

**Magdalena DOMAŃSKA¹, Janusz ŁOMOTOWSKI¹,
Marion MARTIENSSEN², Paweł WIERCIK¹**

¹ Instytut Inżynierii Środowiska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

² Lehrstuhl Biotechnologie der Wasseraufbereitung

Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg

ZASTOSOWANIE METODY FISH DO IDENTYFIKACJI SKŁADU BIOCENOZY OSADU CZYNNEGO

APPLICATION OF THE FISH METHOD FOR IDENTIFICATION OF ACTIVATED SLUDGE COMPOSITION

The activated sludge method using different types of microorganisms is the basic technology of treating municipal and industrial wastewater. Optical microscopes enable to observe sludge floc structure, as well as to identify protozoa, multi-cellular organisms and filamentous bacteria, providing valuable information about proper functioning of wastewater treatment plants. However, they do not reveal specific forms of bacteria mainly responsible for reducing nitrogen and phosphorus compounds. The article presents the characteristics of fluorescence in situ hybridization (FISH) for determining microorganisms involved in nitrification, denitrification and Anammox processes. It has been shown that the method can improve monitoring of microorganisms participating in the process of wastewater treatment with activated sludge.

1. Wprowadzenie

Dominującą technologią oczyszczania ścieków bytowo-gospodarczych i przemysłowych jest metoda osadu czynnego. Do prawidłowego przebiegu procesu nityfikacji, denityfikacji czy procesu Anammox (*Anaerobie ammonium oxidation*) niezbędne jest nie tylko rozpoznanie składu mikrobiologicznego osadu czynnego ale również jego ciągła obserwacja. Klasyczna metoda badania osadu czynnego z wykorzystaniem mikroskopów optycznych pozwala na obserwację budowy kłaczków osadu oraz identyfikację pierwotniaków i organizmów tkankowych, dostarczając cennych informacji na temat stanu i struktury kłaczków [1]. Duże, przerośnięte bakteriami nitkowatymi kłaczkami negatywnie wpływają na sedymentację osadu [2], podczas gdy obecność organizmów tkankowych takich jak wrotki czy nicienie świadczy o dobrej pracy oczyszczalni [3]. Metoda ta nie dostarcza jednak szczegółowych informacji na temat gatunku bakterii obecnych w kłaczkach osadu czynnego.

Mikroorganizmy biorące udział w procesie oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego są wrażliwe na zmiany warunków, takich jak temperatura, zawartość tlenu czy organicznych związków węgla, co stwarza ryzyko zmniejszenia wydajności lub całkowitego załamania procesu. Efektywna walka ze zjawiskiem puchnięcia czynnego polega na identyfikacji mikroorganizmów odpowiedzialnych za ten proces, poznaniu ich biologii a także przyczyn nadmiernego wzrostu. Dlatego szybkie metody identyfikacji i ilościowego oznaczania mikroorganizmów w osadzie czynnym są bardzo ważnym narzędziem nie tylko poznawczym, ale mają szansę stać się jedną z metod badań rutynowych. Wykryty stosunkowo wcześniej spadek kluczowej populacji bakterii dla sprawności technologicznej oczyszczania ścieków może zapobiec poważnym problemom eksploatacyjnym. W artykule przedstawiono metodę FISH (fluorescence *in situ* hybridization), która może usprawnić proces monitoringu mikroorganizmów biorących udział w procesie oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego.

