

Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, Grzegorz Cema, Marta Kalbarczyk, Sebastian Żabczyński

Wykorzystanie metody PCR-DGGE do badania zmienności genotypowej bakterii zasiedlających złożę tarczowe oczyszczające modelowe ścieki koksownicze

Węgiel kamienny oraz koks, powstający w wyniku przemysłowego wygrzewania tego surowca, są w Polsce jednymi z najczęściej wykorzystywanych paliw. Największe zasoby węgla, a także największe zakłady przemysłowe, będące odbiorcą koksu, znajdują się na południu Polski, głównie na Śląsku. W procesach wchodzących w skład technologii wytwarzania koksu powstaje znaczna ilość ścieków, których oczyszczanie stanowi istotny problem technologiczny, ponieważ zawierają one – oprócz znacznego ładunku azotu amonowego (przy praktycznym braku fosforanów) – cyjanki, rodanki, siarkowodór, tiosiarczany i siarczany(IV), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, fenole, smoły i oleje, a także niewielkie ilości metali śladowych. Taki skład ścieków, jak np. podany w tabeli 1 [1], jest wysoce szkodliwy dla mikroorganizmów i uniemożliwia w dużej mierze wykorzystywanie metod biologicznych do ich oczyszczania [2].

Oczyszczanie ścieków koksowniczych jest procesem skomplikowanym, a włączenie do układu technologicznego metod biologicznych musi być poprzedzone podczyszczeniem ścieków metodami fizyczno-chemicznymi [3]. Dopiero usunięcie zawiesin, zanieczyszczeń koloidalnych, znacznej części siarczków i cyjanków oraz refrakcyjnych związków organicznych, uznawanych za inhibitory procesów biologicznych, umożliwia skuteczne oczyszczanie tych ścieków metodami biologicznymi [4].

Ze względu na znaczny ładunek azotu amonowego, którym charakteryzują się ścieki koksownicze, dostrzeżono możliwość wykorzystania procesu Anammox (ANAerobic AMmonium OXidation) do ich biologicznego oczyszczania. Proces ten umożliwia usuwanie znacznych ilości azotu amonowego w sposób tańszy i skuteczniejszy niż tradycyjna kombinacja procesów nityfikacji i denityfikacji. Anammox to proces umożliwiający przeprowadzenie azotu w formie jonu amonowego do azotu gazowego. Był on przewidywany w obliczeniach termodynamicznych już od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku [5], jednak jego istnienie udowodniono dopiero w latach 90. XX w. i wówczas rozpoczęto szeroko zakrojone badania nad identyfikacją bakterii zdolnych do jego prowadzenia [6]. Ze względu na trudność badania takich bakterii w laboratorium na podłożach bakteriologicznych, najskuteczniejszą drogą ich identyfikacji i analiz są metody biologii molekularnej. Jednym z najbardziej użytecznych narzędzi

Tabela 1. Charakterystyka ścieków koksowniczych [2]
Table 1. Coke wastewater characteristics [2]

Wskaźnik, jednostka	Wartość
Temperatura, °C	36
pH	7,5÷9,1
Fenole lotne, g/m ³	260÷3000
Amoniak lotny, gNH ₄ ⁺ /m ³	110÷900
Azot amonowy, gNH ₄ ⁺ /m ³	980÷6500
Rodanki, gCNS ⁻ /m ³	100÷1500
Cyjanki, gCN ⁻ /m ³	10÷100
Siarczki, gH ₂ S/m ³	10÷600
Chlorki, gCl ⁻ /m ³	1640
Siarczany, gSO ₄ ²⁻ /m ³	1480
Tiosiarczany, gS ₂ O ₃ ²⁻ /m ³	290
Oleje i smoły, g/m ³	100÷240
Utlenialność, gO ₂ /m ³	2500÷10000

biologii molekularnej, pozwalającym monitorować zmiany genotypowe zachodzące w układach technologicznych, jest metoda PCR-DGGE (polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis) [7]. Łączy ona amplifikację metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z użyciem ogólnych i/lub specyficznych dla grupy bakteryjnej starterów z elektroforezą w gradiencie czynnika denaturującego. Na matrycy całkowitego DNA bakteryjnego, izolowanego ze środowiska, amplifikuje się fragment DNA o określonej starterami długości. Uzyskuje się w ten sposób mieszaninę fragmentów o tej samej długości, ale różniącą się sekwencją nukleotydów, ponieważ w próbce znajduje się znaczna liczba odmiennych genotypów bakteryjnych. Każdy z tych genotypów ma inną, zależną od liczby wiązań wodorowych, temperaturę topnienia DNA. Dodatkowo w procesie amplifikacji dołączany jest do amplikonów tzw. ogon GC, fragment około 30÷40 par zasad GC o wysokiej temperaturze topnienia, zapobiegający w trakcie rozdziału elektroforetycznego całkowitemu rozdzieleniu nici materiału genetycznego. Rozdział mieszaniny produktów PCR następuje w elektroforezie poliakryloamidowej, z utworzonym podczas wylewania żelu gradientem stężenia substancji denaturującej DNA – mocznikiem. W efekcie uzyskuje się wzór prążków DNA w próbce (fingerprint), różniący się temperaturą topnienia i obrazujący złożoność genotypową próbki. Wzory prążków można porównywać między sobą, a pojedyncze, dobrze oddzielone prążki DNA można wycinać z żelu i poddawać identyfikacji przez sekwencjonowanie.

