

IDENTIFIKACE MIKROBIÁLNÍ POPULACE V BIOPLYNU

Jiřina Čermáková^a, Jakub Mrázek^b, Kateřina Fliegerová^b, Daniel Tenkrát^a

^aVŠCHT Praha, Ústav plynárenství, koksochemie a ochrany ovzduší, Technická 5, 166 28 Praha 6,
email: cermakoi@vscht.cz, daniel.tenkrat@vscht.cz

^bÚstav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
email: mrazek@iapg.cas.cz, fliegerova@iapg.cas.cz

Tento příspěvek se zabývá studiem mikrobiální populace v bioplynu pomocí metody založené na molekulární biologii, která dokáže identifikovat větší množství mikroorganismů než metoda klasické kultivace. V bioplynu z čistírny odpadních vod bylo nalezeno téměř 8 mil. bakterií v m³. Z identifikovaných bakterií byly zastoupeny hlavně kmeny Firmicutes a Proteobacteria, avšak největší část mikroorganismů v bioplynu patří mezi dosud neznámé nekultivované bakteriální druhy. Studium bakteriální biodiverzity v bioplynu hraje klíčovou roli zejména při konečném využití bioplynu, protože některé druhy mohou způsobovat korozi zařízení či potrubí a jiné mohou být dokonce patogenní a využívat bioplyn ke svému šíření.

Došlo 26. 1. 2011, přijato 30. 3. 2011

1. Úvod

Bioplynové stanice slouží ke komerční výrobě obnovitelné energie ve formě bioplynu, který lze použít pro kombinovanou výrobu tepla a elektřiny v kogeneračních jednotkách či k úpravě na náhradní zemní plyn, tzv. biomethan. Bioplyn vzniká fermentací organického materiálu za přítomnosti anaerobních mikroorganismů, které ovlivňují jeho složení. Část mikroorganismů z fermentovaného kalu je strhávána vznikajícím bioplynem, usazuje se v podobě tenkého filmu na potrubí a může se dostat až do místa konečného využití bioplynu.

Zdrojem mikroorganismů je i substrát používaný klasickými zemědělskými bioplynovými stanicemi či čistírnami odpadních vod (ČOV), který může obsahovat také nežádoucí mikroorganismy, např. oportunní patogeny. Tyto výrobní bioplynu nemusí být vybaveny hygienizačním či pasterizačním zařízením na úpravu substrátu. S velkým rozvojem bioplynových stanic tedy vyvstává otázka potenciálního rizika šíření mikroorganismů bioplynem. Tento příspěvek se zabývá monitorováním mikrobiální populace v bioplynu.

Počet a druh mikroorganismů přítomných ve fermentoru závisí nejen na druhu zpracovávaného materiálu, ale také na použitém fermentačním režimu. Celkový počet mikroorganismů ve fermentovaném substrátu je přibližně $1 \cdot 10^{15} \cdot \text{g}^{-1}$, zatímco v bioplynu se počty pohybují v rozmezí $2 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7 \cdot \text{m}^{-3}$ (přibližně stejné množství jako ve vzduchu).[1,2] Z těchto dat vyplývá, že přibližně jedna bakterie ze 100 milionů bakterií přejde z fermentovaného substrátu do bioplynu. Mikroorganismy nalezené v bioplynu nejsou jen nařaděnou kopií diverzity mikroorganismů z fermentoru, ale vykazují značné odlišnosti, které jsou způsobeny rozdílnou schopností aerosolizace. Mikroorganismy podle způsobu aerosolizace lze rozdělit do tří skupin. První skupinu představují mikroorganismy, které pasivně a náhodně přecházejí do bioplynu. Mezi pasivní bakterie patří *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Synergistes*,

jejichž množství ve sledovaném prostředí (bioplynu) závisí na typu bioplynu, např. ve skládkovém se téměř nevyskytují a naopak v hojném počtu jsou zastoupeny v bioplynu z ČOV, což je především způsobeno opětovným použitím odpadní vody, ve které jsou zachyceny. Druhou skupinu tvoří mikroorganismy, které se chtějí vyvarovat přestupu do bioplynu, které je pro ně nepříteľským prostředím. Jedná se např. o *Deltaproteobacteria*, *Spirochaetes*, *Thermotogae* nebo sulfát-redukující a methanogenní bakterie. Třetí skupina představuje mikroorganismy, které přednostně přecházejí do bioplynu. Tento přechod používají ke svému šíření a v bioplynu se tedy vyskytují ve významně vyšších koncentracích než ve fermentoru. Jedná se zejména o *Alpha*, *Beta* a *Gammaproteobacteria*. [3]

