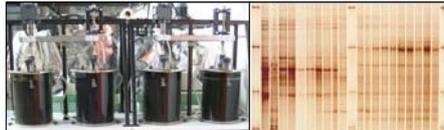


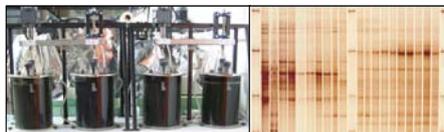
Kultivierungsunabhängige Untersuchungen zur
Vielfalt mikrobieller Gemeinschaften aus
experimentellen Biogasanlagen
unter besonderer Berücksichtigung von Clostridien



Anja B. Dohrmann und Christoph C. Tebbe
vTI – von Thünen Bundesforschung
Institut für Biodiversität
Braunschweig



Die Suche nach *Clostridium botulinum* in
experimentellen Biogasanlagen



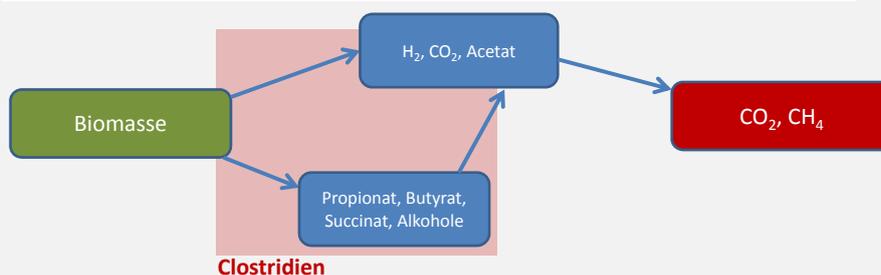
Anja B. Dohrmann und Christoph C. Tebbe
vTI – von Thünen Bundesforschung
Institut für Biodiversität
Braunschweig



Forschungsprojekt (2005 bis 2007)¹

- Clostridien sind wichtige, konstant vorkommende mikrobiologische Funktionsträger in Biogasreaktoren (bis zu 50 % aller Bakterien!)
- Clostridien beinhalten auch hoch-pathogene bzw. toxische Vertreter, wie *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, und *Clostridium botulinum*

Kommt *Clostridium botulinum* in Biogasreaktoren vor?



¹gefördert durch das Niedersächsische Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung. Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Technologie (Team Prof. Weiland) und dem Institut für Agrarökologie (Team Prof. Tebbe) der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)

Kultivierungsunabhängige DNA-Analysen

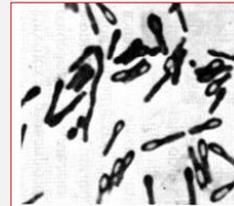
zur Charakterisierung der Bakterienvielfalt und zur
Suche nach *Clostridium botulinum*



Experimentelle Biogasanlage
Institut für Technologie, FAL, Prof. Weiland

Kultivierungsunabhängig: Warum?

- Klassische Verfahren: Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen in/auf Nährmedien
- Anaerobe Kultivierung: experimentell aufwendig, langsam und teuer
- Kultivierung pathogener Bakterien erfordert hohe Sicherheit (L2 bzw. L3 Labor)
- Direkte DNA Extraktion liefert das gesamte genetische Programm („Metagenom“) aus dem Biogasreaktor
- Nachweis erfolgt unabhängig von Kultivierbarkeit oder Pathogenität
- Spezifische Gene lassen sich aus dem Biogas-Reaktor Metagenom durch PCR-Verfahren quantifizieren und differenzieren



Kultivierungsunabhängig: Warum?

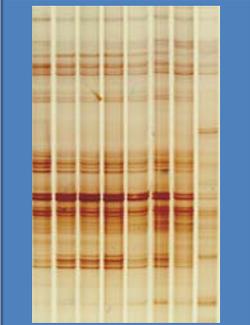
- Hinweis auf pathogene Bakterien kann ohne Risiken gewonnen werden
- Ethisch vertretbarer Weg, um nach *C. botulinum* in zahlreichen Umweltproben zu suchen (keine Mäuseversuche!)



16S rRNA Gene

Der Goldstandard für die Suche nach Bakterien

- Kommt in allen Bakterien vor
- Die Ähnlichkeit der Gene korreliert mit Verwandtschaft
- Aus Umweltproben leicht nachweisbar durch PCR
- Durch qPCR auch quantifizierbar
- Durch phylogenetische Analysen schnelle Eingruppierung eines unbekanntes Bakteriums zu bereits bekannten Vertretern
- Kann für genetisches Fingerprinting mikrobieller Gemeinschaften aus Umweltproben genutzt werden (**SSCP**, DGGE, TRFLP)

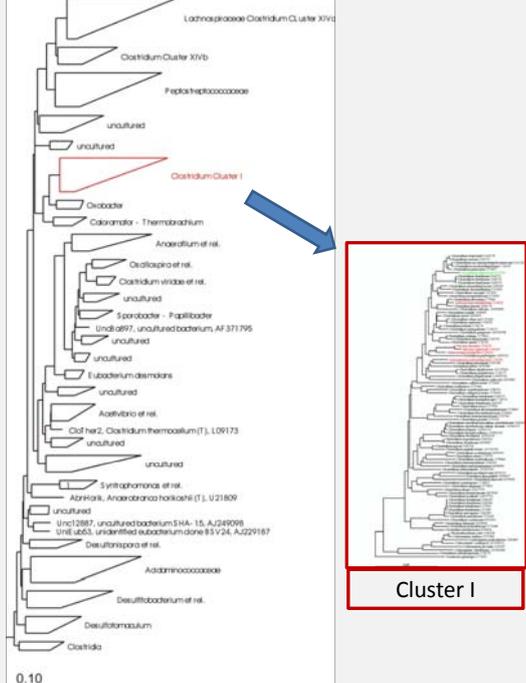


SSCP-Profil
aus einer Umweltprobe
Jede Bande zeigt ein anders 16SrRNA Gen an.
Fingerprint einer Bakterien-Gemeinschaft

- **ABER**
Eine Differenzierung von pathogenen und nicht-pathogenen Vertretern häufig nicht möglich
- kein direkter Nachweis von Toxinen oder Pathogenität

16S rRNA Gene

Phylogenetischer Baum mit Clostridien und Verwandten



Es gibt viele Bakterien mit dem Namen Clostridium (ca. 150 Arten) Historisch bedingt!