2. Zasada oznaczania bakterii metodą FISH

W procesie nityfikacji biorą udział tlenowe chemolitoautotrofy prokariotyczne, czyli mikroorganizmy samożywne (autotrofia), dla których źródłem energii użytecznej biologicznie jest utlenianie substancji chemicznych (chemotrofia) a donorem elektronów związku nieorganiczne (litotrofia). Możemy wyróżnić dwie podstawowe grupy chemolitoautotrofów z domeny *Bacteria*: bakterie utleniające amoniak (*ammonia-oxidizing bacteria AOB*) i bakterie utleniające azotyny (*NOB: nitrite-oxidizing bacteria*) oraz z domeny *Archaea*, archeony utleniające amoniak (*AOA: ammonia-oxidizing archaea*). Najczęściej spotykane w osadzie czynnym są bakterie AOB z grupy *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* i *Nitrospira* oraz NOB z grupy *Nitrobacter* [4]. Dodatkową grupą bakterii redukujących amoniak w warunkach niedotlenienia bezpośrednio do azotu gazowego są odkryte w 1995 roku przez Muldera i in. [5] bakterie realizujące proces Anammox, których wykorzystanie w oczyszczaniu ścieków znacznie redukuje koszty eksploatacyjne związane z wprowadzaniem tlenu i dodatkowego źródła węgla. Wśród bakterii Anammox najczęściej spotykane są bakterie z rodzaju *Brocadia* i *Kuenenia* [6].

Proces denityfikacji, jako najważniejszy w cyklu przemian azotu jest realizowany przez bakterie w warunkach anoksydacyjnych i prowadzi do redukcji azotynów i azotanów do azotu gazowego. Niewiele jest informacji na temat bakterii realizujących ten proces w pełnej skali technicznej. Bakterie denityfikacyjne nie są ograniczone do danej grupy taksonomicznej, ale są obecne w wielu podgrupach filogenetycznych. Badania Zumft z 1992 roku [za 4] wykazały, że ponad 50% tych mikroorganizmów należy do rodzaju *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, natomiast inne badania wskazują, że inne denityfikanty dominują w osadzie czynnym. Świadczy to o złożoności procesu denityfikacji i potwierdza zasadność prowadzenia badań w kierunku identyfikacji tych mikroorganizmów w osadzie czynnym.

Bakterie nitkowate, odpowiedzialne za proces puchnięcia osadu, są specyficzne dla danego rodzaju oczyszczalni lub miejsca jej występowania [4]. Można wyróżnić ok. 80 gatunków bakterii nitkowatych występujących w osadzie czynnym [2]. Identyfikacja bakterii nitkowatych jest możliwa na podstawie ich morfologii bez stosowania metod barwienia lecz określenie konkretnych gatunków wymaga zastosowania specyficznych sond molekularnych. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe sondy oligonukleotydowe stosowane do wykrywania mikroorganizmów osadu czynnego za pomocą metody FISH.

Tab. 1. Przykładowe sondy oligonukleotydowe stosowane w analizie FISH [8]

Tab. 1. Examples of rRNA oligonucleotide probes used in the FISH analysis [8]

Mikroorganizmy		Sonda	
Prowadzące proces:	Nitryfikacji	Bakterie utleniające amoniak z grupy <i>β-Proteobakteria</i>	Nso1225
		<i>Nitrosomonas spp.</i> <i>Nitrosococcus mobilis</i>	Nsm156
		<i>Nitrosospira</i>	Nsv443
		<i>Nitrobacter</i>	NIT3
	Anammox	Wszystkie <i>Planctomycetes</i>	PLA46
		Wszystkie bakterie Anammox	Amx386
	Denitryfikacji	Większość <i>Pseudomonas spp.</i>	Pae997
		Thauera	Thau646
Nitkowate	Większość bakterii właściwych	EUB338	

