

BioGrout - microbiologische processen

Alette Langenhoff

Titel

BioGrout - microbiologische processen

Kenmerk

0909-0032-me

Pagina's

12

Trefwoorden

Type hier de trefwoorden

Samenvatting

Type hier de samenvatting

Referenties

Type hier de referenties

Versie	Datum	Auteur	Paraaf	Review	Paraaf	Goedkeuring	Paraaf
	09-03-2009	A.A.M. Langenhoff		J.J. Groot		L.A. van de Kuil	

Status

definitief

Inhoud

1 Inleiding	1
2 Materiaal en Methoden	2
3 Resultaten	5
4 Conclusies	8
Bijlage(n)	
A Genkopieën	9

1 Inleiding

Het BioGrout proces is een ontwikkeling van Deltares waar in-situ carbonaat wordt neergeslagen. De bedoeling van dit carbonaat neerslag is verhoging van de sterkte, stijfheid en /of lijm eigenschappen van zandgronden. In dit project wordt de biologische denitrificatie gebruikt als agent voor de productie van het carbonaat. De denitrificerende bacteriën oxideren organische zuren met nitraat als elektronen acceptor tot CO₂ en N₂ gas. Op dit moment is er weinig bekend over de microbiologie in het BioGrout proces.

Doel

Het doel van het experiment was de micro-organismen die een rol spelen bij de vorming van de BioGrout op verschillende tijdstippen te kwantificeren en de bacteriële veranderingen te analyseren. Dat is belangrijk voor het begrijpen van de processen bij het BioGrout experiment.

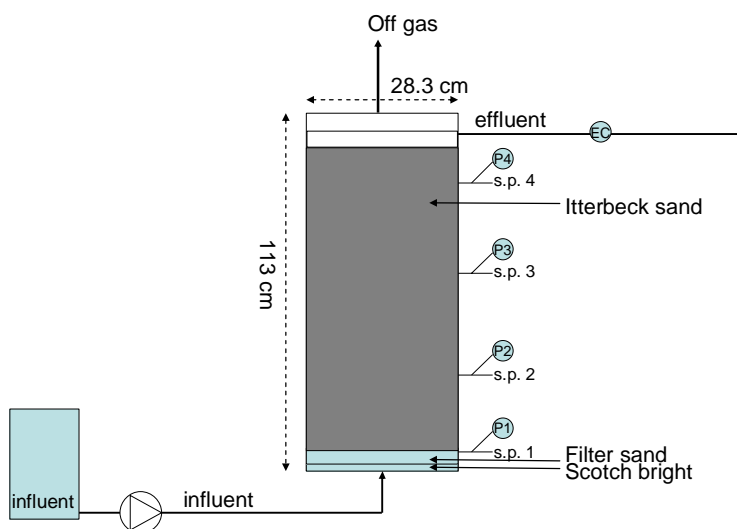
2 Materiaal en Methoden

Micro-organismen

De denitrificerende bacteriën zijn essentieel in de stikstofcyclus, want ze kunnen nitraat als elektronenacceptor gebruiken en omzetten in stikstofgas (N_2). Dit anaërobe ademhalingsproces vindt vooral plaats in een zuurstofloze omgeving. De denitrificatie tot stikstof gaat via enkele stappen: $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$. Elke reactiestap wordt door een specifiek enzym gekatalyseerd. Om deze enzymen te kunnen produceren bezitten de micro-organismen specifieke genen. De genen voor de enzymen nitraat-reductase en nitriet-reductase zijn in dit onderzoek geselecteerd als indicator voor nitraat-reducerende bacteriën en de optredende processen.

Monsters

Wij hebben per monsterpunt 20 ml watermonster van de BioGrout II reactor uit Delft gekregen. Deze reactor is in febr. 2009 gestart. De monsters zijn op 16 april, 22 april en 5 mei verzameld, waarbij uit alle 4 de monsterpoortjes van de BioGrout II reactor bemonsterd (Fig. 1).