Nicht immer sehr miteinander verwandt

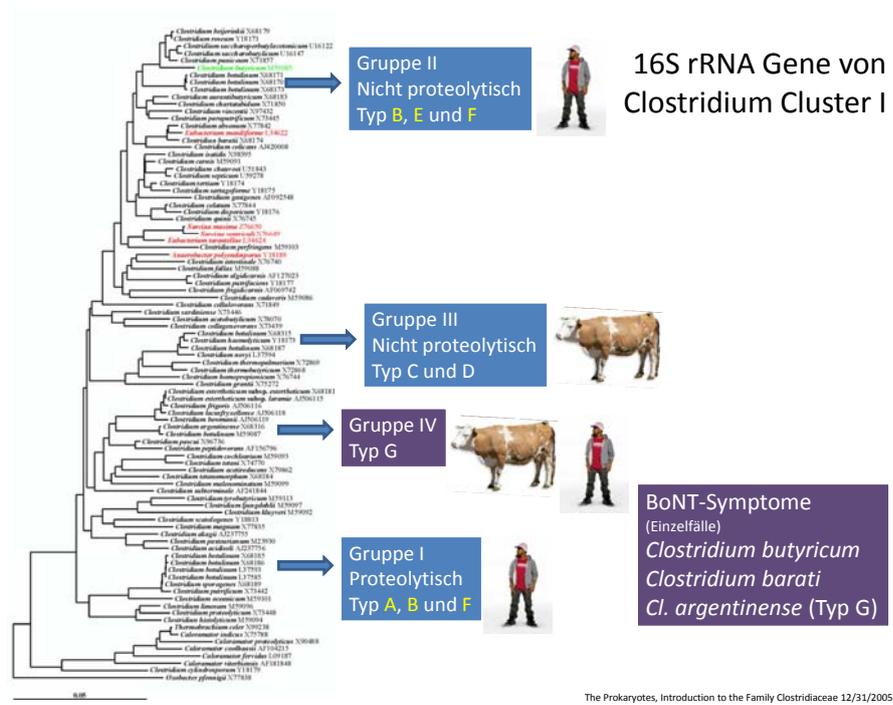
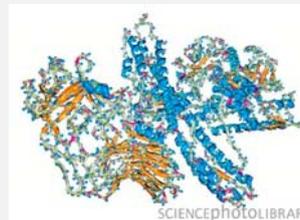
Clostridium sensu stricto
eigentliche Clostridien
mit 73 Arten, darunter alle pathogenen Vertreter wie *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, oder *Clostridium tetani*

Cluster I

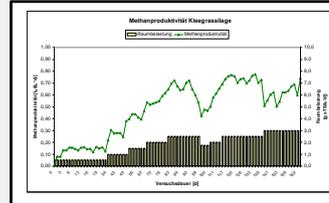
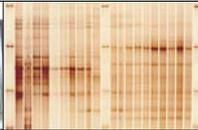
The Prokaryotes, Introduction to the Family Clostridiaceae 12/31/2005

Clostridium botulinum (Cb)

- Phylogenetisch ist Cb keine „Art“!
- Heterogene Gruppe von Neurotoxin (BoNT) bildenden Clostridien innerhalb von Clostridium Cluster I
- 16S rRNA nur grobe Indikation
- Serologische Gruppen A bis G
- Nachweis serologisch über ELISA (Toxine, Differenzierung) bzw. Mäusetest (Symptome)
- **ABER**
Neue PCR Systeme erlauben multiplex qPCR Nachweise und Differenzierung von BoNT-Genen (für BoNT A bis G) (Kirchner et al., 2010, AEM 76: 4387-4395)



Experimentelle Analysen



Kleegrassilage
Maissilage
Hühnertrockenkot
Schweinegülle
Rindergülle

mesophil (37°C)
thermophil (55 °C)

PCR
qPCR

BoNT Gene
16S rRNA Gene
- alle Bakterien
- Clostridium Cluster I

Nachweis und Differenzierung von BoNT Genen aus Material der experimentellen Biogasreaktoren