Dr A. Ziemińska-Buczyńska, dr inż. G. Cema, mgr inż. M. Kalbarczyk, dr inż. S. Żabczyński: Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, ul. Akademicka 2, 44-100 Gliwice, aleksandra.ziembinska-buczynska@polsl.pl

Celem przeprowadzonych badań było określenie bioróżnorodności i zmienności mikroorganizmów tworzących błonę biologiczną w złożu tarczowym, oczyszczającym modelowe ścieki koksownicze, ze szczególnym uwzględnieniem grupy bakterii Anammox. W badaniach nad strukturą biocenozy bakterii oczyszczających ścieki koksownicze wykorzystano model złoża tarczowego, ponieważ taki układ technologiczny wykazuje znaczną skuteczność w oczyszczaniu ścieków, charakteryzowanych jako trudne do oczyszczania biologicznego. Biofilm, tworzący się na powierzchniach kontaktujących się ze ściekami, składa się ze znacznej liczby bakterii należących do różnych grup fizjologicznych, pracujących zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych [8]. Taka współpraca jest możliwa dzięki wytworzeniu się warunków anoksydacyjnych i beztlenowych w poszczególnych warstwach biofilmu na tarczach złoża. Biofilm bakteryjny, wytworzony w czasie pracy złoża na jego tarczach, jest odporny na działanie szkodliwych substancji zawartych w ściekach. Prawdopodobnie wynika to z faktu swoistego współdziałania różnych grup mikroorganizmów tworzących błonę biologiczną, które mają zdolność wytwarzania różnego rodzaju substancji zewnątrzkomórkowych (EPS – extracellular polymeric substances) chroniących całe konsorcjum. Dlatego też złożo biologiczne jest ciekawym obiektem nie tylko badań technologicznych, ale również ekologicznych mikroorganizmów.

Materiały i metody

Charakterystyka układu technologicznego i próbek do badań

Badania prowadzono przez 8 miesięcy na laboratoryjnym modelu złoża tarczowego składającego się z trzech komór połączonych szeregowo. Pierwsza komora złoża zasilana była w sposób ciągły ściekami modelowymi za pomocą pompy perystaltycznej, a następnie ścieki przepływały grawitacyjnie przez kolejne komory. W celu utrzymania stałej temperatury oraz w celu ograniczenia dopływu światła, aby zapobiec rozwojowi glonów i niekorzystnemu wpływowi promieniowania UV na bakterie Anammox, złożo zostało przykryte styropianową pokrywą. Parametry złoża biologicznego przedstawiono w tabeli 2, natomiast skład ścieków modelowych zawierających fenol (z zachowaniem proporcji składników ścieków koksowniczych) podano w tabeli 3.

Tabela 2. Parametry biologicznego złoża tarczowego
Table 2. Rotating biological contactor parameters

Parametr, jednostka	Wartość
Liczba komór	3
Liczba tarcz w komorze	4
Całkowita liczba tarcz	12
Średnica tarczy, m	0,225
Całkowita powierzchnia dostępna dla mikroorganizmów, m ²	2,61
Zanurzenie tarcz, %	41
Objętość czynna złoża, m ³	0,014

Tabela 3. Charakterystyka ścieków modelowych
Table 3. Synthetic wastewater characteristics

Składnik	Zawartość, g/m ³
NH ₄ Cl	3500
KH ₂ PO ₄	83
CH ₃ COONa	1300
C ₆ H ₅ OH	150
NaHCO ₃	7000

Skuteczność pracy układu modelowego kontrolowano wykonując oznaczenia chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) (standardową metodą dwuchromianową), fenoli (za pomocą testów kuwetowych Merck nr 114551), azotu amonowego (metodą bezpośredniej nessleryzacji), azotanów(III) (metodą kolorymetryczną z kwasem sulfanilowym i α -naftyloaminą) i azotanów(V) (metodą z dimetylofenolem), a także mierząc wartość strumienia objętości dopływających ścieków, temperatury i pH (pH-metr WTW pH 340i) oraz zawartość tlenu rozpuszczonego (tlenomierz WTW Oxi 340i). Próbkę do badania PCR-DGGE pobierano w objętości 20 cm³, a izolację DNA prowadzono na materiale całkowicie wymieszanym, pochodzącym ze wszystkich komór złoża, dzięki czemu zapewniono dobrą izolację DNA wszystkich grup fizjologicznych obecnych z błonę biologiczną. Materiał biologiczny zamrożono w temperaturze -45°C w sterylnych probówkach do późniejszej izolacji DNA.