2. Metody stanovení

Klasická mikrobiologie, založená na kultivaci mikroorganismů v laboratoři, není schopná zajistit stejné podmínky jako ve fermentoru či v potrubí a dokáže izolovat jen asi 20 % mikroorganismů přítomných ve fermentoru. Pro zbývajících 80 % nebyly dosud nalezeny vhodné kultivační substráty nebo izolační postupy. Informace o těchto mikroorganismech mohou poskytnout metody molekulární genetiky založené na analýze nukleových kyselin, které umožňují lepší porozumění složení a různorodosti mikrobiální populace v bioplynu než metoda kultivace. Mezi metody molekulární genetiky patří např. polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction), kvantitativní RT-PCR (Real-time PCR), DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza), klonování a sekvenční analýza.

2.1. PCR + DGGE

PCR je technika, která umožňuje rychle a snadno namnožit daný kus DNA, *in vitro*, replikací nukleových kyselin. Hlavní výhodou PCR je její vysoká citlivost.

Pro namnožení určité sekvence stačí velmi malé množství DNA. Tato metoda se skládá ze tří základních kroků: denaturace, hybridizace a elongace. V prvním kroku je celá směs krátce zahřátá na teplotu 94 – 96 °C, při které dochází k porušení vodíkových můstků a k oddělení řetězců DNA. V druhém kroku je směs ochlazená na 50 – 65 °C, jenž umožňuje krátkým oligonukleotidům DNA (tzv. primerům) se navázat na cílovou DNA vodíkovými můstky podle pravidel komplementarity. Funkcí primerů je ohraničovat začátek a konec úseku DNA, který má být amplifikován. Ve třetím kroku (při teplotě 72 °C) dochází k samotné syntéze nové DNA k původní molekule DNA. Výsledkem je dvojnásobné množství DNA. Tyto tři, po sobě jdoucí kroky, se cyklicky opakují a pro dostatečné namnožení požadovaného fragmentu obvykle postačuje 30 cyklů.[4]

Separace takto namnožených fragmentů DNA (16S rDNA) probíhá pomocí gelové elektroforézy (DGGE, z anglického denaturing gradient gel electrophoresis), která je založena na klesající pohyblivosti fragmentů v polyakrylamidovém gelu vlivem rostoucí denaturační síly (denaturace = rozpad dvouvlákna DNA na jednovlákna). Pohyblivost závisí na počtu vodíkových můstků, tedy na typu, rozmístění a poměru bází, nikoliv na délce (úseky namnožení DNA jsou stejně dlouhé). V praxi to znamená, že DNA putuje v elektrickém poli až do okamžiku, kdy se oba řetězce DNA začnou od sebe oddělovat. Řetězce v místech bohatých na AT páry se snáze oddělují, zatímco úseky bohaté na CG jsou stabilnější a dojdou dále. Počet pruhů vzniklých na gelu značí počet dominantních druhů mikroorganismů ve vzorku.[5] Pro podrobnější identifikaci jsou vybrané pruhy s vyšší intenzitou z gelu vyříznuty, přečištěny, opět namnoženy pomocí PCR s fluorescenčně značenými nukleotidy a osekvenovány. Získané sekvence bází jsou porovnány s databází GenBank pomocí BLASTn algoritmu a na základě podobnosti sekvencí přiřazeny ke konkrétnímu či nejpodobnějšímu mikrobiálnímu druhu.[6,7]

2.2. Real-time PCR

Real-time PCR umožňuje na rozdíl od klasické metody kvantitativní stanovení jednotlivých druhů mikroorganismů ve vzorku. Princip zůstává stejný, ale reakční směs navíc obsahuje fluorescenční barvu (nejčastěji SYBR Green), která se váže na vznikající dvouvlákno DNA. Přitom se uvolňuje fluorescence, která je zaznamenávána přístrojem. Rychlost vzniku fluorescence odpovídá množství vzniklého produktu a je přímo úměrná původnímu množství DNA templátu. Kvantifikace je provedena buď porovnáním s jinou (kontrolní) skupinou nebo z kalibrační křivky standardu.[4]