Gene für BoNT A, B, E, F

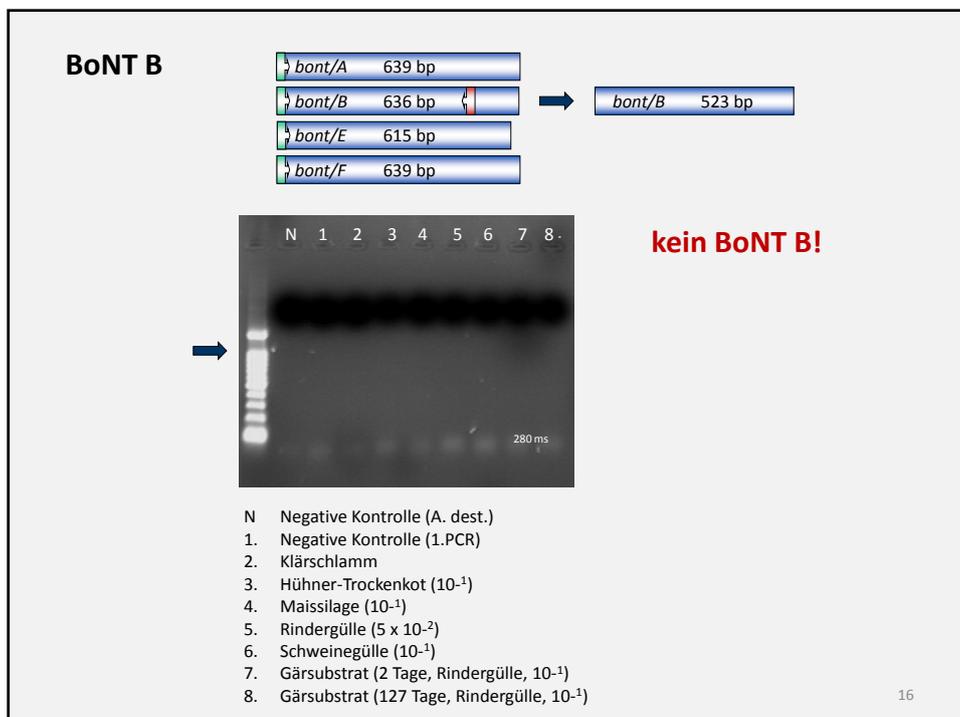
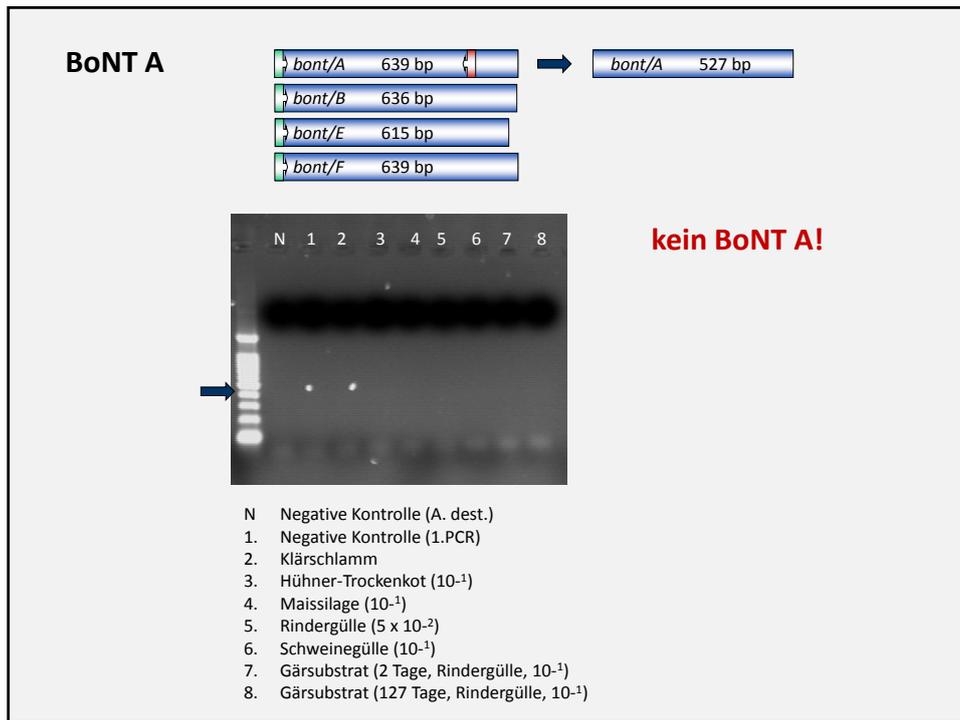


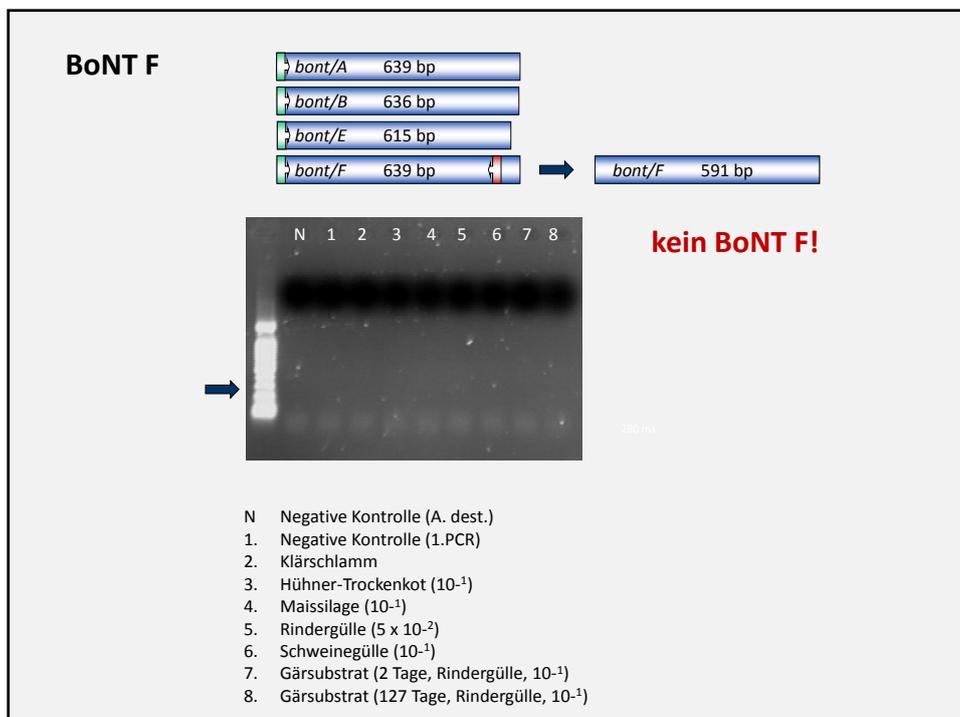
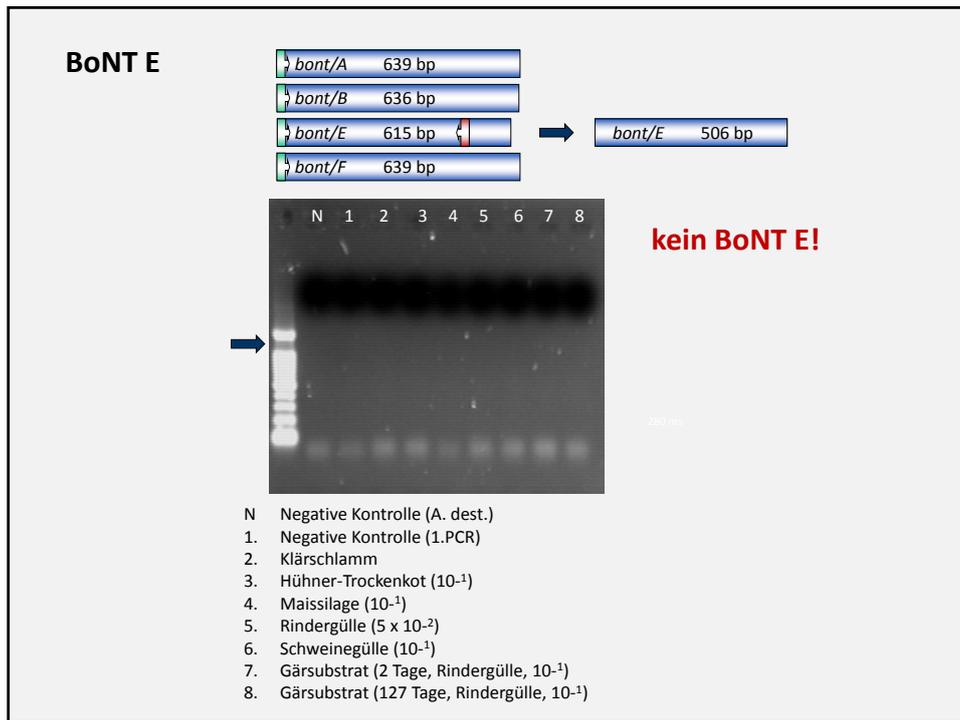
Universeller
Vorwärts-Primer