Izolacja DNA bakteryjnego i amplifikacja metodą PCR

Izolację całkowitego DNA bakteryjnego prowadzono metodą mechaniczną z użyciem szklanych kulek o różnej średnicy. Materiał biologiczny intensywnie wytrząsano w celu zapewnienia jego homogeniczności, a następnie pobierano próbkę o masie 0,2 g i płukano trzykrotnie buforem 1×PBS (phosphate buffer saline, pH=7,4) w celu usunięcia inhibitorów reakcji PCR i innych potencjalnych zanieczyszczeń. Próbkę wirowano (1 min, 13 tys. obr./min) i zawieszano w buforze ekstrakcyjnym (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1,5 M NaCl, pH=8,0), dodając jednocześnie po 150 mg szklanych kulek o średnicach 1,25÷1,55 mm i 0,4÷0,6 mm (Roth, Germany). Materiał zawieszano w roztworze przez silne mieszanie, a następnie wytrząsano w pozycji horyzontalnej (20 min, 1400 obr./min) w termomikserze (Eppendorf) w celu zwiększenia powierzchni wytrząsania. Następnie dodawano 200 μ l 10% SDS i inkubowano w temperaturze 65°C przez 30 min z wytrząsaniem. Próbkę wirowano dwukrotnie (10 min, 13 tys. obr./min), a ciecz nadosadową przenoszono w objętości 500 μ l na kolumny krzemionkowe (A&A Biotechnology). Kolumnę wirowano (1 min, 13 tys. obr./min), a następnie DNA zasocjowane na złożu przemywano dwukrotnie roztworem SEWS, zawierającym 70% etanol (MP Biomedicals). DNA wymywano z kolumny sterylną wodą zdejonizowaną i przechowywano w stanie zamrożonym (-20°C).

Amplifikację metodą PCR prowadzono na genie kodującym 16S rRNA, uznawanym za uniwersalny marker bakteryjny do badań nad mikroorganizmami, z użyciem starterów 968f-GC i 1401r [9] (analiza wszystkich bakterii w biofilmie) oraz Pla46f-GC i 518r (analiza bakterii Anammox) [10]. Sekwencje starterów przedstawiono w tabeli 4. Mieszanina reakcyjna o objętości 30 μ l zawierała końcowe stężenie następujących odczynników: 1,5 U polimerazy

Tabela 4. Sekwencje starterów 968f-GC i 1401 R [9] oraz Pla46f-GC i 518r [10]

Table 4. Sequences of 968f-GC/1401 R [9] and Pla46f-GC/518r PCR primers [10]

Starter	Sekwencja 5'-3'
968f-GC*	AACGCGAAGAACCTTAC [9]
1401r	CGGTGTGTACAAGGCC [9]
Pla-46f-GC*	GATTAGGCATGCAAGTC [10]
518r	ATTACCGCGGCTGCTG [10]

*sekwencja ogona GC:
5' GCCCGGGCGCCCGGGCGGGGCGGGGCGACGGGGG 3'

(TAQ GoFlexi firmy Promega dla starterów 968f-GC/1401r oraz EconoTAQ firmy Lucigen dla starterów Pla46f-GC/518r), 1 × stężony bufor do polimerazy, 2 mM chloru magnezu, 5 pmol/μl każdego startera oraz 20 pmol/μl równomolowej mieszaniny nukleotydów. Matrycą DNA było całkowite DNA bakteryjne w ilości 0,2 μg/μl. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze C-1000 (BioRad). Schematy reakcji PCR przedstawiono w tabeli 5. Ewaluacji jakości produktu dokonano metodą elektroforezy agarozowej w żelu 0,8% (m/v, Promega) z bromkiem etydyny (10 mg/cm³, Promega) w obecności markera masy molekularnej 1 kb Ladder (Promega). Rozdział prowadzono w buforze 1 × TBE (Tris, kwas borowy, EDTA, pH=8,0) przez 30 min pod napięciem 70 V. Produkt wizualizowano w świetle UV.

Tabela 5. Schemat reakcji PCR dla starterów 968f-GC i 1401 R [9] oraz Pla46f-GC i 518r [10]

Table 5. PCR program for 968f-GC/1401 R [9] and Pla46f-GC/518r primers [10]

Reakcja PCR	Starter			
	968f-GC i 1401 R [9]		Pla46f-GC i 518r [10]	
Predenaturacja	94 °C/5 min		94 °C/5 min	
Denaturacja	94 °C/min	× 30	94 °C/min	× 30
Annealing	53 °C/min		53 °C/min	
Elongacja	72 °C/min		72 °C/2 min	
Końcowa elongacja	72 °C/10 min		72 °C/7 min	

Rozdział produktów PCR w gradiencie denaturacji

Rozdzielenie mieszaniny produktów reakcji PCR długości około 500 par zasad, będących fragmentami genu kodującego 16S rRNA wszystkich bakterii (startery 968f-GC i 1401r) oraz bakterii grupy Anammox (Pla-46f-GC i 518r) metodą elektroforezy w gradiencie denaturacji przeprowadzono w żelu poliakryloamidowym o stężeniu 8% (v/v), uformowanym w taki sposób, że zawierał gradient czynnika denaturującego (mocznik, Fluka) w zakresie 30÷60%. Reakcję prowadzono w systemie Dcode Mutation Detection System (BioRad), wypełnionym buforem 1 × TAE (Tris, kwas octowy, EDTA, pH=8,0) przez 12 h w temperaturze 60 °C pod napięciem 55 V. Żel po rozdziale barwiono z użyciem wodnego roztworu barwnika SYBR Gold (1:10000, Invitrogen) przez 30 min, a następnie wyplukiwano nadmiar barwnika wodą destylowaną przez 30 min. Wizualizację, archiwizację i analizę densytometryczną żelu przeprowadzono wykorzystując program Quantity One 1D Software (BioRad). W oparciu o dane densytometryczne obliczono wskaźnik bioróżnorodności Shannona [11].