Figuur 1. Schema van de BioGrout II reactor

DNA Analyses

DNA isolatie

DNA is in duplo geïsoleerd m.b.v. de Fast DNASPIN kit for soil (Q BIOgene, Cambridge, United Kingdom). Daarbij is het watermonster van de BioGrout II reactor in 2-en gesplitst en is 10 ml gefiltreerd per filter (2 μm poriegrootte). In totaal zijn er dus 2 filters per monsterpunt. Elk filter werd vervolgens verdeeld in twee stukken en DNA is geïsoleerd uit een helft van elk filter, dus in feite van 5 ml watermonster. Voor de DNA isolatie zijn de filters behandeld volgens de kit-instructies. Het geïsoleerde DNA is verdund (10 of 100 keer) zodat ze voor de real-time PCR analyses konden worden gebruikt. Hoewel in de DNA-isolatieprocedure een

zuiveringsstap inbegrepen is, zijn er nog steeds onzuiverheden in de DNA-oplossing aanwezig. Deze onzuiverheden kunnen de PCR-analyse storen. Door het DNA te verdunnen, minimaliseren we deze storende invloed. De hoeveelheid DNA is hierbij voldoende voor de PCR analyses.

Real-time PCR: primers en condities

Het geïsoleerde DNA is gebruikt voor een real-time PCR analyses. Dit is een methode waarbij een polymerasekettingreactie wordt gemonitord in "real time". Deze techniek wordt gebruikt om gelijktijdig een specifiek molecuul van het DNA ('target DNA') te vermenigvuldigen ('amplificeren') en te kwantificeren. Zo kan specifiek DNA worden gedetecteerd en tegelijk gekwantificeerd.

Er zijn twee variaties op deze methode:

Een fluorescente kleurstof wordt in het gevormde dubbelstrengs-DNA geïncorporeerd;

Een gemodificeerd oligonucleotide van DNA ('de probe') wordt gebruikt. Wanneer deze probe hybridiseert met complementeer target-DNA ontstaat een fluorescentie die wordt gedetecteerd.

Wij hebben de eerste methode gebruikt. Om de real-time PCR-reactie geschikt te maken voor bepaalde specifieke target micro-organismen hebben we specifieke "primers" gebruikt en de PCR condities bepaald. De gebruikte primers en condities staan weergegeven in tabel 1 en 2.

Tabel 1. Primers sequenties voor de verschillende groepen micro-organismen.

Micro-organisme	Target	Primers	Conditie
Totaal aantal bacteriën	Eubacterieel 16S rDNA	519F 5'-GCC AGC AGC CGC GGT AAT-3' 907R 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'	Annealing bij 58 °C 35 cyclus
Denitrificerende bacteriën	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ Nitraat-reductase(NAR-gen)	NARG F 5'-TCG CC(C/G) AT(C/T) CCG GC(C/G) ATG TC-3' NARG R 5'-GAG TTG TAC CAG TC(A/G)GC(C/G)GA(C/T) TC(C/G) G-3'	Annealing bij 63 °C 46 cyclus
	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ Nitriet-reductase (NIR-gen)	NIRS4Q F 5'-GT(C/G) AAC G(C/T)(C/G) AAG GA(A/G) AC(C/G) GG-3' NIRS6Q R 5'-GA(C/G) TTC GG(A/G) TG(C/G) GTC TT(C,G) A(C/T)G AA-3'	

Tabel 2 De gebruikte PCR condities

Real-time PCR programma voor totaal bacteriën

	Temperature	Tijd
Stap 1:	95 °C 95 °C 94 °C	30 sec 1 min 3 min
Stap 2:	herhaal deze stap 35 keer 94 °C X °C 72 °C	30 sec 30 sec 30 sec
Stap 3:	72 °C 95 °C	5 min 1 min

Real-time PCR programma voor denitrificerende bacteriën

	Temperature	Tijd
Stap 1:	95 °C	15 min
Stap 2:	herhaal deze stap 6 keer 95 °C 63°C-1°C/cycles 72 °C 80 °C	15 sec 30 sec 30 sec 30 sec
Stap 3:	herhaal deze stap 40 keer 95 °C X °C 72 °C 80 °C	15 sec 30 sec 30 sec 30 sec
Stap 4:	Dissociation stap: 80 °C □ 95 °C	

Real-time PCR BioRad Mix

Voor een Real-time PCR is de volgende mix van chemische stoffen en DNA nodig:

25 □l totaal volume:

12,5 □l BioRad master mix Sybr Green

0,5 □l primer forward (10 □M)

0,5 □l primer reverse (10 □M)