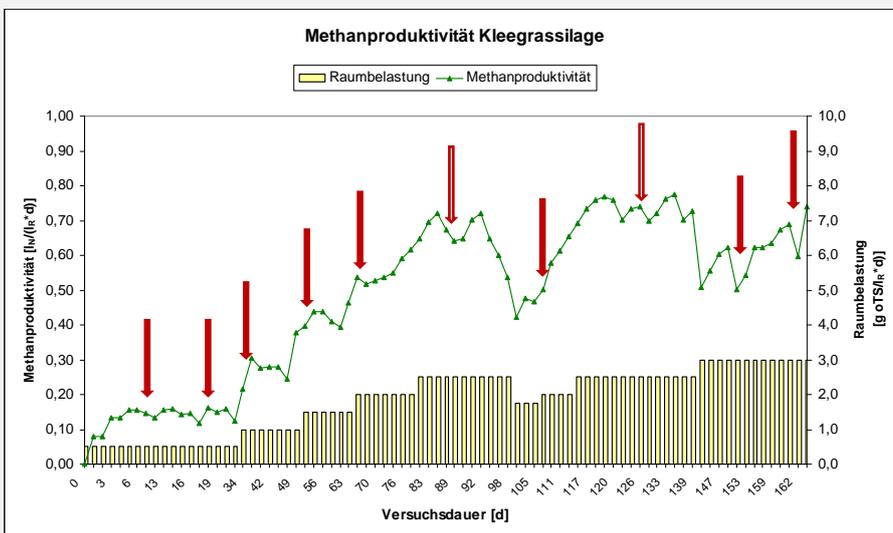
Spezifische
Rückwärts-Primer

Fach P, et al. 2002. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France . Appl. Environ. Microbiol. 68: 5870-5876

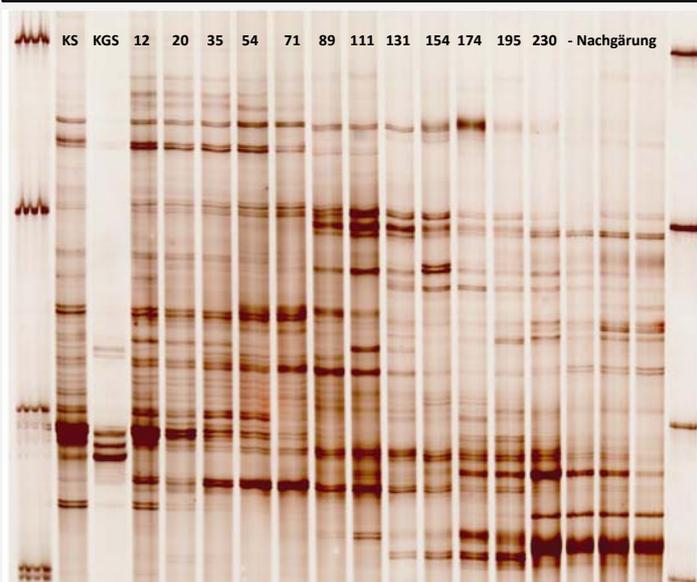


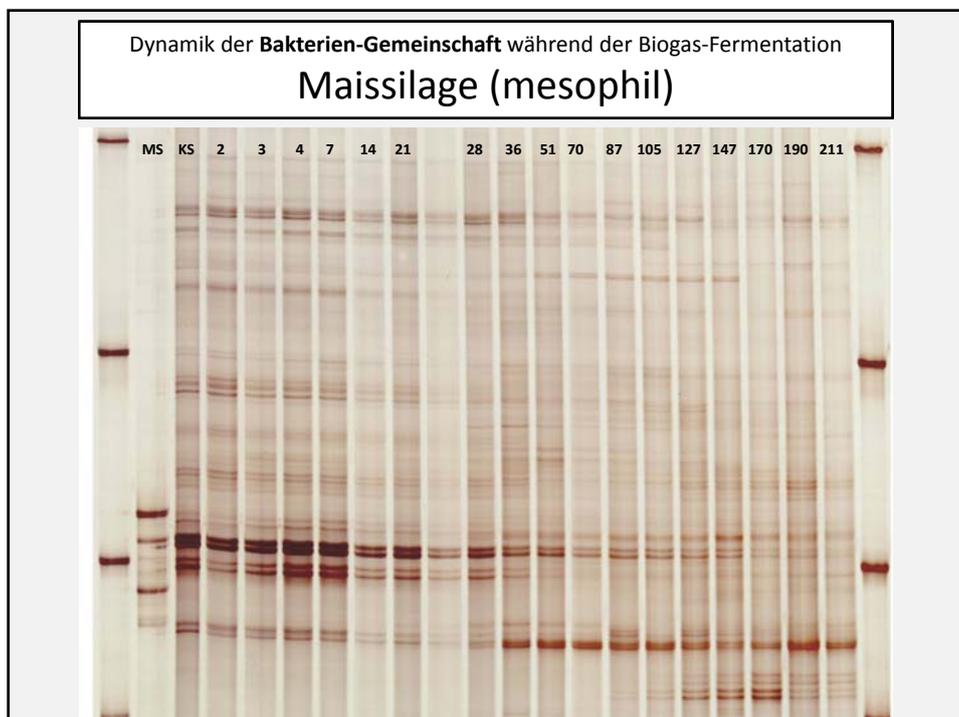
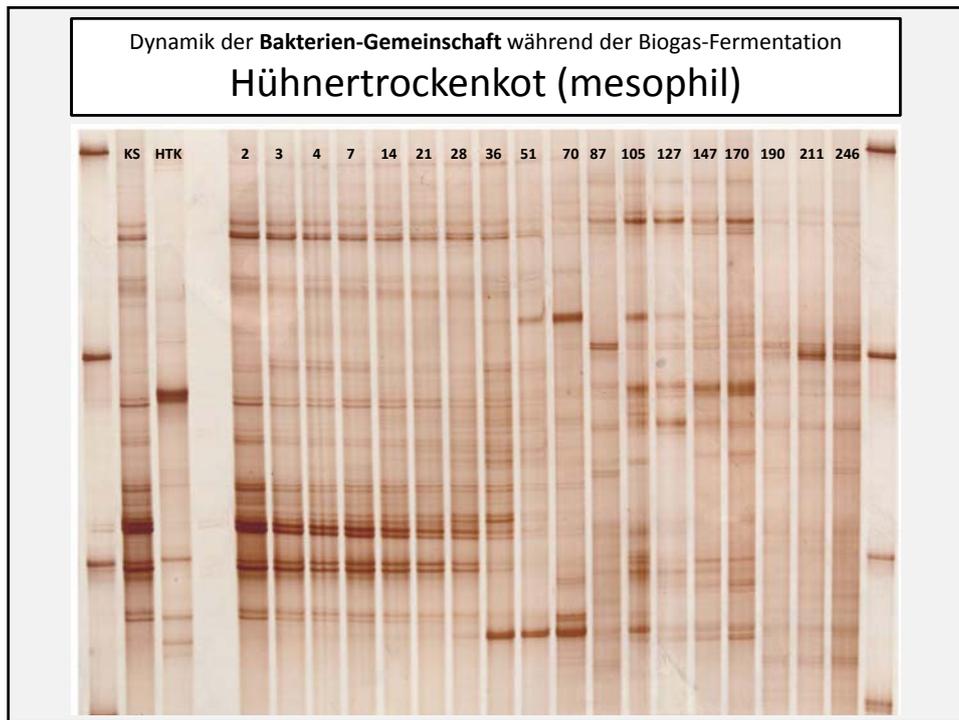