Wyniki badań

Ponieważ proces Anammox jest bardzo wrażliwy na spadki temperatury, złoża tarczowe pracowało w temperaturze 20,8±2,3 °C, co jest temperaturą znacznie niższą niż optymalna (37 °C). Pomimo, że ścieki koksownicze mają z reguły podwyższoną temperaturę, to jednak w okresie zimowym charakteryzują się one spadkiem temperatury nawet o 15 °C. W efekcie temperatura ścieków dopływających do reaktora biologicznego może osiągać wartości nawet poniżej 25 °C [12]. Dodatkowo, ze względu na intensywne parowanie, złoża tarczowe narażone jest na znaczne wychłodzenie. W ostatnim czasie kilku autorów pokazało możliwości prowadzenia procesu Anammox w temperaturach znacznie niższych od optimum [13–15]. Jednak w badaniach tych nie wykazano obecności dodatkowych czynników toksycznych, które mogłyby hamować ten proces. Z tego względu zdecydowano się prowadzić badania w tzw. temperaturze pokojowej. Wartość pH w dopływie była stosunkowo stała i wynosiła 8,3±0,3. W tabeli 6 zebrano wyniki analiz i pomiarów prowadzonych w odstępach tygodniowych, natomiast na rysunku 1 przedstawiono skuteczność usuwania azotu amonowego i fenolu w trakcie trwania całego eksperymentu.

Materiał bakteriologiczny pobierano z tarcz złoża, izolowano całkowite bakteryjne DNA, które następnie amplifikowano z użyciem starterów dla wszystkich znanych bakterii oraz bakterii prowadzących proces Anammox. Rozdział tych fragmentów prowadzono metodą DGGE, a wybarwiony fluorescencyjnie żel obserwowano w świetle UV i archiwizowano zdjęcia. Monitoring zmienności wszystkich bakterii w złożu tarczowym w trakcie trwania eksperymentu, prowadzony metodą DGGE przedstawiono na rysunku 2, natomiast obraz produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów Pla-46f-GC i 518r oraz wzór prążków po ich rozdziale w DGGE pokazano na rysunku 3. Na rysunku 4 zaprezentowano zmiany indeksu bioróżnorodności Shannona obliczone w oparciu o obraz DGGE z rysunku 2.

Tabela 6. Charakterystyka parametrów dopływu i pracy złoża tarczowego

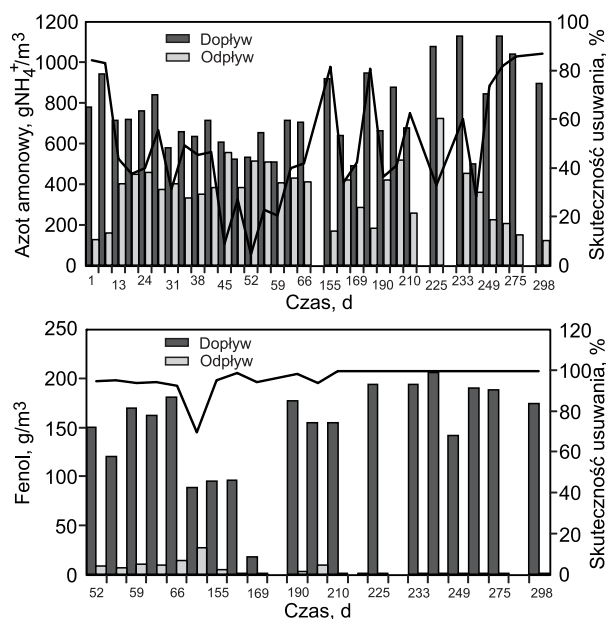
Table 6. Influent feed and operating parameter characteristics of rotating biological contactor

Wskaźnik, jednostka	Śr.	Min.	Maks.	Odch. stand.
Azot amonowy, gNH ₄ ⁺ /m ³	754,3	488,4	1130,1	186,2
Usuwanie azotu amon., %	48,6	4,4	86,6	23,6
ChZT, gO ₂ /m ³	1205	200	2750	689
Zmniejszenie ChZT, %	50,0	11,6	85,7	14,9
Fenol, g/m ³	150,3	18,0	206,0	47,7
Usuwanie fenolu, %	95,7	69,7	99,8	6,9
Strumień objętości, dm ³ /d	3,1	1,87	3,65	0,4
Czas przetrzymania, d	4,2	7,4	3,8	0,6
Temperatura w reaktorze, °C	20,8	18,4	26,3	2,3
pH w dopływie	8,3	8,0	8,79	0,3
pH w reaktorze	8,4	7,9	8,69	0,3
pH w odpływie	7,1	5,0	9,2	1,4

