

Ewa Liwarska-Bizukojć

Skład biocenozy bakteryjnej osadu czynnego na przykładzie miejskiej oczyszczalni ścieków w Zgierzu

Osad czynny stanowi złożoną biocenozę, w której dominują bakterie i pierwotniaki. Od początku wykorzystywania procesu osadu czynnego w technologii oczyszczania ścieków, to jest od ponad stu lat, prowadzone są badania składu tej biocenozy, przy czym w ostatnich dwudziestu latach – za sprawą rozwoju technik biologii molekularnej – nastąpił ogromny postęp w identyfikacji bakterii wchodzących w skład osadu czynnego. Wśród tych technik należy wymienić reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), elektroforezę żelową i jej odmiany, klonowanie fragmentów DNA, sekwencjonowanie DNA, hybrydyzacje różnego typu, hybrydyzację fluorescencyjną *in situ* (FISH), białka GFP, mikromacierze DNA [1]. W ostatnich latach w badaniach nad składem bakteryjnym osadu czynnego najczęściej wykorzystuje się metodę FISH i sekwencjonowanie genu 16S rRNA [2–4]. Techniki biologii molekularnej cechują się dużą czułością i powtarzalnością i – w przeciwieństwie do metod tradycyjnych – nie wymagają hodowli mikroorganizmów. Znane są też pewne wady i ograniczenia w stosowaniu takich analiz, na przykład wysokie koszty sond oligonukleotydowych i barwników fluorescencyjnych, a także konieczność stosowania zaawansowanego technologicznie sprzętu (mikroskopy fluorescencyjne lub konfokalne) i prowadzenia analiz przez wysoko wykwalifikowaną kadrę. Pomimo intensywnego rozwoju metod biologii molekularnej, nadal stosunkowo duży udział w osadzie czynnym stanowią bakterie niezidentyfikowane – na poziomie taksonomicznym typu przeważnie od kilku do około 30% [5]. Im niższa taksonomicznie jednostka, tym odsetek niezidentyfikowanych bakterii jest większy. W pracy [6] zidentyfikowano 30÷60% bakterii osadu czynnego wykorzystywanego w oczyszczalniach ścieków w Japonii, a autorzy pracy [4] rozpoznali 40÷66% bakterii obecnych w laboratoryjnym bioreaktorze typu SBR oczyszczającym syntetyczne ścieki komunalne. W układach oczyszczania ścieków rzeczywistych udział niezidentyfikowanych bakterii jest przeważnie większy niż w laboratoryjnych systemach osadu czynnego, do których doprowadzane są ścieki o znanym – niezmiennym – składzie, co sprzyja stabilizacji składu mikroorganizmów i nie powoduje takiej presji ewolucyjnej.

Biologia molekularna znajduje różnorodne zastosowania w poznawaniu i udoskonalaniu technologii oczyszczania ścieków osadem czynnym. Jednym z nich jest identyfikacja bakterii osadu czynnego w oczyszczalniach ścieków

i rozpoznanie jego zmian w zależności od parametrów technologicznych czy pory roku. Tej tematyce poświęconych było wiele prac badawczych przeprowadzonych za granicą [2, 3, 5, 6, 8–12] oraz kilka w Polsce [4, 7, 13]. Tworzone są bazy danych o mikroorganizmach dominujących w oczyszczalniach ścieków w danym kraju. Na przykład w Danii skonstruowano mikrobiologiczną bazę danych dotyczącą duńskich oczyszczalni ścieków o nazwie MiDas-Dk.