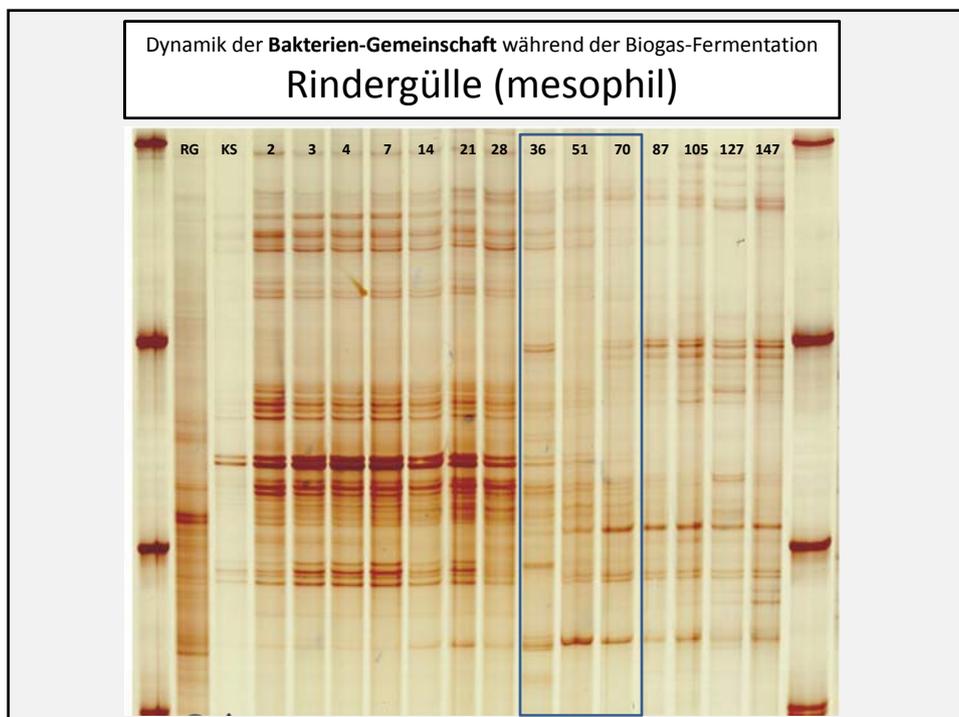
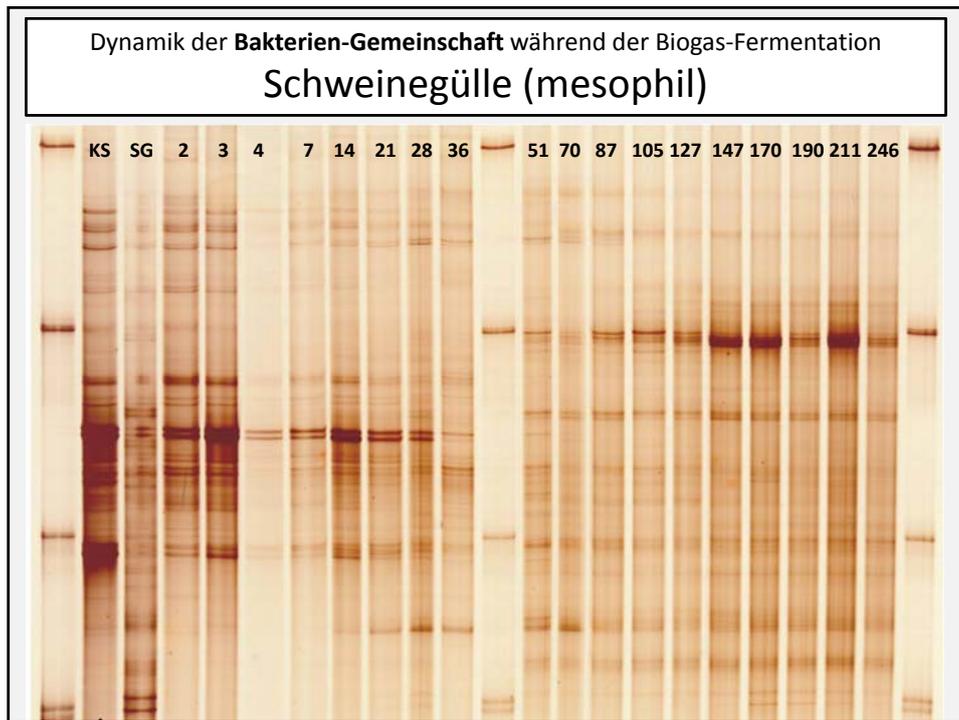
Wie verändern sich die Bakterien- und Clostridien-Gemeinschaften während der Biogasproduktion?

