

Skład konsorcjum bakterii metanogennych zasiedlających masę fermentacyjną na podstawie oceny polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (tRFLP) genu *mcrA*

Composition of methanogenic bacteria in fermentation mass based on the evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (tRFLP) of *mcrA* gene

AGATA GRYTA, MAGDALENA FRĄC, KAROLINA OSZUST, NINA BILIŃSKA-WIELGUS, PAWEŁ SZARLIP
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Praca naukowa finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu LIDER 2011-2014. Scientific work supported by National Centre of Research and Development – LIDER Programme 2011-2014.



W wielu środowiskach beztlenowych metanogeneza jest kluczowym procesem biochemicznym, prowadzącym do uzyskania CH₄. Ten specjalny proces jest przeprowadzany przez mikroorganizmy *Archaeobacteriales*, posiadające zdolność produkcji metanu (CH₄) z podstawowych substratów t.j. CO₂, H₂, oraz związków organicznych typu C1: octan, mrówczan, metanol, metyloaminy. Metanogeny są obecne w wielu rodzajach środowisk beztlenowych (t.j. osady ściekowe, pofermentacyjne). Izolacja oraz hodowla mikroorganizmów metanogennych jest trudna, dlatego też zastosowanie metod molekularnych niezależnych od etapu hodowli ułatwia badania tej grupy. W badaniach genetycznych często stosowanym markerem molekularnym metanogenów jest gen *mcrA* kodujący podjednostkę α-metylokoenzymu M (MCR; EC2.8.4.1). Jest to kluczowy enzym procesu metanogenezy, redukujący grupę metylową związaną z koenzymem M do metanu. Występowanie tego enzymu jest unikalne dla grupy metanogenów, podczas gdy pozostałe enzymy biorące udział w metanogenezie mogą być obecne u innych grup mikroorganizmów wykorzystujących substraty typu C1.

Metoda: W celu określenia składu konsorcjum metanogenów zasiedlających masę fermentacyjną zastosowano technikę analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (t-RFLP). T-RFLP jest techniką opartą na reakcji PCR, produkty amplifikacji są poddawane trawieniu enzymami restrykcyjnymi, a następnie uzyskane fragmenty restrykcyjne (t-RFs) są rozdzielane przy użyciu analizatora genetycznego.

Materiał do badań: Wyizolowano DNA z masy fermentacyjnej (FM 1- FM 8) pobranej na różnych etapach procesu fermentacji. W następnym kroku przeprowadzono reakcję PCR dla genu *mcrA* przy użyciu następującej pary starterów: *mcrA*-for (5'-GGTGGTGMGGDTTCACMCARTA-3'), *mcrA*-rev (5'-CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT-3') oznakowany fluorescencyjnie 6-FAM. Oczyszczony produkt reakcji PCR poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym *Hae*III. Produkty trawienia enzymem zostały oczyszczone a następnie rozdzielone i zwizualizowane przy użyciu analizatora genetycznego ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Wyniki