2.3. Odběr vzorků a jejich analýza

Odběr vzorků

Pro odběr vzorků bioplynu byla vybrána čistírna odpadních vod, která pracuje v termofilním režimu. K zachycení mikroorganismů v bioplynu byla použita filtrace skrz nylonový membránový filtr s velikostí pórů

0,22 µm od firmy Millipore. Filtry byly lokalizovány na dvou místech, jednak přímo za fermentorem a pak za adsorpční jednotkou, která slouží k odstraňování siloxanů z bioplynu. Mimo plynných vzorků byl také odebrán vzorek kalu, ze kterého je bioplyn vyráběn. Všechny vzorky byly zmrazeny pomocí suchého ledu, aby nedocházelo k rozkladu mikroorganismů. Poté byly mikroorganismy stanovovány a kvantifikovány na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i.

Izolace DNA

Filtr se zachycenými bakteriemi byl zvážen a přibližně 1/5 byla použita k izolaci bakteriální DNA kitem PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, USA) postupem daným výrobcem. Při izolaci DNA z fermentovaného kalu bylo použito 0,2 g pevné hmoty. Naizolovaná DNA byla uchována při -20 °C.

PCR - DGGE

Amplifikace úseku 16S rRNA bakteriální DNA byla provedena pomocí univerzálních primerů 338GC a RP534 (tabulka 1). PCR program se skládal z 3 minut denaturace při 94 °C, 35 cyklů amplifikace (1 min. 94 °C, 30 s. 55 °C a 1 min. 72 °C) a finální elongace 10 minut při 72 °C. [12] PCR směs obsahovala 1 µL DNA templátu, 1 µL každého primeru (10 µM), 15 µL ReadyMix Taq PCR reakční směsi (Sigma-Aldrich, Germany) a 12 µL sterilní H₂O. Získaná směs byla použita na DGGE analýzu.

Produkty z PCR reakce byly analyzovány na přístroji „DCode™ Universal Mutation Detection System“ (Biorad, USA) na 9% akrylamidovém gelu s denaturačním gradientem 35 – 60 %. Elektroforéza běžela v 7 L 1x TAE pufru 18 hodin při 55 V a 60 °C.[13] Gel byl poté 30 minut barven v 50 mL 1x TAE pufru s přísadkou interkalární barvy SYBR Green I (0,001 %) za pomalého míchání a vyfočen v UV světle na fotodokumentačním zařízení firmy Vilber Lourmat (Francie).

Identifikace DNA fragmentů sekvencováním

Vybrané bandy byly vyříznuty z gelu sterilním skalpelem. DNA byla následně eluována do 100 µL sterilní vody vortexováním a centrifugací 10 minut při 9 000 g. 2 µL supernatantu byly použity pro reamplifikaci DNA s primery FP341 a RP534 za podmínek jako PCR-DGGE.[12] PCR produkty byly poté přečištěny kitem „QIAquick PCR purification kit“ (Qiagen, Německo) a osekvenovány pomocí kitu „ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, USA) na PCR termocyklu T-personel Combi (Biometra, Německo). Osekvenované produkty byly přečištěny kitem „BigDye purification kit“ (Applied Biosystems, USA) a analyzovány na přístroji 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). Získané sekvence byly po manuální kontrole porovnány s databází GenBank pomocí BLASTn algoritmu.[14]

Real-time PCR

Přístroj MX3005P QPCR System (Stratagene, U.S.A.) byl použit pro kvantifikaci bakteriální DNA za účasti primerů specifických pro následující vybrané skupiny bakterií: eubaktérie [15], skupina *Clostridium leptum* [16, 17], skupina *Lactobacillus* [18], enterobaktérie, rod *Desulfovibrio* a druh *Faecalibacterium prausnitzii* [19]. Pro každou amplifikační reakci bylo použito 10 µL qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, ČR), 1 µL forward primeru (10 µM), 1 µL reverzního primeru (10 µM), 0,3 µL referenční barvy ROX (Stratagene, USA), 1 µL templátu DNA a 6,7 µL dH₂O. Teplotní podmínky PCR reakcí a primery byly dodrženy dle autorů (tabulka 1). Ověření specifity qPCR zkoumaných skupin (kromě eubakterií) bylo provedeno analýzou křivek tání PCR produktů. Sériově naředěná DNA izolovaná ze známého počtu buněk byla použita jako standard pro konstrukci kalibrační křivky. Byly použity následující druhy: *Clostridium leptum* (měření eubakterií a skupiny *Clostridium leptum*), *Lactobacillus breve* (skupina *Lactobacillus*), *Escherichia coli* (enterobaktérie), *Desulfovibrio* sp. (skupina *Desulfovibrio*) a *Faecalibacterium prausnitzii* (skupina *Faecalibacterium*). Získané výsledky byly

vyjádřené jako počty bakteriálních buněk v gramu hmoty nebo v metru krychlovém plynu.