Dyskusja wyników

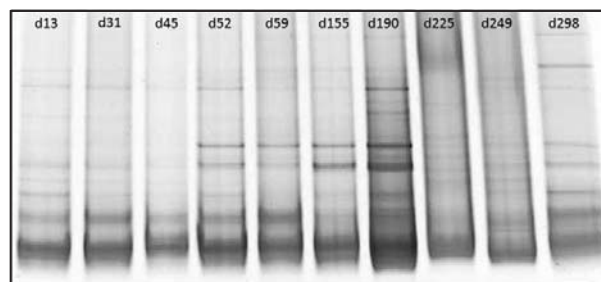
W trakcie badań nad oczyszczaniem modelowych ścieków koksowniczych w złożu tarczowym uzyskano wysoki i bardzo stabilny stopień usunięcia azotu amonowego wynoszący $95,9 \pm 3,7\%$ przez cały czas trwania eksperymentu (rys. 1). Usuwanie azotu ogólnego wynosiło natomiast średnio $48,6 \pm 23,6\%$, jednak nie było stabilne w całym czasie badań. Przez pierwsze 250 d badań usuwanie azotu było niestabilne i średnio wynosiło jedynie $44 \pm 21,5\%$. W tym czasie usuwanie azotu było związane w głównej mierze z procesem denitryfikacji. W początkowym etapie pracy złoża biologicznego obserwowano nagromadzenie azotanów(III), których zawartość przekraczała nawet $300 \text{ gNO}_3^-/\text{m}^3$. Takie duże ilości, utrzymujące się przez dłuższy czas, były także czynnikiem niesprzyjającym rozwojowi bakterii Anammox w złożu. W literaturze są bardzo duże rozbieżności dotyczące ilości azotanów(III) działających toksycznie w procesie Anammox, jednak przyjmuje się, że zawartość $>70 \text{ gNO}_3^-/\text{m}^3$ utrzymująca się przez dłuższy czas powoduje całkowitą inhibicję procesu Anammox [16]. W końcowym czasie badań obserwowano zmniejszenie ilości azotanów(III) i jednocześnie wzrost skuteczności usuwania azotu ogólnego, która w końcowym etapie badań wynosiła $82 \pm 5,9\%$. Jednocześnie zaobserwowano, że azot był usuwany głównie w drugiej komorze złoża biologicznego, podczas gdy zawartość fenolu i wartość ChZT były zmniejszane w pierwszej komorze. Zbyt mały stosunek zmniejszenia wartości ChZT do ilości usuniętego azotu w drugiej komorze złoża sugeruje, że za usuwanie azotu odpowiedzialny był w tym okresie proces Anammox. Usuwanie fenolu utrzymywało się na bardzo wysokim poziomie w trakcie całego czasu prowadzenia badań i wynosiło średnio $95,7 \pm 6,9\%$ (rys. 1), natomiast zmniejszenie wartości ChZT w trakcie trwania eksperymentu wynosiło średnio jedynie $50,0 \pm 24,9\%$.

Warto zwrócić uwagę, że awaria pompy w układzie (między 45. a 59. dobą eksperymentu) spowodowała drastyczne zmniejszenie skuteczności procesu usuwania azotu w złożu tarczowym, co miało odzwierciedlenie w strukturze



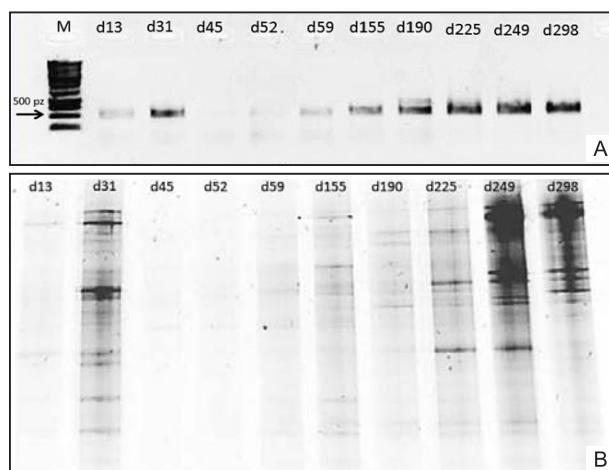
Rys. 1. Skuteczność usuwania fenolu i azotu amonowego w złożu tarczowym w trakcie trwania eksperymentu
Fig. 1. Phenol and ammonia nitrogen removal efficacy in rotating biological contactor during experiment

biocenozy złoża (rys. 2 i 3), gdzie stwierdzono zmianę jakościową we wzorach prążków, a w przypadku bakterii Anammox zanik produktu PCR (rys. 3A).



Rys. 2. Monitoring zmienności wszystkich bakterii w złożu tarczowym – obraz w świetle UV rozdzielu metodą DGGE fragmentów PCR o długości 500 pz amplifikowanych z użyciem starterów 968f-GC i 1401r

Fig. 2. Monitoring of total bacterial variability in RBC – UV image of DGGE separation of 500 bp PCR fragments amplified with 968f-GC and 1401r primers



Rys. 3. Monitoring zmienności bakterii Anammox w złożu tarczowym – obraz w świetle ultrafioletowym (A – produkty PCR (M – marker masy molekularnej 1 kb Ladder, Promega), B – rozdziel metodą DGGE fragmentów PCR o długości 500 pz amplifikowanych z użyciem starterów Pla-46f-GC i 518r)

Fig. 3. Monitoring of Anammox bacteria variability in RBC – UV image: (A) PCR products, (M) – molecular weight marker, 1 kb Ladder (Promega), (B) DGGE separation of 500 bp PCR fragments amplified with Pla-46f-GC and 518r primers