Sondy fluorescencyjne są to krótkie sekwencje DNA (15-30 nukleotydów) znakowane barwnikiem fluorescencyjnym na końcu 5'. Sekwencje te rozpoznają sekwencje 16S rRNA w utrwalonych komórkach i hybrydują do nich *in situ* (w preparacie mikroskopowym), czyli tworzą dwuniciowe helisy kwasów nukleinowych. RNA małej podjednostki rybosomalnej (16S rRNA dla *Prokariota*) została wybrana ze względu na swoją uniwersalność i liczebność we wszystkich żywych organizmach (10^3 do 10^5 rybosomów/komórkę) oraz fakt, że jest ona wysoce niezmienna w toku ewolucji cząsteczki, chociaż wykazuje wysoką zmienność pewnych regionów. Cechy te umożliwiają porównanie organizmów z tej samej domeny, jak również ich zróżnicowanie [11]. Wybór znacznika fluorescencyjnego zależy od odpowiedniego zestawu filtrów mikroskopowych. Zwykle stosowane są flochromy emitujące światło przy długości fali obejmującej szerokie spektrum i zawierają takie barwniki jak fluoresceina (518 nm) czy cyjanina CY-3 (566 nm) i CY-5 (670nm). Zazwyczaj oznacza się sondy pojedynczym fluorochromem. Intensywność sygnału może być wzmocniona przez oznaczanie sond enzymem np. peroksydazą chrzanową, w procedurze zwanej CARD-FISH (catalyzed reported deposition) [13]. Po hybrydyzacji, enzymy przyczepiają się do sond katalizując (przyspieszając) depozyt dostarczonego wykrywanego substratu, co zwiększa sygnał z pojedynczej hybrydyzacji i poprawia czułość. Za pomocą hybrydyzacji mikroorganizmy mogą być zlokalizowane, zidentyfikowane i oszacowane ilościowo w prawie każdym ekosystemie.

Procedura oznaczania mikroorganizmów metodą FISH została opisana szczegółowo w wielu publikacjach [4, 10, 12]. Składa się z czterech podstawowych kroków: utrwalania próbki, hybrydyzacji, płukania i analizy mikroskopowej. Celem utrwalania próbki jest przede wszystkim unieruchomienie komórek mikroorganizmów, ochrona ich morfologii, zwiększenie przepuszczalności dla sondy oraz powstrzymanie aktywności enzymów przed lizą i degradacją komórek docelowych. Do utrwalania komórek gram ujemnych z domeny *Bacteria* najczęściej stosowanym utrwalaczem jest paraformaldehyd a w przypadku komórek gram dodatnich stosuje się etanol [14]. Utrwalone komórki mogą być przechowywane

w temperaturze 4°C przez krótsze okresy a dla optymalnego długoterminowego przechowywania, bez zauważalnej utraty fluorescencji, wymagana jest temperatura -20°C [7].

Hybrydyzacja polega na inkubacji komórek w buforze w warunkach dogodnych dla tworzenia dupleksów. Na przebieg hybrydyzacji ma wpływ temperatura, stężenie poszczególnych roztworów oraz czas inkubacji. Chociaż pH nie ma wpływu na interakcję kwasów nukleinowych to podczas hybrydyzacji utrzymywane jest neutralne pH ze względu na wrażliwość niektórych fluorochromów [12]. Temperatura inkubacji jest utrzymywana na poziomie 46°C a czas hybrydyzacji trwa zwykle od 1,5 godziny do całej nocy. Celem przemywania próbki jest usunięcie sond, które nie uległy hybrydyzacji, utrzymując jednocześnie odpowiednie warunki stężenia, które były na etapie hybrydyzacji. Podczas tego etapu zwiększa się pH do 8, temperaturę do 48°C a czas przemywania wynosi od 10 do 30 min.

W czwartym etapie próbki są analizowane na podstawie sygnału fluorescencji z komórki zawierającej sondę docelową. Efekt wywołuje fluorochrom, który jest pobudzany światłem o odpowiedniej długości. Do analizy próbki stosowane są mikroskopy epifluorescencyjne lub konfokalne wyposażone w odpowiednie oprogramowanie do analizy obrazu. Konfokalny laser skaningowy oddaje trzeci wymiar gęsto upakowanych komórek, umożliwiając w ten sposób ich ilościową ocenę [12].