Tabulka 1 Použité primery

Primer	Specifita	Sekvence (5 – 3)
338GC	Eubaktérie	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCCGCCGCCGCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
RP534	Eubaktérie	ATTACCGCGGCTGCTGG
FP341	Eubaktérie	CCTACGGGAGGCAGCAG
Uni331F	Eubaktérie	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
Uni797R	Eubaktérie	GGACTACCAGGGTATCTATCCTGTT
C.leptumF1123	Skupina Clostridium leptum	GTTGACAAAACGGAGGAAGG
C.leptumR1367	Skupina Clostridium leptum	GACGGGCGGTGTGTACAA
LabF362	<i>Lactobacillus</i> sp.	AGCAGTAGGGAATCTTCCA
LabR677	<i>Lactobacillus</i> sp.	CACCGCTACACATGGAG
Eco1457F	Enterobaktérie	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC
Eco1652R	Enterobaktérie	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
Dsv691F	<i>Desulfovibrio</i> sp.	CCGTAGATATCTGGAGGAACATCAG
Dsv826R	<i>Desulfovibrio</i> sp.	ACATCTAGCATCCATCGTTTACAGC
Fprau223F	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	GATGGCCTCGCGTCCGATTAG
Fprau420R	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	CCGAAGACCTTCTTCTCC

3. Výsledky a diskuse

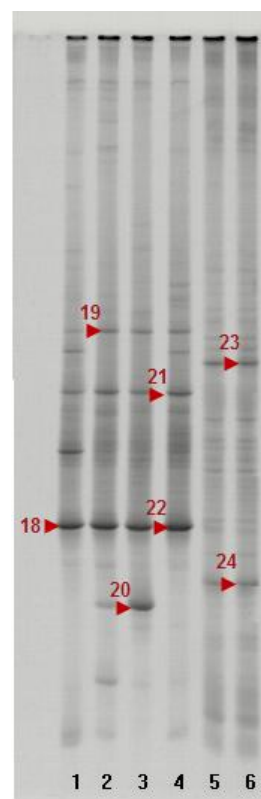
3.1. PCR a DGGE

Získaný DGGE profil ze separace namnožených DNA vzorků bioplynu ukazuje jednotlivé bakteriální druhy přítomné v bioplynu a ve fermentoru (obr. 1). Pruhy (= DNA fragmenty) označené v gelu čísla, byly z gelu vyříznuty a nasekvenovány. Všechny získané sekvence byly porovnány se známými sekvencemi v GenBank databázi a vykazovaly minimálně 93% shodnost.

Z DGGE je také patrné, že kal obsahuje odlišné druhy a množství mikroorganismů oproti bioplynu, což

je v souladu s teorií, že mikroorganismy se vyznačují odlišným chováním a rozdílnou schopností přecházet do bioplynu. Jednotlivé druhy jsou detailněji popsány v tab. 2. Nejčetněji byl zastoupen kmen *Proteobacteria*, který obsahuje nežádoucí a potenciálně nebezpečné mikroorganismy, např. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. či *Sphingomonas* sp.

Obrázek 1 DGGE profil bakterií bioplynu a fermentovaného kalu z ČOV. Červeně označené fragmenty DNA byly podrobeny sekvenční analýze.



1,2: bioplyn za fermentorem
3,4: bioplyn za adsorpční jednotkou
5,6: fermentovaný kal

Tabulka 2 Popis jednotlivých druhů mikroorganismů z DGGE [9,10,11]

