,5 mm) og autoklavert.
2. Rørene ble plassert i et FastPREP instrument (M.P. Biomedicals) for mekanisk knusing av cellene. Prøvene ble ristet ved 6,5 M/S i 2* 20 sek. og rørene ble satt på is for avkjøling mellom øktene.
3. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 13,4 x 1000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) i 5 min for å pelletere glasskulene. 600 µl av supernatanten ble overført til et nytt 1,5 ml eppendorfrør.
4. Til hvert av de nye rørene med supernatanten ble 20 µl SiMAG/MP-DNA Magnetic Beads (200 mg/ml) tilsatt. Rørene ble ristet på vortex mixer for å sikre en tilstrekkelig homogenisering kulene i suspensjonen. Suspensjonen inkuberes ved romtemperatur i 5 min, slik at de magnetiske kulene bandt opp DNA.

5. Rørene ble plassert i en magnetisk separator i 30 sek for å samle de magnetiske kulene med DNA. All supernatant ble forsiktig fjernet.
6. Rørene ble tatt ut av den magnetiske separatorene og tilsatt 1 ml vaskebuffer I. Rørene ble forsiktig ristet for å unngå skumdannelse fra Triton X100. Kulene ble deretter spunnet ned (short spin) og plassert tilbake i separatorene. Etter 30 sek/ når kulene med DNA hadde pelletert, ble supernatanten fjernet på nytt.
7. Rørene ble tatt ut av den magnetiske separatorene og tilsatt 1 ml vaskebuffer II, før rørene ble ristes i 5 sek og deretter spunnet lett ned. Kulene med DNA ble samlet opp til pellet på nytt i med den magnetiske separatorene. Supernatanten ble deretter fjernet.
8. Rørene ble tatt ut av den magnetiske separatorene og tilsatt 1 ml vaskebuffer III. Rørene ble ristet i 1 sek (fordi H₂O eluerer DNA, var det svært viktig å ikke vortexe for lenge i dette steget). Separatorene samlet deretter beads/DNA, før supernatant ble fjernet.
9. 100 µl elueringsbuffer (TE-buffer) ble tilsatt hver prøve. Rørene ble lett ristet på vortex mikser og deretter inkubert i 10 min på thermomixer med 60 °C og moderat risting.
10. SiMAG/MP-DNA Magnetic Beads ble samlet til pellet med magnetisk separator, og eluert DNA ble overført til et nytt rent 1,5 ml eppendorfrør.

D.2.3 MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Prosedyre

MagMAX total nucleic acid isolation kit er designet for en effektiv isolering og rensing av DNA og RNA.

Prosedyre:

Forberedelse av Kit reagenser:

Kit—reagensene ble på forhånd forberedt etter protokollens prosedyre:

1. 12 ml 100 % isopropanol ble tilsatt konsentrert vaskeløsning 1.
2. 32 ml 100 % ethanol ble tilsatt konsentrert vaskeløsning 2.
Begge vaskeløsningene ble lagret ved romtemperatur.
3. Carrier NA ble tilsatt Lysis/binding løsningskonsentrat og løsningen ble homogenisert ved gjentatt vending.

Reagent	Per reaksjon
Lysis/binding Solution Consertrat	232 µl
Carrier NA (1 µg/sample)	3 µl

Denne løsningen kan lagres i en måned i romtemperatur.

4. Til hver reaksjon ble 20 µl Bead miks benyttet:

Reagent	Per reaksjon
NA Binding Beads	10 µl
Lysis/binding Enhancer	10 µl

Bead miks bør lages samme dag som den skal benyttes, men kan også lagres opp til 2 uker ved 4°C.

DNA ekstrahering:

1. 235 µl Lysis binding løsning ble tilsatt hver bead tube. Løsningen ble deretter benyttet videre i steg 3.
2. Fermentorpelleten ble resuspendert i 1 ml PBS og løsningen blandet grundig med vortexing i 3 min/ til suspensjonen var tilstrekkelig homogenisert. Prøvene ble deretter sentrifugert ved lav fart i 1 min.
3. 175 µl av supernatanten ble overført til en Bead tube (inneholder glasskuler for mekanisk lysis og 235 µl lysis/binding solution) og sikret i FastPrep instrument

(M.P. Biomedicals). Prøvene ble ristet på 6,5 m/s i 2 x1 min, med 5 min pause mellom hver syklus.