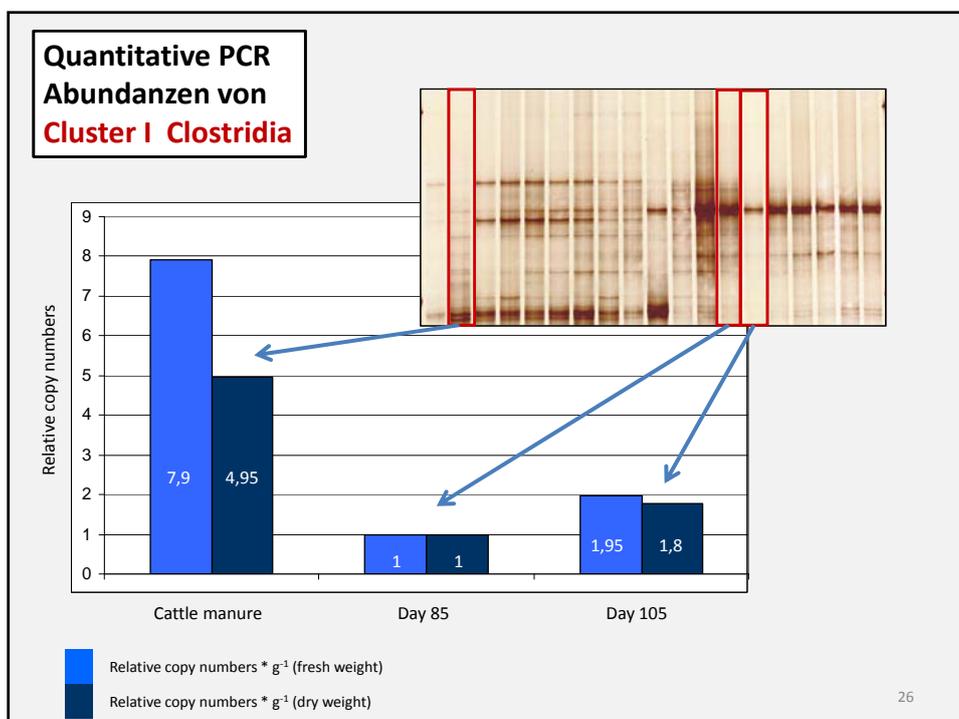
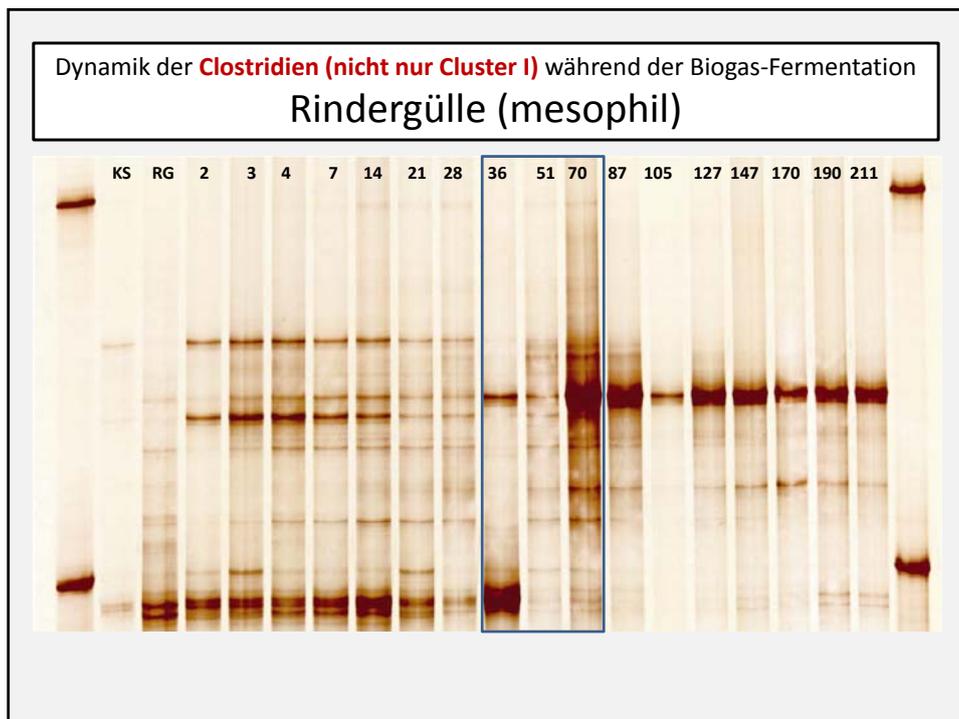