6,5 □l MQ

5 □l DNA oplossing

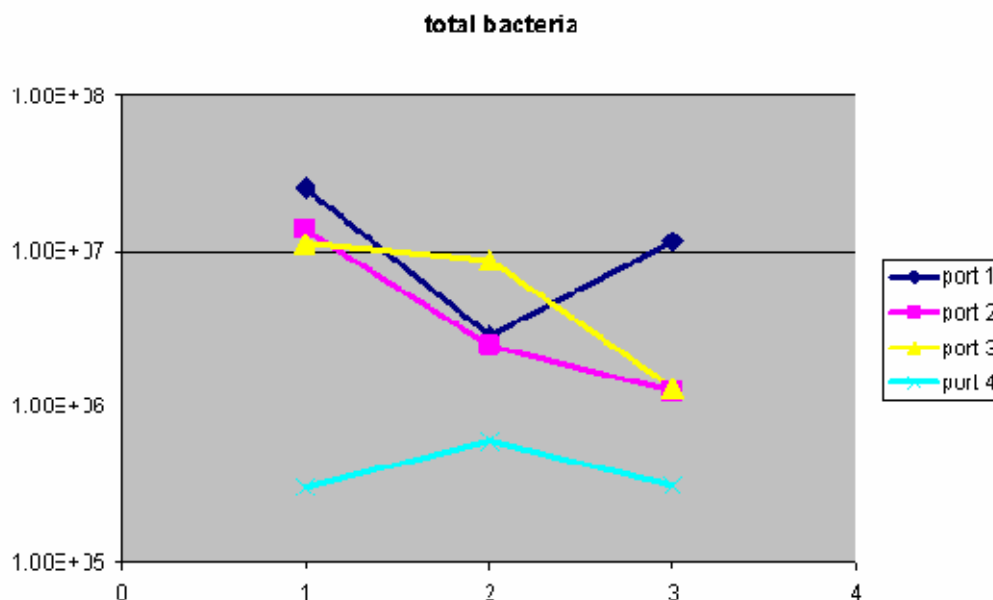
Real-time PCR calibratielijnen

Voor een controle op de kwaliteit en de efficiëntie van de real-time PCR analyses zijn calibratielijnen gemaakt die specifiek zijn voor elk groep micro-organismen.

3 Resultaten

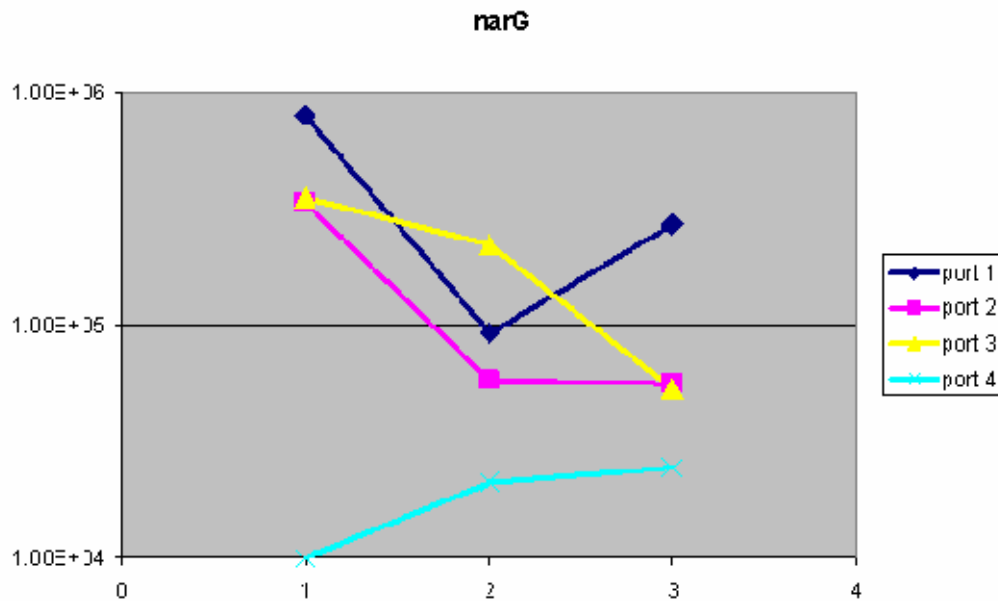
Het DNA is succesvol uit de monsters geïsoleerd, zodat de verdunningen (10x of 100x) voor de uitvoering van de real-time PCR zijn gebruikt. De detectielimiet van de gebruikte assays was laag. De assays voor totaal bacteriën had een zeer lage detectielimiet van ongeveer 10 genkopieën/ml monster. De assays voor de nitraat- en nitrietreducerende bacteriën (*narG* en *nirS* genen) hebben een detectielimiet van ongeveer 10^4 genkopieën/ml monster. De efficiëntie van de real-time PCR analyses was tussen 104% en 120%, dte betekent dat de assays efficiënt, reproduceerbaar en betrouwbaar zijn.