4. Etter mekanisk lysis ble prøvene sentrifugert 13,4 x 1000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) i 3 min. for å pelletere glasskulene/Zirconia.
5. 300 µl av supernatanten (inneholdt lyserte celler og cellekomponenter) ble overført til et nytt 1,5 ml eppendorfrør.
6. Prøvene ble sentrifugert på nytt på 13,4 x 1000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) i 6 min.
7. NA-rensing; 115 µl av prøvens supernatant ble overført til et nytt eppendorfrør, og 65 µl 100 % isopropanol ble tilsatt hver prøve. Prøvene ble deretter ristet (thermomikser uten varme) i 1 min, med 700-800 rpm risting.
8. 20 µl homogenisert Bead mix ble tilsatt hver prøve. Dette gav en rødbrun farge på prøvene. Prøvene ble ristet på nytt, denne gangen i 5 min for at DNA skulle binde til NA Binding Beads.
9. Etter risting ble rørene plassert i en magnetisk separator, slik at magnetene med bundet DNA dannet pellet på rørets vegg.
10. Rørene ble stående i separatoren til supernatanten ble blank, før supernatanten forsiktig ble fjernet. Deretter ble rørene tatt vekk fra separatoren.
11. 150 µl vaskeløsning 1 ble tilsatt, og rørene ble ristet i 1 min. Kulene ble samlet opp i den magnetiske separatoren, og supernatanten fjernet. NB: Rørene tas vekk fra separatoren før vaskeløsningen tilsettes.
12. Forrige vaskesteg ble gjentatt en gang.
13. Samme prosedyre ble gjentatt to ganger med vaskeløsning 2.
14. Etter vaskeprosessen ble prøvene tørket på risteren i ca. 2 min (ikke overtørk!), slik at alkohol fra vaskeløsning 2 fordampet.
15. Elueringsbufferen ble på forhånd oppvarmet til 65 °C. Mellom 20-50 µl av elueringsbufferen ble deretter tilsatt hver prøve. I dette tilfellet tilsatte vi 50 µl.
16. For at NA-ekstraheringen skulle være mest mulig effektiv var det nødvendig å løse opp aggregater av magnetiske kuler i elueringsbufferen. Dette ble gjort ved å pipettere løsningen opp og ned, i tillegg til å riste på vortex mikser. Etter dette var rensed DNA i supernatanten. De magnetiske kulene ble derfor samlet opp med separatoren, og supernatanten ble overført til et rent eppendorfrør.

D.3 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

Prosedyren er basert på protokollen fra Bomo et al. (2004), men med noen modifikasjoner med hensyn på varighet av inkubering. For oppskrifter på løsninger/buffere for 3,0 % paraformaldehydløsning, hybridiseringsbuffer og vaskebuffer, henvises det til vedlegg G.1.3.

Fiksering og permabilisering av cellen slik at rRNA i cellen blir tilgjengelig for proben (ved penetrering gjennom cellevegg), samtidig som rRNA må beskyttes fra RNaser.

1. 0,5 ml prøvemateriale ble fortynnet i dH₂O, til et endelig volum på 5 ml i 15 ml rør. Disse ble grundig ristet på vortex-mixer i 30 sek. Rørene ble deretter stående på benken i noen minutter for å sedimentere de største partiklene.
2. 1500 µl av suspensjonen fra fortynningen ble tatt ut spunnet ned til pellet; 14,500 rpm (Mini-spin, Eppendorf) i 5 min.
3. Supernataten ble fjernet og pelleten resuspendert i 1 ml 3,0 % paraformaldehyd løsning.
4. Cellene ble fikseret i denne løsningen i 3 timer ved 4 °C.
5. Etter fikseringen ble cellene pelletert ved 13000 rpm (Mini-spin, Eppendorf) i 2 min, og supernatanten fjernes.
6. Pelleten ble resuspendert i 1 x PBS (1 ml) og deretter sentrifugert på nytt før supernatant ble fjernet.
7. Pelleten ble resuspendert på nytt, denne gangen i 1x PBS : 96 % EtOH (1:1). Volumet ble justeres etter pelletens størrelse.

Ferdig fikserte celler ble hybridisert til prober, eventuelt lagret ved – 20 °C.

Hybridisering for at probe skal binde seg til rRNA

1. 5 µl av suspensjonen med fikserte celler ble tilsatt brønnene på en glasskive med teflonbelegg. Skivene ble tørket i varmeskap på 37 °C (evt lufttørkes).
2. Preparatet ble deretter dehydrert i 3 min i hhv 50 %, 80 % og 95 % etanol.
3. Etter en ny lufttørking av preparatene ble 10 µl oligonucleotideløsning tilsatt til hver av brønnene. Oligonucleotidene var på forhånd laget, og ble lagret på is i aluminiumsfolie (for beskyttelse mot lys) frem til bruk.

Oligonucleotideløsningen (totalt volum på 10 µl per reaksjon):

5µl 20 µM EUB388 (probe med fluorescerende “tag”)

5 µl 20 µM ARC915 (probe med fluorescerende “tag”)

40 µl Hybridiseringsbuffer (med 35 % formamid)

- 5 Glasskivene ble lagt i et fukt-rør (50 ml Greiner-rør, med absorberende papir fuktet med hybridiseringsbuffer) og pakket i Alu- folie. Det ble deretter inkubert i varmeskap på 46 °C i 3 timer.