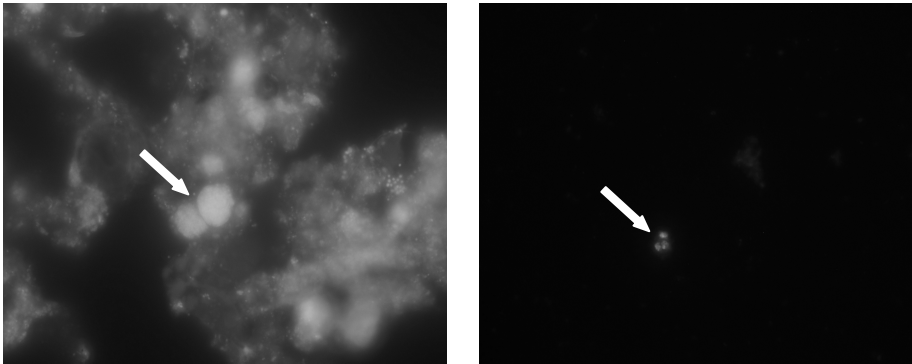
Jest wiele prac badawczych poświęconych ocenie ilościowej mikroorganizmów obecnych w osadzie czynnym z wykorzystaniem mikroskopów fluorescencyjnych lub konfokalnych wyposażonych w oprogramowanie do analizy obrazu [15]. Niestety ze względu na stopień złożoności zjawisk zachodzących w kłaczkach osadu czynnego nie opracowano standardów tych metod badawczych i brak jest do tej pory ich wdrożenia do monitoringu składu biocenozy osadu czynnego.

3. Wyniki badań

Do badań wykorzystano trzy próbki osadu czynnego pobranego z oczyszczalni ścieków we Wrocławiu, w Nysie i z instalacji doświadczalnej [9]. Pobrane próbki w ciągu kilku godzin dostarczono do laboratorium w Cottbus. Próbki osadu czynnego analizowano przy użyciu metody FISH, której szczegółowy opis zawarto w rozdziale 1.2.

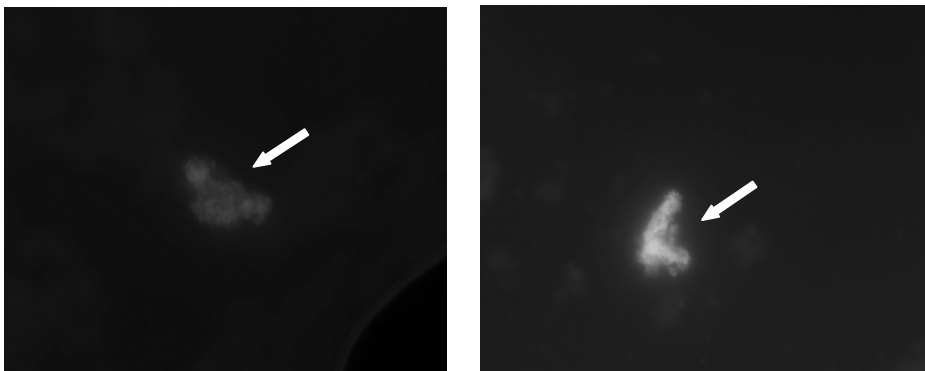
Główną wadą techniki FISH jest konieczność znajomości spodziewanych mikroorganizmów w próbce. Dlatego badania zwykle rozpoczyna się od zastosowania równolegle kwasów nukleinowych (jak DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol), DABCO (1,4-diazabicyklo(2,2,2)oktan) lub Vectashield), które silnie wiążą się do DNA mikroorganizmów, działają jak barwnik fluorescencyjny i informują nas o obecności w próbce wszystkich mikroorganizmów, następnie dodaje się sondę ogólną (np. EUB338 dla bakterii właściwych) oraz kilka sond specyficznych skierowanych do danego gatunku bakterii.