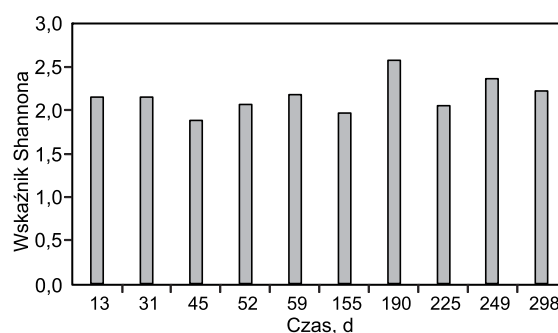
Aby wykazać różnicę w strukturze biocenozy biofilmu podjęto próbę analizy składu genotypowego z użyciem elektroforezy w gradiencie denaturacji (DGGE) poprzedzonej amplifikacją PCR. Wynika to z faktu, że amplikony PCR pochodzą ze wszystkich genotypów bakteryjnych obecnych w układzie, o ile zawierają one gen markerowy. Najlepszy wynik monitorowania układów technologicznych uzyskuje się z użyciem markera molekularnego w postaci genu kodującego 16S rRNA. Jest to cząstka duża, stabilna funkcjonalnie i występująca u wszystkich bakterii, dzięki czemu z jej użyciem można monitorować skład i zmienność całej biocenozy bakteryjnej układu technologicznego. Dodatkowo możliwe jest wykorzystanie starterów charakterystycznych jedynie dla określonej podgrupy bakterii, w tym przypadku Anammox, odpowiedzialnych za beztlenowe usuwanie azotu amonowego.

Wielkość amplikonów genu kodującego 16S rRNA przygotowanych do badań zależy od celu eksperymentu, do którego się go używa [17]. W tym badaniu wykorzystano fragmenty PCR o długości ok. 500 pz zarówno

w przypadku ogólnej liczby bakterii, jak i grupy bakterii Anammox. Skład jakościowy bakterii w złożu tarczowym był porównywalny w przypadku obu par starterów użytych w eksperymencie. Warto jednak wspomnieć, że amplikony genu kodującego 16S rRNA dla bakterii Anammox nie są jednakowej jakości w trakcie trwania całego eksperymentu (rys. 3A). Amplikony z próbek uzyskanych w 13. i 31. dobie oraz w czasie od 155. do 298. doby były zdecydowanie bardziej intensywne niż próbki w 45., 52. i 59. dobie eksperymentu. Mimo iż wyników elektroforezy agarozowej nie powinno się analizować ilościowo lecz jakościowo, w tym przypadku warto jednak zastanowić się, czy bardzo słaba amplifikacja w przypadku próbek w 45., 52. i 59. dobie eksperymentu (pomimo porównywalnej jakości matrycowego DNA; dane nie zostały przedstawione w tej publikacji) nie wskazywałaby na zdecydowane zmniejszenie liczebności bakterii Anammox w układzie w tym czasie trwania eksperymentu, a następnie stopniowy wzrost liczby tych mikroorganizmów w dalszym etapie badań. Bakterie Anammox mnożą się zdecydowanie wolniej niż inne mikroorganizmy, a czas ich podwojenia wynosi około 11 d. Wykazano jednocześnie, że czas namnażania bakterii Anammox zależy w dużej mierze od ich przynależności systematycznej. Autorzy pracy [18] wykazali, że pomimo ustalenia czasu podwojenia tych bakterii w układzie membranowym na poziomie równym 11 d i 8 d, przy wieku osadu odpowiednio 16 d, a następnie 12 d, to w przypadku bakterii z rodzaju *Kuenenia* czas ich podwojenia może wynosić zaledwie około 3 d. Stąd przypuszczenie, że część biocenozy zawierająca bakterie prowadzące proces Anammox została drastycznie zubożona i potrzebowała znacznego czasu na odbudowę po zadziałaniu czynnika środowiskowego (prawdopodobnie tym czynnikiem była awaria pompy, skutkująca nagromadzeniem azotanów(III) w układzie). Jakość produktu PCR przekłada się jednocześnie na jakość rozdziału w gradiencie czynnika denaturującego i prążki uzyskane w przypadku próbek w 45., 52. i 59. dobie eksperymentu były bardzo słabe. Dlatego zdjęcie będące efektem elektroforezy jest stosunkowo słabej jakości i nie oszacowano poziomu bioróżnorodności w tych próbkach, gdyż wyniki odstawałyby znacząco od reszty analiz (rys. 3B).

Analiza zmienności genotypów bakteryjnych prowadzona metodą DGGE na amplikonach PCR wygenerowanych z użyciem starterów 968f-GC i 1401r pozwala wnioskować, że bioróżnorodność zbiorowiska w trakcie trwania eksperymentu był stabilna (oscylowała w okolicach wartości 2), czyli była to biocenoza przeciętnie bogata genotypowo (rys. 4). Zmienność tego zbiorowiska bakteryjnego była jednak jakościowa, nowe genotypy pojawiały się od próbki pobranej w 52. dobie eksperymentu. Jest możliwe, że ten sam czynnik (awaria pompy), który prawdopodobnie spowodował znaczne zubożenie biocenozy Anammox, był również powodem zmiany jakościowej w składzie genotypowym ogólnej biocenozy bakteryjnej. Zmiana ta nastąpiła jednak dopiero w 52. dobie eksperymentu (rys. 2), a w przypadku bakterii Anammox już w 45. dobie eksperymentu. Możliwe, że wynikało to z wyższej niż u innych bakterii tej biocenozy wrażliwości bakterii Anammox na czynniki środowiskowe.