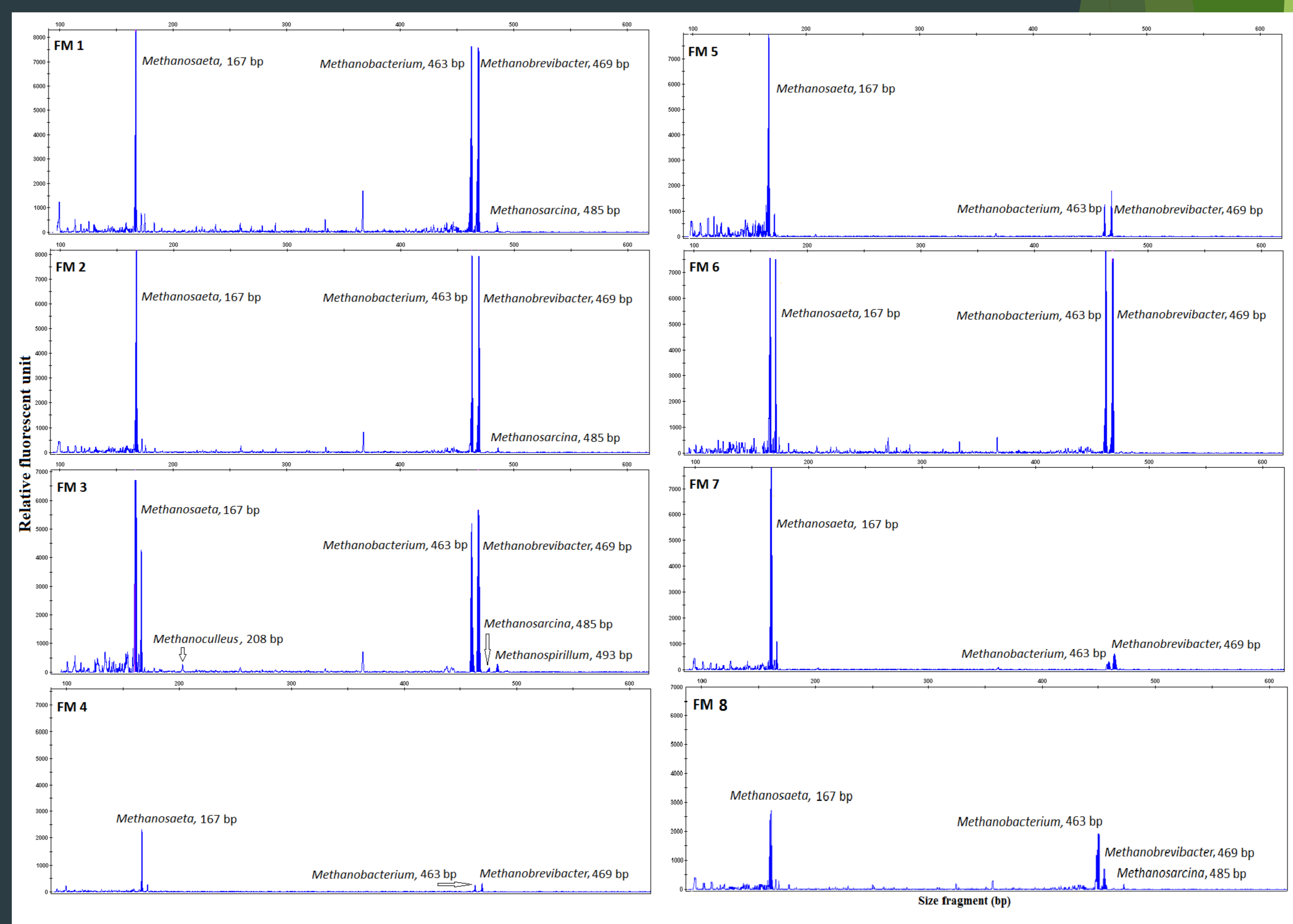
Table 1. Measured and predicted T-RF lengths (bp) defined on based restriction *mcrA* genes endonucleases *Hae*III (Nikolausz M., Walter R., Strauber H., Liebetrau J., Schmidt T., Meisinger S., Bratfisch P., Gunter U., Richnow H., (2013). Evaluation of stable isotope fingerprinting techniques for the assessment of the predominant methanogenic pathways in anaerobic digesters. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 2251-2262.)

Organism	<i>Hae</i> III	
	Predicted T-RF (bp)	Measured T-RF (bp)
<i>Methanosaeta</i>	175	167
<i>Methanoculleus</i>	214	208
<i>Methanobacterium</i>	467	463
<i>Methanobrevibacter</i>	469	469
<i>Methanosarcina</i>	490	485
<i>Methanospirillum</i>	493	493

Metanogenne *Archaea* zostały wykryte przy użyciu amplifikacji genu *mcrA* na wszystkich etapach procesu fermentacji (FM 1- FM 8). Przy użyciu analizy t-RFLP dokonano charakterystyki różnorodności konsorcjum metanogenów.

Uzyskane profile - „fingerprinting”- dla metanogenów przedstawiono na Rys. 1. Odmienne profile genu *mcrA* dla każdej próbki, oznacza różnice ilościowe i jakościowe w składzie populacji metanogennych *Archaea*.

Analiza t-RFLP pozwoliła na uzyskanie 6 głównych t-RFs dla fragmentów DNA o długości: (167pz, 208pz, 463pz, 469pz, 486pz, 493pz). Na podstawie analizy profilu oraz danych literaturowych przypisano wykryte t-RFS do poszczególnych rodzajów bakterii metanogennych (Tabela 1.)



Rysunek 1. Profile fragmentów restrykcyjnych (t-RFs) wskazujące podobieństwa i różnice pomiędzy składem konsorcjów metanogennych *Archaea* występujących w masie fermentacyjnej (FM 1 -FM 8) pobieranej na różnych etapach procesu fermentacji.