Wyniki badań (rys. 1-3) potwierdzają obecność poszczególnych bakterii w osadzie czynnym. Na rys. 1. po lewej stronie obserwowano bakterie nityfikacyjne granulowanym tlenowym osadzie czynnym po zastosowaniu DAPI. Bakterie nityfikacyjne rzadko są spotykane jako pojedyncze komórki i zazwyczaj tworzą prawie kuliste zwarte skupiska komórek. Rysunek 1 po prawej stronie przedstawia bakterie *Nitrosospira spp.* po hybrydyzacji sondą specyficzną Nsv443. W próbce osadu pobranego z oczyszczalni ścieków w Nysie również zidentyfikowano mikroorganizmy biorące udział w procesie nityfikacji takie jak *Nitrobacter spp.* oraz *Nitrosomonas spp.* i *Nitrosococcus mobilis* po zastosowaniu kolejno sondy NIT3 i Nsm156 (rys. 2).



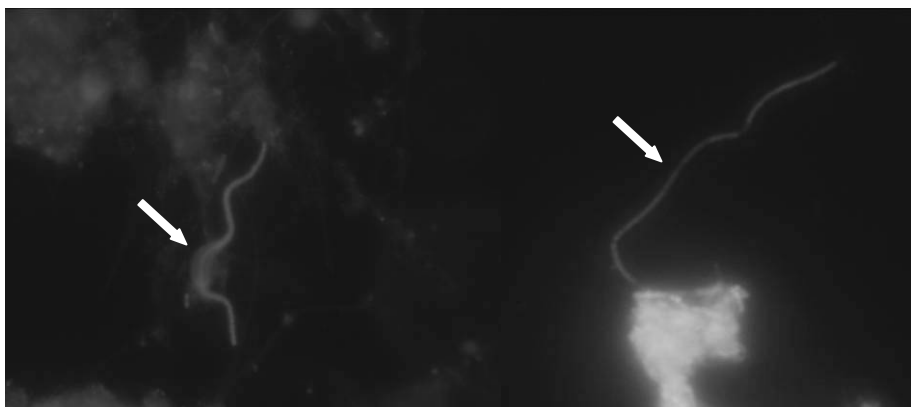
Rys. 1. Typowy klaster bakterii nityfikacyjnych zidentyfikowany po zastosowaniu DAPI (po lewej stronie) oraz bakterie *Nitrospira* spp. po hybrydyzacji sondą specyficzną *Nsv443* (po prawej stronie), zidentyfikowane w próbce tlenowego granulowanego osadu czynnego.

Fig. 1. Microorganisms identified in the sample of aerobic granular sludge. Typical cluster-form of nitrifying bacteria after DAPI (left side) and *Nitrospira* spp. after hybridization of specific probe *Nsv443* (right side).



Rys. 2. Mikroorganizmy biorące udział w procesie nityfikacji. *Nitrobacter* spp. (po lewej stronie) po zastosowaniu sondy specyficznej *NIT3* oraz *Nitrosomonas* spp., *Nitrosococcus mobilis* (po prawej stronie) po zastosowaniu sondy specyficznej *Nsm156* zidentyfikowane w próbce osadu pobranego z Oczyszczalni Ścieków w Nysie.

Fig. 2. Microorganisms involved in the nitrification process identified in a sample of activated sludge taken from the Wastewater Treatment Plant in Nysa. *Nitrobacter* spp (left side) after hybridization of specific probe *NIT3* and *Nitrosomonas* spp *Nitrosococcus mobilis* (right side) after hybridization of specific probe *Nsm156*.



Rys.3. Mikroorganizmy nitkowate po zastosowaniu Vectashield (po prawej stronie) oraz sondy EUB338 (po lewej stronie) zidentyfikowane w próbce osadu pobranego z Wrocławskiej Oczyszczalni Ścieków

Fig. 3. Filamentous bacteria identified in the sample of activated sludge collected from Wrocław Wastewater Treatment Plant after application of Vectashield (right side) and hybridization with the universal oligo probe EUB338 (left side)

W próbce osadu czynnego pobranego z Wrocławskiej Oczyszczalni Ścieków zidentyfikowano mikroorganizmy nitkowate po zastosowaniu Vectashield (po prawej stronie) oraz sondy EUB338 (po lewej stronie) (rys. 3). Określenie gatunku tych bakterii jest możliwe po zastosowaniu sond specyficznych.