Warto zwrócić uwagę na rysunku 2 na nagromadzenie materiału w dolnej części żelu DGGE. Pierwotnie założono, że rozdział DGGE trwał zbyt krótko (10 h), stąd nagromadzenie nierozdzielonego materiału w dolnej części żelu. Zdecydowano się więc wydłużyć czas rozdziału do 12 h. Po trzykrotnej próbie rozdziału amplikonów PCR w dłuższym



Rys. 4. Wskaźnik różnorodności Shannona wszystkich bakterii w złożu tarczowym oszacowany w oparciu o rozdział metodą DGGE fragmentów PCR o długości 500 pb amplifikowanych z użyciem starterów 968f-GC i 1401r

Fig. 4. Shannon diversity index for all bacteria in RBC estimated on the basis of DGGE separation of 500 bp PCR fragments amplified with 968f-GC and 1401r primers

czasie obraz żelu uzyskany po rozdziale i barwieniu był powtarzalny. Również zmiana polimerazy z Go Flexi TAQ (Promega) na EconoTAQ (Lucigen) nie dała poprawy obrazu, mimo że polimeraza EconoTAQ lepiej poradziła sobie z amplifikacją fragmentów genu kodującego 16S rRNA w przypadku bakterii Anammox. Na podstawie takiego wyniku założono, że polimeraza typu TAQ w obu przypadkach amplifikowała genotypy z większą zawartością par GC (dolna część żelu, o większej zawartości mocznika) w zwielokrotnionej formie lub jako niespecyficzny produkt PCR i nie było możliwe jego rozdzielanie w gradiencie denaturacji w takim zakresie. Dalszy etap badań zakłada wykorzystanie innych typów polimeraz (np. typu proofreading) oraz zmianę gradientu stężenia mocznika w celu sprawdzenia założonych hipotez.

W przeciwieństwie do ogólnej liczby bakterii wśród genotypów bakterii prowadzących proces Anammox przeważały genotypy uboższe w pary GC (górną część żelu, o mniejszej zawartości mocznika). Jednak ze względu na słabszą jakość produktów uzyskanych w tej amplifikacji nie można było oszacować poziomu bioróżnorodności. W oparciu o wcześniejsze stwierdzenie dotyczące ilościowego szacowania produktu amplifikacji PCR (rys. 3A) można założyć, że bioróżnorodność tych bakterii prawdopodobnie zwiększała się w czasie trwania eksperymentu.

Wnioski

- ◆ Biologiczne złożę tarczowe stanowi dobry układ technologiczny do oczyszczania ścieków zawierających substancje szkodliwe (np. fenol), do których należą ścieki koksownicze.

- ◆ Gen kodujący 16S rRNA sprawdza się jako marker w analizach zmienności biofilmu złoża tarczowego, zarówno do szacowania zmian w ogólnym składzie bakteryjnym, jak i składzie bakterii Anammox.

- ◆ W oparciu o wyniki rozdziału amplikonów PCR metodą elektroforezy agarozowej można założyć, że bakterie Anammox zostały usunięte z systemu i pojawiły się znów w rosnącej w czasie liczbie od 59. dobie eksperymentu. Taka luka w ich obecności w układzie może świadczyć o wpływie czynnika środowiskowego, jakim była awaria pompy prowadząca do nagromadzenia azotanów(III) spowalniających proces i wspiera wcześniejsze dane bibliograficzne dotyczące długiego czasu podwojenia komórek tych bakterii. We wzorze ogólnej bioróżnorodności również obserwowano w tym czasie zmianę jakościową biocenozy.

♦ Poziom bioróżnorodności w złożu tarczowym w trakcie eksperymentu był względnie stały, biocenoza należała do średnio bogatych genotypowo. Jednakże pomimo stabilnego poziomu bioróżnorodności zachodziły w niej zmiany jakościowe.

♦ Można przypuszczać, że polimerazy typu TAQ amplifikują część materiału ze złoża tarczowego w sposób niespecyficzny, nieulegający rozdziałowi w gradiencie czynnika denaturującego. Konieczne może być wykorzystanie innego typu polimerazy (np. proofreading) i/lub zmiana stężenia denaturanta w żelu DGGE.

Badania wykonano w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr NN523562138 na sprzęcie zakupionym w ramach projektu Śląska BIO-FARMA. Centrum Biotechnologii, Bioinżynierii i Bioinformatyki, EFRR PO IG, 2007–2013.