In alle BioGrout II monsters zijn nitraat- en nitrietreducerende bacteriën gedetecteerd, zie de resultaten in bijlage A. Het aantallen kopieën 16S rDNA genen van bacteriën varieerden van $<10^5$ genkopieën/ml monster, tot ca. 10^7 genkopieën/ml monster (Fig. 2).



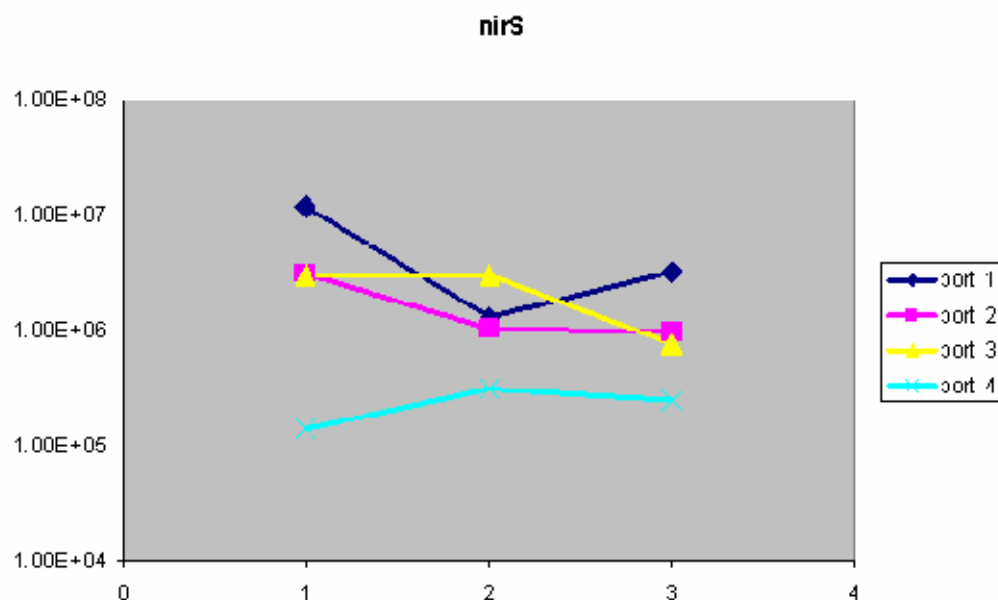
Figuur 2. Totaal aantal 16S rDNA genkopieën/ml van bacteriën in de BioGrout II monsters van de verschillende monsterpunten in de tijd.

De concentraties van de *narG* genkopieën/ml waren significant lager dan die van de totaal bacteriën en varieerden van $<10^4$ tot ca. 10^5 genkopieën/ml monster (Fig. 3).



Figuur 3. Totaal aantal *narG* genkopieën/ml van nitraatreducerende bacteriën in de BioGrout II monsters van de verschillende monsterpunten en tijden.

De concentraties van de *nirS* genkopieën/ml waren niet veel lager dan die van de totaal bacteriën en varieerden van $<10^5$ tot ca. 10^7 genkopieën/ml monster (Fig. 4). Dit betekent dat ze slechts een klein deel uitmaken van de totale bacteriële populatie in de kolom.



Figuur 4. Totaal aantal *nirS* genkopieën/ml van nitraatreducerende bacteriën in de BioGrout II monsters van de verschillende monsterpunten en tijden.

Uit de literatuur is bekend dat *narG* en *nirS* genen zijn waarvan er normaal gesproken één genkopie in een bacterieel cel aanwezig is (REF). Dit is niet altijd het geval, want er kunnen in

een bacterie meerdere kopieën van een gen aanwezig zijn. Dan is het meten van de genen een overschatting van de microbiële cellen. De monsters van de bovenste poort (nr 4) hadden meestal lagere bacterieconcentraties dan de monsters uit de onderste poort (nr 1), waar de groeisubstraten en nutriënten het meest geconcentreerd waren.