4. Podsumowanie

Wdrożenie metody FISH do monitorowania wybranych mikroorganizmów w osadzie czynnym i ich dynamiki rozwoju może dostarczyć ważnych wskazówek przy prognozowaniu niekorzystnych zmian morfologii osadu czynnego (np. puchnięcie osadu) oraz dynamicznymi zmianami w liczebności bakterii wpływających na sprawność usuwania ze ścieków związków azotu i fosforu. Metoda FISH nie jest skomplikowana analitycznie a jej wykonanie zajmuje kilka godzin. Może być stosowana zarówno do oznaczania mikroorganizmów w osadzie czynnym, jak również do oceny biocenozy biofilmów oraz błony biologicznej powstającej na kształtkach stosowanych w reaktorach MBR. Koszty inwestycyjne wdrożenia takiej metody w głównej mierze zależą od kosztów amortyzacji aparatury badawczej. Mikroskopy epifluorescencyjne w podstawowej wersji można kupić obecnie za kilkadziesiąt tysięcy złotych.

Bibliografia

- [1] Fijałkowska, E., Fyda, J., Pajdak-Stós, A., Więckowski, K.: Osad czynny. Biologia i analiza mikroskopowa. *Oficyna Wydawnicza „Impuls”*, Kraków, 2005.
- [2] Kocwa-Haluch, R., Woźniakiewicz, T.: Analiza mikroskopowa osadu czynnego i jej rola w kontroli procesu technologicznego oczyszczania ścieków. *Czasopismo techniczne Środowisko*, 2011, 6, 108, 141-162.
- [3] Brzezicka, S., 2007: Analiza mikroskopowa osadu czynnego na oczyszczalni ścieków, *Ochrona Środowiska*, Laboratorium, 7-8, 55-58.
- [4] Nielsen, P.H., Daims, H., Lemmer, H.: FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment, Identification and quantification of microorganism in activated sludge and biofilms by FISH. IWA Publishing, 2009.
- [5] Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G.: Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reaktor. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16 (3), 177-184.
- [6] Schmidt, L., Slikers O., Schmidt, M., Bock, E., Kuenen, J. G., Jetten, M.S.M., Strous, M.: New concepts of microbiological treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *Microbiology Reviews*, 2003, 772, 1-12.
- [7] Lee, N.M., Meisinger, D.B., Schmid M., Rothballe M., Löffler F.E.: Fluorescence in Situ Hybridization. *Encyclopedia of Geobiology, Encyclopedia of Earth Sciences Series*, 2011, 373-393.
- [8] <http://www.microbialecolony.net/probebase>
- [9] Frączczak, M., Łomotowski, J.: Możliwości produkcji biomasy bakterii nityfikacyjnych z wykorzystaniem amoniaku emitowanego w czasie chowu zwierząt w budynkach inwentarskich. *Instal*, 2012, 5, 59-63.
- [10] Domańska, M., Frączczak, M., Łomotowski, J., Wiercik, P.: Możliwości identyfikacji bakterii Anammox w osadzie czynnym. *Instal*, 2014, 4, 60-63.
- [11] Sanz, J.L., Köchling, T.: Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*, 2007, 42(2), 119-133.
- [12] Yilmaz L.S., Kang D.W., Nougera D.R.: FISH probes and their design. W: Seviour, R., Nielsen, P.H.: *Microbial ecology of activated sludge*, IWA Publishing, 2010.
- [13] Tischer, K., Zeder, M., Klug, R., Pernthaler, J., Schattenhofer, M., Harms, H., Wendeberg A.: Fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH) of microorganisms in hydrocarbon contaminated aquifer sediment samples, *Syst. Appl. Microbiol.*, 2012, 35(8), 526-532.
- [14] Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A.: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56(6), 1919-1925.
- [15] Hug, T., Gujer, W., Siegrist H.: Rapid quantification of bacteria in activated sludge using fluorescence in situ hybridization and epifluorescence microscopy. *Water Research*, 2005, 39, 3837-3848.