LITERATURA

1. B. BARTKIEWICZ: *Oczyszczanie Ścieków Przemysłowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
2. C.A. PAPADIMITRIOU, X. DABOU, P. SAMARAS, G.P. SAKELLAROPOULOS: Coke oven wastewater treatment by two activated sludge systems. *Global NEST Journal* 2006, Vol. 8, No. 1, pp. 16–22.
3. P. NING, H.-J., BART, Y. JIANG, A. de HAAN, C. TIEN: Treatment of organic pollutants in coke plant wastewater by the method of ultrasonic irradiation, catalytic oxidation and activated sludge. *Separation and Purification Technology* 2005, Vol. 41, No. 2, pp. 133–139.
4. P. BURMISTRZ, A. ROZWADOWSKI: Nowoczesne metody oczyszczania ścieków koksowniczych. *KARBO* 2008, vol. 4, ss. 192–197.
5. E. BRODA: Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 1977, Vol. 17, No. 6, pp. 491–493.
6. N.M. MOHAMED, K. SAITO, Y. TAL, R.T. HILL: Diversity of aerobic and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in marine sponges. *The ISME Journal* 2010, Vol. 4, pp. 38–48.
7. S. ZHOU, C. WEI, L. KE, H. WU: PCR-DGGE as a supplemental method verifying dominance of culturable microorganisms from activated sludge. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010, Vol. 20, No. 11, pp. 1592–1596.
8. B. KOLWZAN: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania (Analysis of biofilms – their formation and functioning). *Ochrona Środowiska* 2011, vol. 33, nr 4, ss. 3–14.
9. A. ZIEMBIŃSKA, A. RASZKA, J. TRUU, J. SURMACZ-GÓRSKA, K. MIKSCH: Molecular analysis of temporal changes of a bacterial community structure in activated sludge using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescent in situ hybridization (FISH). *Polish Journal of Microbiology* 2007, Vol. 56, No. 2, pp. 119–127.
10. Q. YANG, Z. JIA, R. LIU, J. CHEN, Molecular diversity and anammox activity of novel planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment system of a full-scale alcohol manufacturing plant. *Process Biochemistry* 2007, Vol. 42, pp. 180–187.
11. P. LI, Y. WANG, Y.H. WANG, K. LIU, L. TONG: Bacterial community structure and diversity during establishment of an anaerobic bioreactor to treat swine wastewater. *Water Science and Technology* 2010, Vol. 1, pp. 243–252.
12. Y.M. KIM, D. PARK, D.S. LEE, J.M. PARK: Instability of biological nitrogen removal in a cokes wastewater treatment facility during summer. *Journal of Hazardous Materials* 2007, Vol. 141, pp. 27–32.
13. B. SZATKOWSKA, E. PLAZA: Temperature as a factor influencing the Anammox process performance. *Water and Environmental Management Series, Young Researchers* 2006, pp. 51–58.
14. G. CEMA, J. WISZNIOWSKI, S. ŻABCZYŃSKI, E. ZABŁOCKA-GODLEWSKA, A. RASZKA, J. SURMACZ-GÓRSKA: Biological nitrogen removal from landfill leachate by deammonification assisted by heterotrophic denitrification in rotating biological contactor (RBC). *Water Science and Technology* 2007, Vol. 55, No. 8–9, pp. 35–42.
15. J. VÁZQUEZ-PADÍN, I. FERNÁNDEZ, M. FIGUEROA, A. MOSQUERA-CORRAL, J.-L. CAMPOS, R. MÉNDEZ: Applications of Anammox based processes to treat anaerobic digester supernatant at room temperature. *Bioresource Technology* 2009, Vol. 100, No. 12, pp. 2988–2994.
16. H.J.M. Op den CAMP, M.S.M. JETTEN, M. STROUS: Anammox. In: H. BOTHE, S.J. FERGUSON, W.E. NEWTON [Eds.]: *Biology of the Nitrogen Cycle*, Elsevier B.V., Amsterdam 2007, pp. 245–262.
17. A. ZIEMBIŃSKA, S. CIESIELSKI, J. WISZNIOWSKI: Comparison of PCR-DGGE and nested-PCR-DGGE approach for ammonia oxidizers monitoring in membrane bioreactor activated sludge. *Archives of Environmental Protection* 2014 (in press).
18. W. van der STAR, A.I. MICLEA, U.G. van DONGEN, G. MUYZER, C. PICIOREANU, M.C. van LOOSDRECHT: The membrane bioreactor: A novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and Bioengineering* 2008, Vol. 101, No. 2, pp. 286–294.

Ziemińska-Buczyńska, A., Cema, G., Kalbarczyk, M., Żabczyński, S. Application of PCR-DGGE to Study Genotypic Variability of Bacteria Inhabiting Rotating Biological Contactors Treating Synthetic Coke Wastewater. *Ochrona Środowiska* 2014, Vol. 36, No. 1, pp. 3–8.

Abstract: High ammonia nitrogen load of coke plant wastewater provided an opportunity to use the Anammox (ANaerobic AMmonium OXidation) process for its biological treatment. Biodiversity and variability of microorganisms in rotating biological contactor (RBC) biofilm treating synthetic coke wastewater was analyzed in the eight-month experiment with the main focus on the Anammox bacteria. Using PCR-DGGE (polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis) it was shown that the RBC biofilm was populated by Anammox

bacteria. Possibly, an unknown environmental factor (probably nitrate(III) build-up) caused significant decrease in Anammox bacteria number, leading to a qualitative change in the total bacterial community structure at the same time. However, despite qualitative changes the bacterial biodiversity level remained relatively constant during the course of the experiment. On the basis of the obtained results it may be assumed that TAQ polymerases amplify part of DNA material from the RBC in a non-specific manner and this material is not separated properly in denaturing gradient. Use of other type of polymerase (e.g. proofreading) and/or change of DGGE gradient is presumed necessary as a solution to this problem.

Keywords: Anammox bacteria, 16S rRNA coding gene, genotypic monitoring, industrial wastewater.