Metody biologii molekularnej znalazły zastosowanie w identyfikacji ważnych z technologicznego punktu widzenia mikroorganizmów, takich jak bakterie odpowiedzialne za usuwanie azotu, a szczególnie za proces nitrifikacji [8], bakterie akumulujące polifosforany [12, 14, 15] czy wreszcie bakterie nitkowate [11, 16]. Te ostatnie dotychczas identyfikowano na podstawie cech morfologicznych, przy czym często jest to niewystarczające, gdyż dany morfotyp może obejmować kilka typów filogenetycznych o różnych właściwościach ekofizjologicznych. Zastosowanie odpowiednich sond oligonukleotydowych pozwala na jednoznaczную identyfikację gatunkową tych bakterii [11, 16], które najprawdopodobniej są odpowiedzialne za tworzenie agregatów bakteryjnych w formie kłaczków w większym stopniu niż bakterie z rodzaju *Zooglea* [14, 17]. Dotychczasowe badania potwierdziły obecność wielu gatunków bakterii odpowiedzialnych za usuwanie związków azotu i fosforu ze ścieków, a także udało się oszacować udział liczbowy bakterii utleniających azot amonowy (AOB – ammonium oxidizing bacteria) oraz utleniających azotany(III) do azotanów(V) (NOB – nitrite oxidizing bacteria), a także bakterii denitryfikacyjnych akumulujących polifosforany (DPAO – denitrifying phosphate accumulating microorganisms) [14, 15].

Badania omówione w niniejszej pracy miały na celu identyfikację składu bakteryjnego osadu czynnego w oczyszczalni ścieków komunalnych w Zgierzu i tym samym poszerzenie bazy danych o mikroorganizmach obecnych w polskich oczyszczalniach ścieków. Skład osadu czynnego został zidentyfikowany za pomocą technik biologii molekularnej.

Materiały i metody

Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowił osad czynny z oczyszczalni ścieków komunalnych w Zgierzu. Próbkę osadu pobrano jednorazowo z dwóch części komory osadu czynnego, to jest z części, w której panują warunki beztlenowe oraz z części, w której panują warunki tlenowe. Osad został

pobrano w trzech miejscach części beztlenowej komory oraz w trzech miejscach części tlenowej. Następnie próbki osadu z każdego punktu z danej części komory osadu czynnego zostały delikatnie wymieszane i w ten sposób uzyskano dwie uśrednione próbki osadu pochodzące z dwóch części komory różniących się warunkami tlenowymi.

Oczyszczalnia ścieków w Zgierzu oczyszcza ścieki odprowadzane z miasta i okolicznych gmin, przy czym udział ścieków przemysłowych w ogólnej ilości ścieków nie przekracza 20%. W czasie pobierania próbek osadu do badań średni dopływ ścieków do oczyszczalni wynosił $9090 \pm 80 \text{ m}^3/\text{d}$. Próbki osadu zostały pobrane w warunkach pogody suchej, a średnia temperatura ścieków w komorze osadu czynnego wynosiła $23,4^\circ\text{C}$. Zawartość tlenu rozpuszczonego w części beztlenowej komory wynosiła $0,01 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$, a w części tlenowej zmieniała się od $2,11 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$ do $4,09 \text{ mgO}_2/\text{dm}^3$, przy czym największą ilość tlenu stwierdzono w trzeciej strefie komory.

Sucha masa osadu czynnego wynosiła średnio $4,2 \text{ g}/\text{dm}^3$, sucha masa organiczna – $3,0 \text{ g}/\text{dm}^3$, indeks objętościowy – $53 \text{ cm}^3/\text{g}$, a wiek osadu – 22,3 d. Obciążenie osadu czynnego (w odniesieniu do jego suchej masy) ładunkiem zanieczyszczeń (wyrażonych wartością BZT₅) wynosiło średnio $0,08 \text{ mgO}_2/(\text{mg}\cdot\text{d})$.