Vasking av slide for å stoppe hybridisering og fjerne overflødige prober.

1. Etter inkubering ble glassplaten lagt i et rør med vaskebuffer og inkubert i 20 min ved 46 °C. Vaskebufferen var på forhånd varmet opp til 46 °C.
2. Etter denne inkuberingen ble preparatene lett vasket med MQ-vann og deretter lufttørket.

Glasskivene med ferdig preparat ble oppbevart mørkt frem til mikroskopering. De som ble lagret over en lengre periode ble oppbevart ved – 20 °C.

Vedlegg E

Analyserapport av storfegjødsel og fiskeavfall

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	Analysereport 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

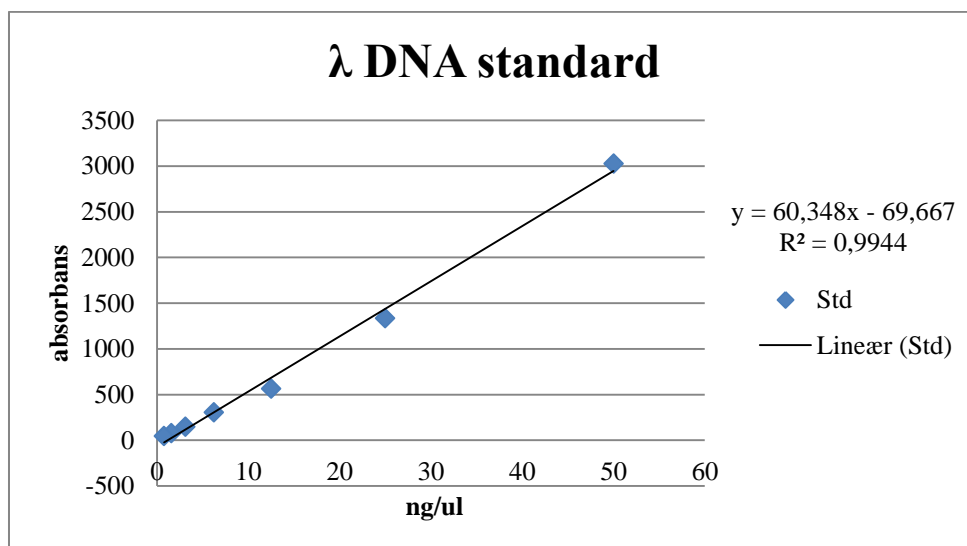
Lab. ingeniør

Denne rapport er elektronisk signert!

Vedlegg F

Standardkurve for kvantifisering med fluorescerende agent (PicoGreen)

Av følgende standard kurve for λ DNA standard fra PicoGreen resultatene, beregnes mengde genomisk DNA i hver prøve.



Figur 1: λ DNA standard. Standardkurven for fortynningsrekke av λ DNA standard viser god korrelasjon mellom fortynningene. Ufortynnet prøve er ekskludert, da denne ser ut til å gi metning i absorbansen. Av regresjonsligningen beregnes konsentrasjonen av DNA/ PCR- produkt i prøvene våre, 192 i alt.

Vedlegg G

Oppskrifter- medier, buffere og løsninger

G.1 Bufferer og løsninger

G.1.1 Diverse buffere

0,5 M EDTA, til 500 ml:

93,06 g EDTA (1M = 372, 24 g/mol) ble løst opp i ca. 400 ml MQ-vann

pH ble justert til 8,0 med NaOH

Løsningen ble sterilfiltrert og volum justert til 500 mL med MQ-vann. Deretter ble løsningen autoklaver og oppbevart ved romtemperatur.

TE- buffer, til 10 ml:

100 µl 1M TrisHCl –pH 8,0 (10 mM)

20 µl 0,5M EDTA (1 mM)

Sluttvolumet ble justeres til 10 ml med MQ-vann.

1x PBS, til 250 ml:

20 g NaCl (1,37 M)

0,5 g KCl (27 mM)

1,91 g Na₂HPO₄*2H₂O (43 mM)

0,5g KH₂PO₄ (14mM)

pH justeres til 7,2 og sluttvolumet ble justert til 250 ml MQ-vann

G.1.2 Løsninger og buffere til agarosegel-elektroforese

50 x TAE (Tris-acetat EDTA)

242 g 2 M Trizma®-base

57,1 mL 2 M Iseddik

100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0)

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 l.

Løsningen ble autoklavert (ved 121 °C i 15 min) og oppbevart ved romtemperatur.

10 mg/ml Etidiumbromid (EtBr)

1 g EtBr

100 ml MQ-vann

Løsningen ble langtidslagret i en lystett beholder (4 °C). EtBr må behandles med forsiktighet.