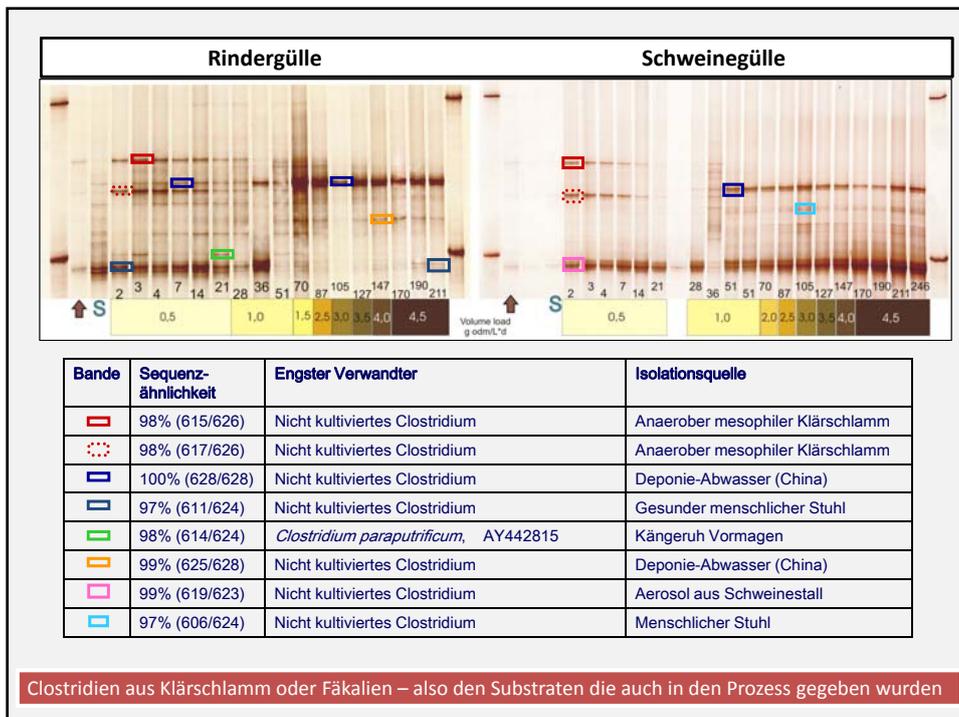
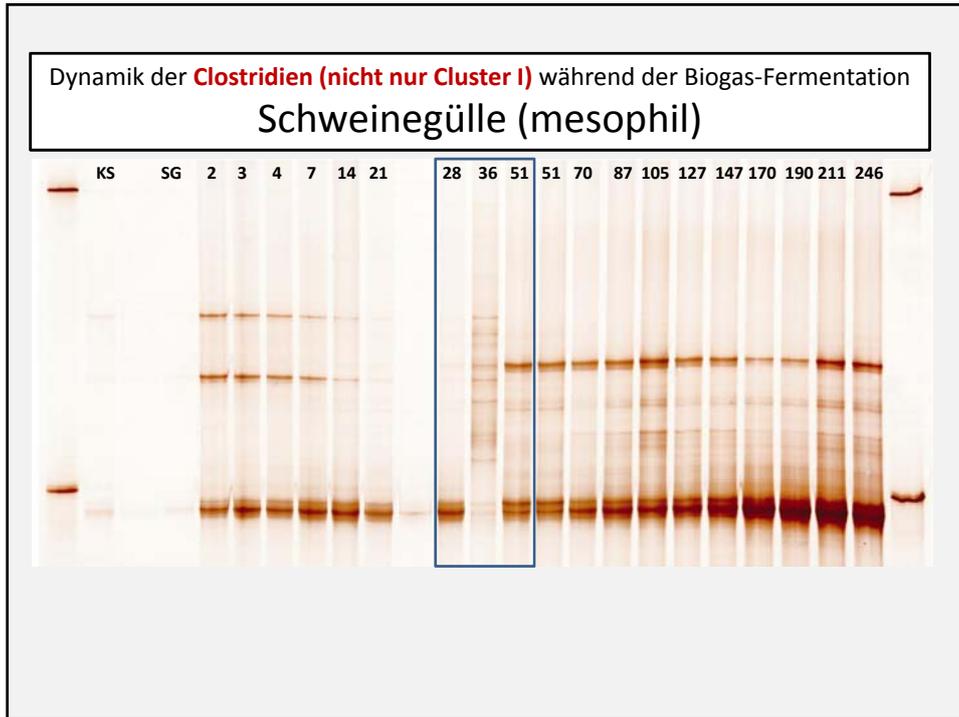
Dynamik der **Bakterien-Gemeinschaft** während der Biogas-Fermentation
 Kleegrassilage (mesophil)

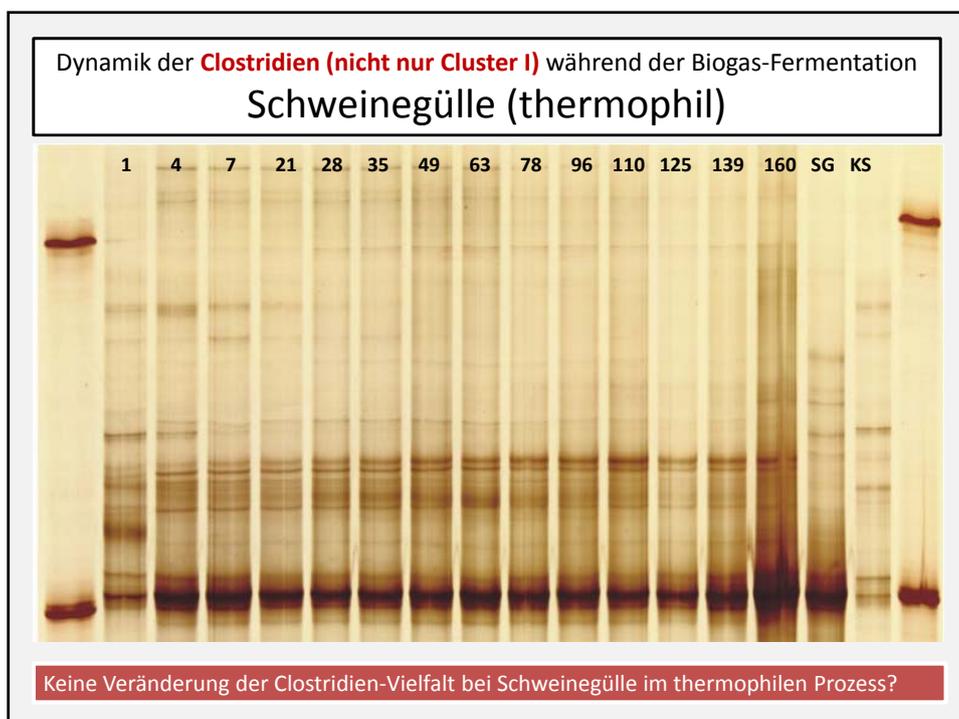
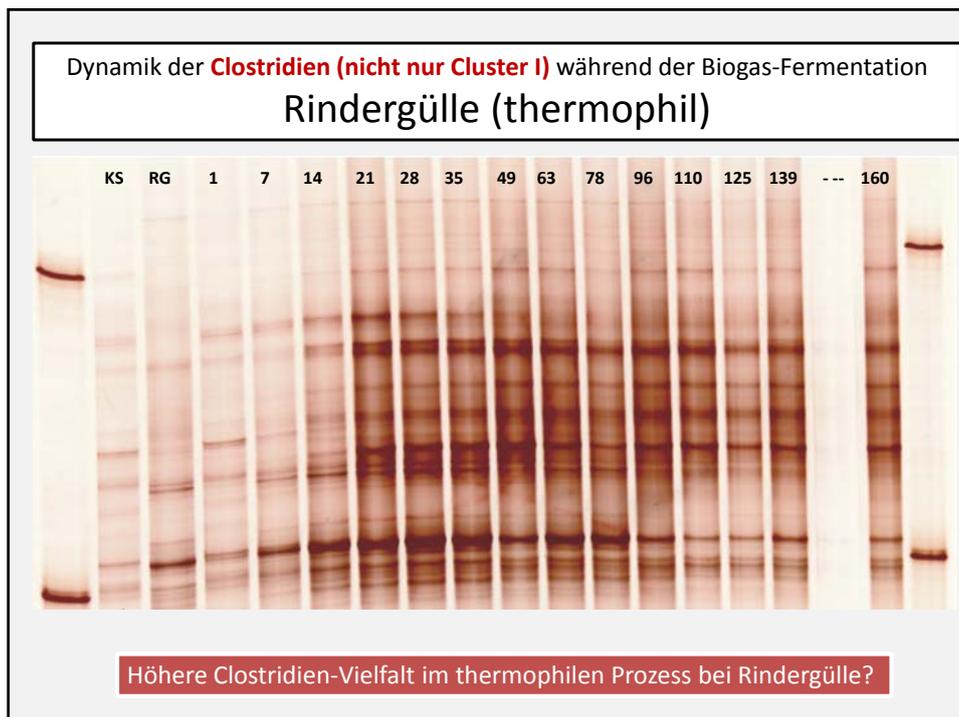