Identyfikacja bakterii w osadzie czynnym

Próbki osadu czynnego pobrano do sterylnych pojemników o pojemności 250 cm^3 . Następnie zostały one umieszczone w izolowanym termicznie opakowaniu, obłożone lodem i w takim stanie przekazane firmie A&A Biotechnology (Polska), w której przeprowadzono analizę składu bakteryjnego osadu czynnego. Analiza ta składała się z dwóch zasadniczych etapów – w pierwszym przeprowadzono izolację genomowego DNA, natomiast w drugim wykonano sekwencjonowanie wraz z analizą bioinformatyczną sekwencji. Izolacja genomowego DNA została przeprowadzona z wykorzystaniem zestawu Sherlock AX firmy A&A Biotechnology według opracowanego przez nią protokołu. Następnie wyizolowane DNA zostało poddane sekwencjonowaniu NGS (next-generation sequencing), w skład którego wchodziła amplifikacja specyficznego regionu V4 16rRNA oraz sekwencjonowanie na sekwencjonatorze genomowym MiSeq połączone z analizą bioinformatyczną z użyciem programu MiSeq Reporter (MSR) v. 2.4, protokół 16S Metagenomics. Protokół ten zapewnia klasyfikację na poziomie gatunku, opierając się na zmodyfikowanej bazie danych sekwencji referencyjnych Greengenes v13_5 [18].

Omówienie wyników badań

W tabeli 1 przedstawiono udział zidentyfikowanych – w części tlenowej i beztlenowej komory osadu czynnego – bakterii na poszczególnych poziomach taksonomicznych. Był on podobny do tego, jaki opisano w innych pracach dotyczących identyfikacji bakterii osadu czynnego w układach oczyszczania ścieków komunalnych [11, 20]. Zgodnie z tym, co zaobserwowano już wcześniej [4, 21], odsetek zidentyfikowanych bakterii zmniejszał się na kolejnych poziomach taksonomicznych, to jest malał od królestwa do gatunku. Prawie wszystkie mikroorganizmy spośród sklasyfikowanych na poziomie królestwa to bakterie. Archeony stanowiły 0,20% w części beztlenowej i 0,18% w części tlenowej komory osadu czynnego.

Tabela 1. Procentowy udział bakterii zidentyfikowanych w osadzie czynnym na poszczególnych poziomach taksonomicznych
Table 1. Percentage contribution of identified bacteria at different taxonomic levels in activated sludge

Poziom taksonomiczny	Komora osadu czynnego	
	część beztlenowa	część tlenowa
Królestwo	99,83%	99,77%
Typ	97,88%	97,72%
Klasa	97,47%	07,34%
Rząd	94,24%	94,24%
Rodzina	90,74%	90,50%
Rodzaj	86,51%	86,93%
Gatunek	46,14%	43,95%

Badania taksonomiczne wykazały, że na poziomie typu największą grupą bakterii były *Proteobacteria*, które stanowiły średnio około 59% całej populacji bakterii, zidentyfikowanych niezależnie od warunków tlenowych panujących w komorze osadu czynnego. Udział bakterii należących do tego typu był stosunkowo wysoki, choć podobny został stwierdzony w osadzie czynnym z niemieckich (65%) i duńskich (54%) oczyszczalni ścieków komunalnych [9, 10].

Niewiele mniejszy udział *Proteobacteria* zaobserwowano w osadzie czynnym pochodzącym z laboratoryjnego modelu komory osadu czynnego, w której oczyszczane były syntetyczne ścieki bytowe (tab. 2), natomiast w jednej z podwarszawskich oczyszczalni ścieków komunalnych udział *Proteobacteria* w osadzie czynnym był znacznie mniejszy i wynosił średnio około 36% [4].

W tabeli 2 porównano udział bakterii należących do poszczególnych typów w osadzie czynnym z wybranych oczyszczalni ścieków komunalnych, w tym z laboratoryjnego modelu komory osadu czynnego. Ten ostatni skład podano ze względu na to, że do jego określenia zastosowano

Tabela 2. Procentowy udział bakterii należących do poszczególnych typów w osadzie czynnym z oczyszczalni ścieków komunalnych [4, 10] oraz z układu laboratoryjnego [19]
Table 2. Percentage contributions of different bacterial phyla in activated sludge from wastewater treatment plant [4, 10] and laboratory system [19]