Fragmenty	Název	Shoda [%]	Klasifikace	Specifikace
18, 22	<i>E. coli</i>	100	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Enterobacteriales</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ;	ze střevní mikroflóry, může produkovat toxiny
19	<i>Pseudomonas</i> sp.	95	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Pseudomonadales</i> ; <i>Pseudomonadaceae</i>	redukují dusičnany na dusitany, oportunní patogen
20	<i>Leucobacter</i> sp. <i>Mycetocela</i>	93	<i>Actinobacteria</i> ; <i>Actinobacteridae</i> ; <i>Actinomycetales</i> ; <i>Micrococcineae</i> ; <i>Microbacteriaceae</i>	-
21	<i>Butyvirio</i> sp. <i>Pseudobutyvirio ruminis</i>	99	<i>Firmicutes</i> ; <i>Clostridia</i> ; <i>Clostridiales</i> ; <i>Lachnospiraceae</i>	ze střevní mikroflóry, štěpí celulózu
23	<i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i>	99	<i>Bacteroidetes</i>	produkuje směs kyselin (kys. propionová, mléčná, octová), může způsobovat infekce
24	<i>Uncultured beta proteobacterium</i>	99	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Betaproteobacteria</i>	typický pro odpadní vody (ČOV)
-	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Sphingomonadales</i> ; <i>Sphingomonadaceae</i>	štěpí polysacharidy, aerobní druh, může způsobovat infekce

3.2. Real-time PCR

Pomocí metody real-time PCR bylo stanoveno celkové množství mikroorganismů v kalu (1,36 miliard bakterií.m⁻³) i v bioplynu. V bioplynu za fermentorem se vyskytovalo 7,63 mil. bakterií.m⁻³ a za adsorpční jednotkou pouze 3,1 mil. bakterií.m⁻³. Tento poloviční propad je pravděpodobně způsoben částečným zachycením mikroorganismů jednak v chladičím zařízení plynu, který je umístěn před adsorpční jednotkou, ale také samotným zachytem na aktivním uhlí v adsorbéru. V bioplynu byly nalezeny počty čtyř taxonů bakterií a dalších mikroorganismů (tab. 3).

Nejčetněji byl zastoupen rod *Desulfovibrio* redukcí sulfátů a síru na sulfan, který s vodou vytváří kyselé prostředí a zvyšuje riziko vzniku koroze. Ke vzniku koroze také přispívají mikroorganismy druhu *Clostridium leptum*, které se podílí na kyselinotvorné fázi v procesu fermentace.[5] Nejméně zastoupenými, ale potenciálně nejzájímavějšími bakteriemi jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, které v procesu fermentace štěpí cukry a redukují dusičnany na dusitany. *Enterobacteriaceae* představují rozsáhlou skupinu zahrnující různé druhy patogenů, jako například *Salmonella*.

Tabulka 3 Množství a typ mikroorganismů v bioplynu

Typ/vzorek	Bioplyn za fermentorem [mil. bakterií.m ⁻³]	Bioplyn za adsorpční jednotkou [mil. bakterií.m ⁻³]
Celkem buněk	7,630	3,100
<i>Clostridium leptum</i>	1,900 (24,9 %)	0,578 (18,6 %)
<i>Desulfovibrio</i>	3,230 (42,3 %)	ND
<i>Faecalibacterium</i>	ND	0,470 (15,2 %)
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,043 (0,6 %)	0,037 (1,2 %)
Ostatní	2,457 (32,2 %)	2,015 (65 %)

4. Závěr

Pomocí metod molekulární biologie bylo zjištěno, že bakterie jsou schopny přecházet do bioplynu a jejich množství je přibližně stejné jako mikrobiální znečištění vzduchu (cca 8 mil.m⁻³). Podle našich výsledků, v případě bioplynu z čistírny odpadních vod, přestupují

do bioplynu nejčastěji zástupci dvou bakteriálních kmenů, a to *Proteobacteriaceae* a *Firmicutes*. Některé druhy mikroorganismů vykazují škodlivé účinky na lidský organismus a jiné například zvyšují riziko koroze. Mnohé druhy mikroorganismů, a v bioplynových fermentorech je to většina, nejsou dosud rozeznány a popsány, a

tudíž není znám ani jejich význam ve fermentačním procesu a jejich vliv na okolí. S lepším porozuměním mikrobiální populace v bioplynu lze zamezit korozi potrubí a zařízení či případnému šíření patogenních mikroorganismů.

Poděkování

Experimentální práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 25/2010), podporována Národní agenturou pro zemědělský výzkum (grant č. QI92A286/2008) a doktorandským grantem Grantové agentury České republiky (grant č. P503/10/P394).