Door een procentuele representatie van de real-time PCR data, krijgen we een indruk van het relatieve voorkomen van de denitrificerende bacteriegroepen in de BioGrout II monsters (tabel 3).

Tabel 3. Percentage genen van specifieke bacteriegroepen ten opzichte van de totale concentratie van bacterie in de BioGrout II monsters.

	narG %			nirS %		
	16-Apr	22-Apr	6-May	16-Apr	22-Apr	6-May
poort 1	3.1	3.2	2.3	45.9	45.0	27.8
poort 2	2.5	2.3	4.4	22.7	42.0	75.3
poort 3	3.1	2.5	4.0	27.3	34.7	57.3
poort 4	3.3	3.5	7.9	45.7	51.9	78.0

Uit tabel 3 blijkt dat er een grote variatie is in de percentages gedetecteerde denitrificerende bacteriën. Het percentage genkopieën van de nitraatreducerende bacteriën is ca. 2% tot 7.9% van het totaal aantal bacteriële genkopieën. Bij de nitrietreducerende bacteriën verloopt het percentage van 22% tot 78% van het totaal aantal bacteriële genen. In de tijd lijken de denitrificerende bacteriën minder te worden in de monsters van het laagste poortje (poort 1). Daar is de hoogste concentratie van nutriënten. In de bovenste poort (poort 4) worden de denitrificerende bacteriën meer in de loop van de tijd. Daar is de laagste nutriëntenconcentratie. Dit betekent dat de bacteriën zich in de kolom verspreiden in de loop van de tijd, want het aantal nitraat en nitrietreducerende genen neemt toe in de tijd.

Het totaal aantal bacteriën wordt minder met het verloop van de tijd (figuur 2). Dat is vooral duidelijk in de monsters van poort 2 t/m 4. Het zelfde wordt ook bij de nitraat- en nitrietreducerende bacteriën geobserveerd (fig. 3 en 4).

Al met al zijn geen hoge aantallen specifieke genen gevonden in de kolom, wat betekent dat de gewenste microbiële processen in de kolom niet optimaal verlopen

4 Conclusies

DNA extracties, gekoppeld aan real-time PCR analyses zijn bruikbaar om de hoeveelheid bacteriën de kolom aan te tonen. Dit geldt voor het aantal totaal bacteriën en ook voor de hoeveelheden nitraat- of nitrietreducerende bacteriën.

De microbiële populatie in de kolommen bestaat voor minder dan 10% uit denitrificerende bacteriën. Dit zijn de bacteriën die het eerste omzettingsproces in de kolom moeten uitvoeren. Hierdoor verlopen de denitrificerende processen in de kolom minder optimaal dan gewenst.

Gedurende het kolomexperiment nemen de aantallen denitrificerende bacteriën niet toe in de tijd. Dit zou je normaal gesproken wel verwachten bij groei van bacteriën. Ook dit geeft aan dat de omzettingsprocessen niet optimaal verlopen.

A Genkopieën

Tabel A1. Overzicht van genkopieën/ml in de BioGrout II kolommonsters van de geteste functionele bacteriegroepen.

totaal bacteriën (genkopieën/ml monster)			
	16-Apr	22-Apr	6-May
poort 1	2.57E+07	2.87E+06	1.15E+07
poort 2	1.37E+07	2.47E+06	1.27E+06
poort 3	1.12E+07	8.75E+06	1.34E+06
poort 4	3.07E+05	5.95E+05	3.11E+05

narG (genkopieën/ml monster)			
	16-Apr	22-Apr	6-May
poort 1	7.98E+05	9.14E+04	2.70E+05
poort 2	3.37E+05	5.79E+04	5.63E+04
poort 3	3.51E+05	2.22E+05	5.33E+04
poort 4	1.00E+04	2.11E+04	2.46E+04

nirS (genkopieën/ml monster)			
	16-Apr	22-Apr	6-May
poort 1	1.18E+07	1.29E+06	3.21E+06
poort 2	3.13E+06	1.04E+06	9.56E+05
poort 3	3.06E+06	3.04E+06	7.66E+05
poort 4	1.40E+05	3.09E+05	2.43E+05