Typ bakterii	Komora tlenowa osadu czynnego			
	badania własne*	[4]	[10]	[19]*
<i>Proteobacteria</i>	59,2%	36%	56%	49,7%
<i>Actinobacteria</i>	13,8%	15%	13%	17,0%
<i>Bacteroidetes</i>	5,9%	–	17%	3,2%
<i>Firmicutes</i>	5,3%	0,5%	–	5,3%
<i>Planctomycetes</i>	5,3%	–	–	2,1%
<i>Verrucomicrobia</i>	3,6%	–	–	–
<i>Chloroflexi</i>	2,3%	12%	8%	11,3%
<i>Nitrospirae</i>	–	3%	4%	1,0%
<i>Saprospiraceae</i>	–	3%	–	–
TM7	–	–	2%	–
Inne	2,3%	–	–	7,4%

*analiza została przeprowadzona według tej samej metody przez A&A Biotechnology (Polska)

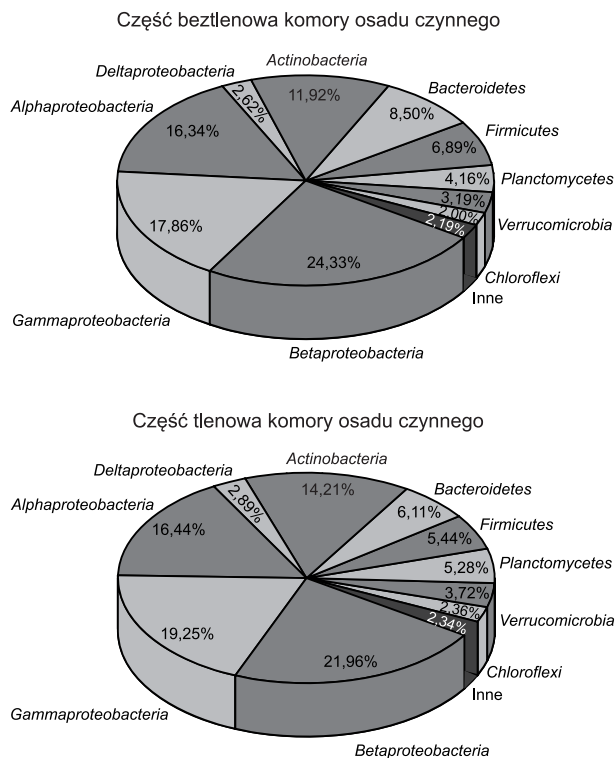
ten sam protokół analityczny [19], który był wykorzystany w tej pracy. Analizując dane zawarte w tabeli 2 uwagę zwraca niewielki, w porównaniu z innymi oczyszczalniami, udział bakterii należących do typu *Chloroflexi*. Udział tych bakterii w badanym w tej pracy osadzie czynnym wynosił 2% w warunkach beztlenowych i 2,3% w warunkach tlenowych, natomiast w osadzie czynnym z oczyszczalni ścieków badanej przez autorów pracy [4] bakterie należące do tego typu stanowiły 12%. Z kolei w pracach [9] i [10] udział *Chloroflexi* był mniejszy i zbliżony do tego w badanym osadzie ze zgierskiej oczyszczalni ścieków – odpowiednio 5% i 8%. Autorzy pracy [11] zaobserwowali większy udział *Chloroflexi* w osadzie czynnym z duńskich oczyszczalni ścieków latem niż zimą. Do typu *Chloroflexi* należy duża część bakterii nitkowatych obecnych w osadzie czynnym. Niewielka wartość indeksu objętościowego osadu czynnego w Zgierzu (zwykle poniżej $70 \text{ cm}^3/\text{g}$, a w czasie poboru próbek do badań identyfikacyjnych bakterii – $53 \text{ cm}^3/\text{g}$) i jego bardzo dobre właściwości sedymentacyjne pokrywają się z danymi uzyskanymi dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej. Udział bakterii *Chloroflexi* może być wskaźnikiem obecności bakterii nitkowatych w osadzie czynnym, ważnym w eksploatacji oczyszczalni ścieków, ale nie przesądza o właściwościach osadu, gdyż bakterie nitkowane mogą wchodzić także w skład innych klas.