Literatura

- Gantzer C., Gaspard P., Galvez L., Huyard A., Dumouthier N.: Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge, *Water Res.*, 2001, 37763 - 70
- Sahlstrom L., Aspan A., Bagge E., Danielsson-Tham ML., Albiñ A.: Bacterial pathogen incidence in sludge from Swedish sewage treatment plants, *Water Res.*, 2004, 1984 - 89
- Molleta M., Delgenes JP., Godon JJ.: Differences in the aerosolization behaviour of microorganism as revealed through their transport by biogas, *Science of the Total Environment*, 2007, 75 - 88
- Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R.: The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Env. International* 34, 2007, 265 - 276
- Zhu XY., Lubeck J., Kilbane JJ.: Characterization of microbial communities in gas industry pipelines, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 5354 - 5363
- Muyzer G., De Waal E., Uitterlinden AG.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 695 - 700
- Mrázek J., Koppová I., Kopečný J., Šimůnek J., Fliiegerová K.: PCR-DGGE-based study of fecal microbial stability during the long-term chitosan supplementation of human. *Folia Microbiologica*, 2010, 352 - 358
- Bartosch S., Fite A., Macfarlane GT., McMurdo MET.: Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using Real-Time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 3575 - 3581.
- http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bovine_Rumen, staženo dne 14. 11. 2010
- Atlas RM.: *Principles of microbiology*, Dubuque: McGraw-Hill, 1997, ISBN 0-8151-0889-3
- <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Sphingomonas>, staženo dne 14. 10. 2010
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G.: Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695 - 700, 1993
- Fischer S.G., Lerman L.S.: DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 1579 - 1583, 1983
- Maidak B.L., Larsen N., McCaughey M.J., Overbeek R., Olsen G.J., Foge K., Blandy J., Woese C.R.: The ribosomal database project; *Nucleic Acid. Res.* 22, 3485 - 3487, 1994
- Nadkarni M.A., Martin E.F., Jacques N.A., Hunter N.: Determination of Bacterial Load by Real-time PCR Using a Broad-range (Universal) Probe and Primers Set. *Microbiol.* 148(1), 257 - 266, 2002
- Shen J., Zhang B., Wei G., Pang X., Wei H., Li M., Zhang Y., Jia W., Zhao L.: Molecular Profiling of the *Clostridium leptum* Subgroup in Human Fecal Microflora by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Library Analysis; *Appl. Environ. Microbiol.* 5232 - 5238, 2006
- Salzman N.H., Hung K., Haribhai D., Chu H., Karlsson-Sjberg J., Amir E., Teggatz P., Barman M., Hayward M., Eastwood D., Stoel M., Zhou Y., Sodergren E., Weinstock G.M., Bevins C.L., Williams C.B., Bos N.A.: Enteric Defensins Are Essential Regulators of Intestinal Microbial Ecology; *Nat. Immunol.* 11, 76 - 82, 2009
- Rinttila T., Kassinen A., Malinen E., Krogus L., Palva A.: Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR; *J. Appl. Microbiol.* 97, 1166 - 1177, 2004
- Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T., McMurdo M.E.T.: Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Realtime PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota; *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6), 3575 - 3581, 2004

Summary

Jiřina Čermáková^a, Jakub Mrázek^b, Kateřina Fliegerová^b, Daniel Tenkrát^a

^a*Institute of Chemical Technology Prague*

^b*Institute of Animal Physiology and Genetics, AS
CR, v.v.i.*

Identification of microbial communities in biogas

This paper deals with the detection of microbial species in biogas, their influence on corrosion and their potential risk of spreading disease via biogas using molecular techniques. Because the vast majority of microbial species cannot currently be grown in the laboratory, molecular techniques enable a better appreciation of the compositions and variability of microbial communities than traditional bacterial cultures. Biogas samples for molecular methods were collected by filtration through a 0.22 µm nylon membrane filter. Two different sites were chosen: behind an anaerobic digester, and behind an adsorption unit, which is designed for sulphur and siloxane removal.

Using methods of molecular biology, we found that raw biogas contains about 8 million bacteria in m³, which is most likely the result of microbial transmission from the anaerobic digestion process. Our results show that *Firmicutes* and *Proteobacteria* were the most frequently encountered bacterial phyla. Some bacterial species may contribute to corrosion of pipelines and equipment; others are opportunistic pathogens that can cause toxic reactions. However, most of bacterial species, more than 40% in biogas, are still unknown as well as their influence on digestion process and human health. Further study is needed to better understand the behavior of microorganisms in anaerobic digestion and the prevention of microbial-influenced corrosion and microbial dissemination.

Keywords: biogas, PCR, microorganisms