1 kb DNA ladder (per kjøring)

1 µL 1Kb DNA ladder (New England BioLabs)

1 µL 6X Gel loading dye (New England BioLabs)

4 µL 1 x TAE-buffer

G.1.2 Løsninger brukt for gjennomføring av DNA-isolering med (SOP2-001) Stool Bacteria DNA extaction

Bindingsbuffer (10 ml)

5,91 g Guanidine thiocyanat (5M)

1,5 ml 1M Tris HCL (150 mM)

150 µl 0,5 M EDTA (7,5 mM)

MQ-vann ble tilsett til et endelig volum på 10 ml.

Vaskebuffer I (10 ml)

6 g Guanidine hydrochloride (60%)

100 µl Triton-X100 (1% w/v)

1 ml TE-buffer (10 %)

Triton-X100 er svært viskøs, og matte derfor varmes forsiktig opp før pippetering.

MQ-vann ble tilsett til et endelig volum på 10 ml.

Vaskebuffer II (10 ml)

EtOH (70 %)

MQ-vann ble tilsatt til endelig volum på 10 ml.

Elueringsbuffer:

TE-buffer

De to andre prosedyrene som ble testet var kommersielle kit, og for oppskrift av reagensene henvises det derfor til prosedyremanualen for MagMAXTM Total Nucleic Isolation Kit, (Amion) og FastDNA SPIN kit for Soil (Qbiogene).

G.1.3 Løsninger og buffere brukt for gjennomføring av FISH

10 % SDS:

50 ml 20 % SDS ble løst i MQ-vann, og volum ble justert til 100 ml.

Anti-fade/ Monteringsløsning:

1 volum 1x PBS blandes til 1 volum glyserol (1:1)

p-Paraphenylenediamine ble tilsatt til en endelig konsentrasjon på 0,01 % .

3.0 % paraformaldehydløsning (10 ml):

0,3 g paraformaldehyd i 7 mL dH₂O

pH justeres til 11 med 10 mM NaCl.

3 ml 3x PBS tilsettes

pH justeres til pH 7,0 med HCl, og volum til 10 ml med MQ-vann.

Basert på andres erfaring ble løsningen lagret i kjøleskap i 2 uker.

Hybridiseringsbuffer (1000 µl):

350 µl Formamide (35 % formamid)

180 µl 5M NaCl (0,9 M)

20 µl 1M Tris pH 7,2 (20 mM)

1 µl 10 % SDS (0,01 %)

449 MQ-vann

Formamidekonsentrasjonen for FISH-probene var på forhånd optimalisert til 35 %.

Vaskebuffer (50 ml):

0,4 ml 5 M NaCl (40 mM)

1 ml 1 M Tris pH 7,2 (20 mM)

2,5 ml 0,1 M EDTA (5 mM)

50 µl 10 % SDS (0,01 %)

MQ-vann ble tilsatt til et totalt volum på 50 ml

Vaskebufferen ble laget i 50 ml Greiner rør og varmet opp til 46 °C før bruk.

G.2 Selektive dyrkningsmedium for metanogene arker

Tabell G.2.1 Methanogen Enrichment medium, Barker (Atlas 1993): Følgende oppskrift ble benyttet for tillaging av et medium for kultivering av metanogene organismer:

Kjemikalie	Mengde per L
NH ₄ Cl	1,0 g
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	0,4 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
Methanol (Sterilfiltrert)	20,0 ml
CaCO ₃	20,0 g
dH ₂ O	Til 1 liter

NH₄Cl, K₂HPO₄ x 3H₂O og MgCl₂ x 6H₂O blandes med MilliQ vann (?) til et endelig volum på 1 L, kokes forsiktig opp og fordeles på 2 flasker a 500 ml. Flaskene autoklaveres. Methanol og CaCO₃ tilsettes etter autoklaving og avkjøling til RT (25 °C) pga hhv dens lave kokepunkt og utfelling.

Tabell G.2.2 Standard næringsmedium-SM (Cooney et al. 2007) Følgende oppskrift ble benyttet for tillaging av et medium for kultivering av metanogene organismer:

Kjemikalie	Mengde per L
Glucose	10,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄	1,67 g
NH ₄ Cl	0,5 g
MgCl x 6H ₂ O	0,18 g
Yeast extract	2,0 g
Peptone	2,0 g
dH ₂ O	Til 1 liter

Modifikasjoner fra oppskrift: Vi benyttet ikke antifoam. 0,02 ml antifoamA (sigma) bør tilsettes om skummdannelse forekommer

Alle ingrediensene blandes i MilliQ vann til et endelig volum på 1 L, kokes forsiktig opp og fordeles på 2 flasker a 500 ml. Flaskene autoklaveres.