Wśród *Proteobacteria* dominowały *Betaproteobacteria*, niezależnie od warunków tlenowych panujących w komorze osadu czynnego. Ich udział wynosił 22% w warunkach beztlenowych i 24,3% w warunkach tlenowych (rys. 1). Podobne wyniki, to jest stosunkowo największy udział klasy *Betaproteobacteria* spośród *Proteobacteria*, uzyskali autorzy prac [10] i [4] – odpowiednio $38\% \pm 1\%$. W części beztlenowej komory więcej było

bakterii z klasy *Gammaproteobacteria*, a w części tlenowej – *Alphaproteobacteria*. Udział *Alphaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria* w badanym osadzie czynnym był stosunkowo znaczny, w porównaniu z udziałem tych klas bakterii w osadzie czynnym badanym w innych pracach. Na przykład był większy niż w podwarszawskiej oczyszczalni ścieków [4] czy też w duńskich oczyszczalniach ścieków [14], przy czym autorzy pracy [20] zaobserwowali podobny udział *Alphaproteobacteria* (7% i 15%) i *Gammaproteobacteria* (między 4% a 13%) w osadzie czynnym, jak w niniejszej pracy (rys. 1).

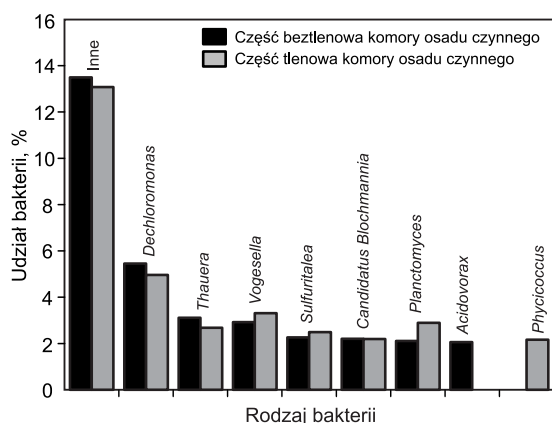
Analizując udział poszczególnych klas bakterii w zależności od warunków tlenowych panujących w komorze osadu czynnego można stwierdzić, że w warunkach beztlenowych było więcej bakterii z klas *Sphingobacteria* i *Clostridia* niż w warunkach tlenowych. Z kolei w warunkach tlenowych było więcej bakterii z klas *Actinobacteria* i *Planctomycetia* niż stwierdzono w warunkach beztlenowych. *Clostridia* to Gram-dodatnie laseczki bytujące w środowisku beztlenowym, takim jak na przykład gleba czy przewód pokarmowy zwierząt (w tym człowieka), stąd zrozumiała jest ich dość liczna obecność w środowisku o małej zawartości tlenu rozpuszczonego. Należą one do typu *Firmicutes*, który też był liczniej reprezentowany w warunkach beztlenowych niż tlenowych (rys. 1). *Actinobacteria* to promieniowce klasyfikowane jako bakterie Gram-dodatnie, występujące przede wszystkim w środowisku glebowym, ale obecne także w wodach i to zarówno słonych, jak i słodkich. Mają duże zdolności do degradacji związków organicznych, a także adaptacji do różnych warunków. Zdecydowana większość promieniowców to tlenowce, dlatego ich większy udział w napowietrzanej części komory osadu czynnego jest zrozumiała. Udział *Actinobacteria* w osadzie czynnym ze zgierskiej oczyszczalni wynosił 11,9% (warunki beztlenowe) lub 14,2% (warunki tlenowe) i był podobny do udziału tej klasy bakterii w innych osadach. Na przykład w osadzie czynnym z podwarszawskiej oczyszczalni wynosił on 15% [4], a w osadzie z modelu laboratoryjnego – 17% [4]. *Planctomycetia* to bakterie bytujące przede wszystkim w środowisku wodnym, głównie w wodach o dużym zasoleniu. W pracy [21] przeprowadzono badania nad obecnością bakterii z klasy *Planctomycetia* w oczyszczalni ścieków komunalnych i zaobserwowano wiele gatunków bakterii z tej klasy w osadzie czynnym – miały one często metabolizm znany z procesu anammox. Ponadto stwierdzono, że występowały one głównie w warunkach aerobowych i anoksycznych, natomiast mniej licznie w warunkach anaerobowych [21], co pokrywa się z wynikami badań molekularnych uzyskanymi w tej pracy.