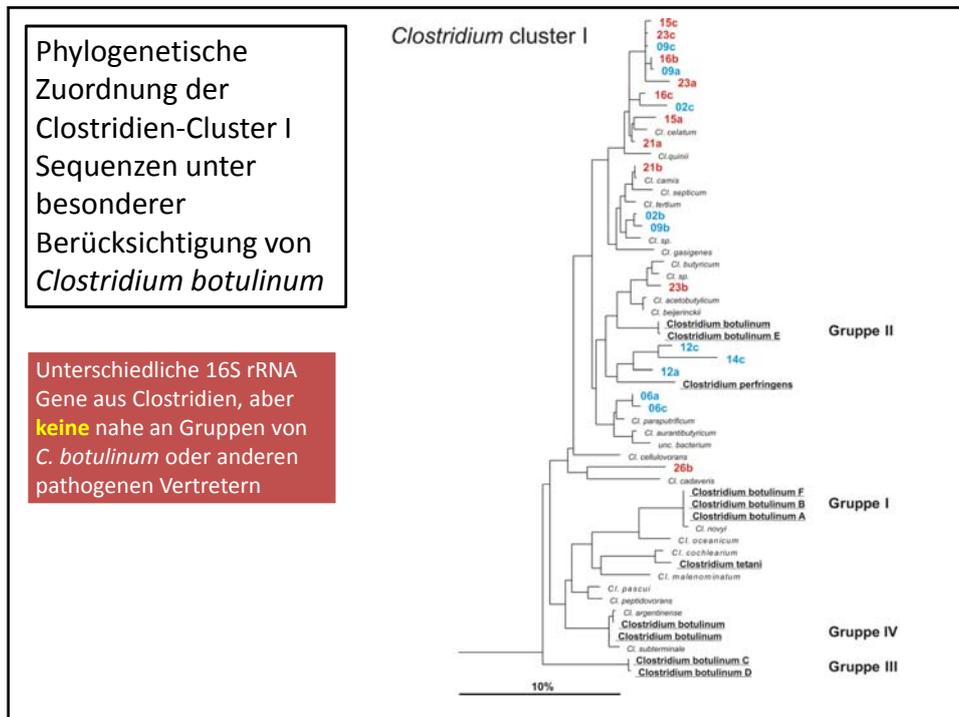












Zusammenfassung (1)

- Die Zusammensetzung der Bakterien in den experimentellen Biogasreaktoren wurde deutlich von den Eigenschaften der unterschiedlichen Gärsubstrate beeinflusst
- In der Startphase (30 bis 100 Tage) dominierten die durch das Impfgut (hier: Klärschlamm) eingebrachten Bakterien, danach jedoch nicht mehr
- Je nach Substrat und Inkubationsbedingung (meso/thermophil) stellten sich nach der Startphase relative stabile Bakterien-Gemeinschaften ein
- Bei mesophilen Prozessen: Die Veränderung der Clostridien-Vielfalt folgte der Dynamik der anderen dominanten Bakterien
- Bei thermophilen Prozessen: Stabile Clostridien-Gemeinschaften stellten sich schneller ein als stabile Gemeinschaften der dominanten Bakterien (geringerer Anteil an der Gesamtpopulation?)

Zusammenfassung (2)

- Bei der Vergärung von Rindergülle kam es zu keiner Massenvermehrung von Clostridien im Vergleich zu den Ausgangssubstraten, wohl aber zu einer Veränderung ihrer Vielfalt
- Clostridien aus unterschiedlichen phylogenetischen Zweigen gehörten zu den charakteristischen Bakterien in allen experimentellen Biogasreaktoren
- Phylogenetische Analysen gaben keinen Hinweis, dass unter diesen Clostridien *Clostridium botulinum* vorkommt
- Auch der negative Nachweis von Genen für vier unterschiedliche Botulinum Neurotoxine deutet darauf hin, dass es unter den gegebenen Bedingungen zu keiner Vermehrung von *C. botulinum* kam

Schlussfolgerungen

- Keine Hinweise auf das Vorkommen oder die Vermehrung von *C. botulinum* in experimentellen Biogasreaktoren mit 5 unterschiedlichen Substraten unter mesophilen oder thermophilen Bedingungen
- In den vergangenen 3 Jahren (seit Abschluss des Projekts) haben sich erhebliche methodisch Verbesserungen zur kultivierungsunabhängigen Analysen von *C. botulinum* aus Umweltproben ergeben
- Mit Hilfe dieser neuen Methoden sollte es möglich sein, belastbare Daten zum Vorkommen und zur Vermehrung von *C. botulinum* in landwirtschaftlichen Biogasanlagen in Niedersachsen zu erhalten

Wichtige Ergebnisse aus den hier vorgestellten Untersuchungen wurden publiziert in:
Dohrmann, A.B, S. Baumert, L. Klingebiel, P. Weiland, and C.C. Tebbe. 2011. Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89: 1991-2004

Danke für Ihre Aufmerksamkeit