Pod względem rodzaju w obu częściach komory osadu czynnego dominowały te same rodzaje bakterii, to jest *Dechloromonas*, *Vogesella*, *Planctomyces*, *Thauera*, *Sulfuritalea*, *Candidatus* i *Blochmannia* (rys. 2). W części beztlenowej liczniej obecne były bakterie z rodzaju *Acidovorax*, podczas gdy w części tlenowej z rodzaju *Phycoccus*. *Acidovorax* to *Betaproteobacteria* będące względnie beztlenowcami (rys. 2), natomiast *Phycoccus* to aerofile należące do *Actinobacteria*, dlatego zrozumiała jest ich obecność i identyfikacja w części tlenowej komory osadu czynnego. Bakterie z rodzaju *Dechloromonas* to *Betaproteobacteria*, wyposażone w organelle ruchu, względne beztlenowce. Bakterie należące do tego rodzaju mają różne uzdolnienia i mogą pełnić wiele funkcji w biologicznym oczyszczaniu ścieków. Na przykład bakterie *Dechloromonas aromatica*



Rys. 1. Klasyfikacja taksonomiczna bakterii w osadzie czynnym na poziomie typu lub klasy (*Proteobacteria*), na podstawie wyników sekwencjonowania NGS

Fig. 1. Taxonomic classification of microorganisms in activated sludge according to the phylum (*Proteobacteria*) based on NGS sequencing



Rys. 2. Rodzaje bakterii zidentyfikowanych w części beztlenowej i tlenowej komory osadu czynnego

Fig. 2. The genera of bacteria identified in anaerobic and aerobic part of activated sludge chamber

mogą rozkładać benzen w warunkach beztlenowych, a także utleniać toluen i ksylen w warunkach tlenowych. Z kolei *Dechloromonas denitrificans* mają zdolność do redukcji azotanów(V) do N_2O , zaś gatunki *Dechloromonas aromatica* i *Dechloromonas hortensis* mogą redukować chlorany(VII).

Skład zidentyfikowanych gatunków również nie różnił się znacząco w obu częściach komory osadu czynnego o różnych warunkach tlenowych. Wśród gatunków zidentyfikowanych w obu częściach komory były *Vogesella per lucida*, *Candidatus Blochmannia rufipes*, *Dechloromonas hortensis*, *Runella limosa* i *Dechloromonas denitrificans*. Ponadto w warunkach beztlenowych stwierdzono znaczący udział *Acidovorax temperans* i *Thauera mechernichensis*, natomiast w warunkach tlenowych – *Allochro matium palmeri* i *Saccharopolyspora shandongensis*. To stosunkowo małe zróżnicowanie składu bakterii osadu czynnego na poziomie rodzaju czy gatunku może wynikać z przyczyn technologicznych i/lub z niedoskonałości metody, która nie pozwalała na sklasyfikowanie wielu bakterii wchodzących w skład osadu czynnego (tab. 1). Jednak przede wszystkim trzeba wziąć pod uwagę fakt, że wiele gatunków bakterii wchodzących w skład osadu czynnego (np. względne beztlenowce) może przełączać swój metabolizm w zależności od warunków tlenowych. Dla nich końcowym akceptorem elektronów mogą być zarówno proste związki organiczne (np. aldehydy) lub nieorganiczne (np. NO_3^-), jak również tlen cząsteczkowy.

Podsumowanie

Przynależność taksonomiczna bakterii występujących w osadzie czynnym z oczyszczalni ścieków w Zgierzu nie odbiegała znacząco od składu jakościowego bakterii w osadach z innych europejskich oczyszczalni ścieków komunalnych. Podobnie jak w innych oczyszczalniach ścieków, na poziomie typu największy udział miały *Proteobacteria*, a wśród nich najwięcej było bakterii należących do klasy *Betaproteobacteria*. Analizowany osad czynny wyróżniał się względnie małą liczebnością bakterii z klasy *Chloroflexi*, co pokrywało się z obserwacjami makroskopowymi, wskazującymi na dobre właściwości sedimentacyjne tego osadu. Warunki tlenowe miały raczej niewielki wpływ na skład bakterii osadu czynnego – mogły powodować jedynie większy udział bakterii aerofilnych w części napowietrzanej komory osadu czynnego i/lub większy

udział beztlenowców w jej części nienapowietrzanej. W badanym osadzie czynnym stwierdzono większy udział bakterii z klasy *Clostridia* w warunkach beztlenowych, a w warunkach tlenowych większy udział bakterii *Actinobacteria* i *Planctomycetia*.

Badania przeprowadzono w ramach projektu rozwojowego NR14-004-10.

LITERATURA

1. A. RASZKA, A. ZIEMBIŃSKA, A. WIECHETEK: Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej. *Czasopismo Techniczne. Środowisko* 2009, vol. 2-Ś, ss. 101–114.
2. M. ALBERTSEN, L.B. HANSEN, A.M. SAUNDERS, P.H. NIELSEN, J.L. NIELSEN: A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 2012, Vol. 6, pp. 1094–1106.
3. M. KAEVSKA, P. VIDENSKA, P. VASICKOVA: Changes in microbial composition of wastewater during treatment in a full-scale plant. *Current Microbiology* 2016, Vol. 72, pp. 128–132.
4. A. MUSZYŃSKI, A. TABERNACKA, A. MIŁOBĘDZKA: Long-term dynamics of the microbial community in a full-scale wastewater treatment plant. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2015, Vol. 100, pp. 44–51.
5. T. ZHANG, M.-F. SHAO, L. YE: 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The International Society for Microbial Ecology Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 2012, Vol. 6, pp. 1137–1147.
6. M.-T. WONG, T. MINO, R. J. SEVIOUR, M. ONUKI, W. T. LIU: In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorus removal plants in Japan. *Water Research* 2005, Vol. 39, pp. 2901–2914.
7. A. MUSZYŃSKI, M. ŁEBKOWSKA, A. TABERNACKA, A. MIŁOBĘDZKA: From macro to lab-scale: Changes in bacterial community led to deterioration of EBPR in lab reactor. *Central European Journal of Biology* 2013, Vol. 8, No. 2, pp. 130–142.
8. A. GONZALEZ-MARTINEZ, A. RODRIGUEZ-SANCHEZ, B. MUNÓZ-PALAZON, M.-J. GARCIA-RUIZ, F. OSORIO, M.C.M. van LOOSDRECHT, J. GONZALEZ-LOPEZ: Microbial community analysis of a full-scale DEMON bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2015, Vol. 38, pp. 499–508.
9. S. JURETSCHKO, A. LOY, A. LEHNER, M. WAGNER: The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Systems Applied Microbiology* 2002, Vol. 25, pp. 84–99.
10. Y. KONG, Y. XIA, Y.L. NIELSEN, P.H. NIELSEN: Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant. *Microbiology* 2007, Vol. 153, pp. 4061–4073.
11. A.T. MIELCZAREK, C. KRAGELUND, P.S. ERIKSEN, P.H. NIELSEN: Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal. *Water Research* 2012, Vol. 46, pp. 3781–3795.
12. A.T. MIELCZAREK, H.T. NGUYEN, J.L. NIELSEN, P.H. NIELSEN: Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants. *Water Research* 2013, Vol. 47, pp. 1529–1544.
13. A. CYDZIK-KWIATKOWSKA, M. ZIELINSKA, I. WOJNOWSKA-BARYŁA: Impact of operational parameters on bacterial community in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Polish Journal of Microbiology* 2012, Vol. 61, pp. 41–49.

14. P. H. NIELSEN, A. T. MIELCZAREK, C. KRAGELUND, J. L. NIELSEN, A. M. SAUNDERS, Y. KONG, A. A. HANSEN, J. VOLLERTSEN: A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Research* 2010, Vol. 44, No. 17, pp. 5070–5088.
15. P. H. NIELSEN, A. M. SAUNDERS, A. A. HANSEN, P. LARSEN, J. L. NIELSEN: Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater – a model system in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 2012, Vol. 23, pp. 452–459.
16. A. MIŁOBĘDZKA, A. MUSZYŃSKI: Selection of methods for activated sludge bulking control using a molecular biology technique combined with respirometric tests. *BioTechnology. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 2016, Vol. 97, No. 3, 187–193.
17. P. H. NIELSEN, K. D. MCMAHON: Microbiology and microbial ecology of the activated sludge process. In: D. JENKINS, J. WANNER [Eds.]: *Activated Sludge – 100 Years and Counting*. IWA Publishing, London 2014.
18. T. Z. DESANTIS, P. HUGENHOLTZ, N. LARSEN, M. ROJAS, E. L. BRODIE, K. KELLER, T. HUBER, D. DALEVI, P. HU, G. L. ANDERSEN: Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, Vol. 72, No. 7, pp. 5069–5072.
19. D. GENDASZEWSKA, E. LIWARSKA-BIZUKOJC: Adaptation of microbial communities in activated sludge to 1-decyl-3-methylimidazolium bromide. *Water Science and Technology* 2016, Vol. 74, No. 5, pp. 1227–1234.
20. M. SCHMID, A. THILL, U. PURKHOLD, M. WALCHER, J. Y. BOTTERO, P. GINESTET, P. H. NIELSEN, S. WUERTZ, M. WAGNER: Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Water Research* 2003, Vol. 37, No. 37, pp. 2043–2052.
21. R. CHOUARI, D. le PASLIER, P. DAEGELEN, P. GINESTET, J. WEISSENBACH, A. SGHIR: Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Applied Environmental Microbiology* 2003, Vol. 69, No. 12, pp. 7354–7363.

Liwarska-Bizukojc, E. Composition of Activated Sludge Biocenosis in the Example of Municipal Wastewater Treatment Plant for a City of Zgierz. *Ochrona Środowiska* 2017, Vol. 39, No. 4, pp. 3–7.

Abstract: Molecular biology techniques allow for increasingly more thorough identification and understanding of functionality of microorganisms consortia involved in wastewater treatment or waste degradation processes. In this work, the bacterial community of activated sludge from the wastewater treatment plant in Zgierz (Poland) was identified. As a result, a somewhat limited database of microorganisms living in Polish wastewater treatment plants was supplemented with new data. The composition of bacterial community was identified with molecular biology techniques in two main stages: (1) isolation of genomic DNA, (2) DNA sequencing and bioinformatics

analysis of the isolated sequences. The analyses revealed that the most abundant phylum was *Proteobacteria* with *Betaproteobacteria* present in highest numbers. Composition of the activated sludge was relatively low in *Chloroflexi* class bacteria. It is in alignment with macroscopic observations indicating good settlement properties of the activated sludge from the wastewater treatment plant in Zgierz. It was determined that aerobic (redox) conditions in the activated sludge chamber did not influence the composition of bacterial community. They might only cause increase in the contribution of aerobic bacteria in the aerated (oxygenated) part of the chamber or the anaerobic organisms in its anaerobic (deoxygenated) section.

Keywords: Bacteria, identification, molecular biology, isolation of genomic DNA, DNA sequencing, wastewater treatment plant, activated sludge, oxidoreductive conditions, biocenosis.