Łukasz JURCZYK*, Justyna KOC-JURCZYK*, Paulina RÓŻALSKA

*Zakład Biologicznych Podstaw Rolnictwa i Edukacji Środowiskowej
Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy
ul. M. Ćwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów

Dynamika ilościowa AOB w procesie biologicznego oczyszczania odcieków składowiskowych w warunkach beztlenowych

Składowanie odpadów, nawet na obiektach prawidłowo zaprojektowanych i eksploatowanych może stwarzać wiele zagrożeń dla środowiska. Jednym z najpoważniejszych jest powstawanie w obrębie składowiska odcieków, charakteryzujących się między innymi dużymi stężeniami azotu amonowego oraz znaczną zawartością trudno rozkładalnych związków organicznych. Podstawową metodą unieszkodliwiania odcieków składowiskowych jest ich oczyszczanie w reaktorach biologicznych. U podstaw tego procesu leży biochemiczny rozkład azotu amonowego przez mikroorganizmy wykazujące ekspresję genu monooksygenazy amoniaku, a jednym ze sposobów zwiększenia jego efektywności jest stosowanie różnych typów nośników stwarzających tym mikroorganizmom optymalne warunki życia. Odcieki wykorzystane w badaniach pochodziły ze składowiska odpadów komunalnych w Kozodrzy (woj. podkarpackie). Badania prowadzono w trzech sekwencyjnych reaktorach biologicznych o pojemności 2 l (SBR 1-3), w warunkach beztlenowych, w temperaturze 42°C i przy stałym czasie zatrzymania wynoszącym 6 d. SBR 1 pracował tylko z osadem czynnym zawieszonym, natomiast SBR 2 i 3 zostały wyposażone w wypełnienia z PCV o różnej średnicy porów (odpowiednio 2÷3 oraz 4÷5 mm). W pobranych z reaktorów próbkach osadu badano, za pomocą techniki ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (Q-PCR), zawartość kopii genu *16S rRNA* o sekwencji charakterystycznej dla wszystkich znanych β-proteobakterii mających zdolność do utleniania amoniaku. Porównując w badanych próbkach dynamikę ilości badanego genu, stwierdzono, że wypełnienie zastosowane w SBR 2 powodowało najmniejsze wahania liczebności bakterii w procesie ich adaptacji do warunków technologicznych. Efektywność usuwania azotu amonowego we wszystkich reaktorach miała związek z ilością kopii badanego genu.

Słowa kluczowe: **odcieki składowiskowe, SBR, AOB, *16S rRNA*, Q-PCR**

Wstęp

Składowanie odpadów, nawet na prawidłowo zaprojektowanych i eksploatowanych obiektach, stwarza wiele zagrożeń dla środowiska, do jednego z największych należy zaliczyć powstawanie odcieków składowiskowych. Odcieki składowiskowe można zdefiniować jako ścieki powstające w wyniku przesiąkania wód opadowych przez złoże składowiska. Część wody zostaje wchłonięta przez odpady, pozostała wypełnia przestrzenie na różnych poziomach składowiska w postaci tak zwanej wody zawieszonej lub tworzy odcieki, które zbierają się na dnie składowiska, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla wód gruntowych. Odcieki powstają więc wtedy,

kiedy zawartość wilgoci w złożu składowiska przekracza jego pojemność retencyjną [1]. Odcieki są też najdłużej emitowanym ze składowiska odpadów rodzajem zanieczyszczeń, powstają bowiem przez cały okres eksploatacji składowiska, a także po jego zamknięciu, w okresie rekultywacji [2].

Z punktu widzenia cech fizykochemicznych odcieki są złożoną i zmienną w czasie mieszaniną substancji organicznych, nieorganicznych i zawiesin, charakteryzującą się właściwościami redukcyjnymi i znacznie podwyższonymi parametrami biologicznego i chemicznego zapotrzebowania na tlen, wysokimi stężeniami substancji rozpuszczonych, a przede wszystkim azotu amonowego. Skład odcieków zależy od rodzaju odpadów deponowanych na składowisku, ale jest też odbiciem zmian aktywności mikrobiologicznej składowiska. Największy wpływ na skład odcieków ma wiek składowiska [1, 3].

W zależności od czasu eksploatacji składowiska dzieli się na: młode, znajdujące się w fazie dojrzewania i stabilizacji, oraz ustabilizowane. Procesom biochemicznego rozkładu odpadów towarzyszą zmiany w składzie jakościowym oraz ilościowym odcieków. Dane literaturowe wskazują, że w początkowej fazie eksploatacji składowiska odcieki zawierają produkty typowe dla fermentacji kwaśnej - kwasy lotne oraz substancje organiczne, które stosunkowo łatwo ulegają przemianom biochemicznym w procesach biologicznego oczyszczania. Wraz z upływem czasu zawartość prostych związków organicznych maleje, a w odciekach pojawiają się i następnie dominują związki wielkocząsteczkowe (głównie kwasy humusowe), trudno ulegające biodegradacji. Równocześnie z przemianami biochemicznymi zachodzą procesy adsorpcji, rozpuszczania, rozcieńczania, wymiany jonowej oraz wytrącania, skutkiem czego stężenie substancji organicznych i nieorganicznych zmienia się w czasie [4].

Wraz ze starzeniem się składowiska w odciekach notuje się spadek zawartości substancji organicznych, jednocześnie zmienia się stosunek ilościowy BZT_5 do ChZT, co związane jest z faktem, że w ogólnej puli związków organicznych maleje udział kwasów lotnych i innych małocząsteczkowych związków organicznych [4].

Zawartość azotu amonowego w odciekach waha się w bardzo szerokim zakresie stężeń, od 0 (w początkowej fazie eksploatacji składowiska) do nawet 13 000 mg/l, przy czym stanowi on od 60 do 90% azotu ogólnego [1]. Z badań przeprowadzonych przez Kaczorek i Ledakowicza [5] wynika, że stężenie azotu w odciekach pochodzących ze składowisk leżących na terenie naszego kraju może osiągać wartość 3000 mg/l.

Odpady komunalne i przemysłowe, unieszkodliwiane przez składowanie, mogą zawierać ponadto różnego rodzaju substancje szkodliwe, które w konsekwencji mogą pojawić się w odciekach. Obecność nieorganicznych i organicznych substancji szkodliwych oraz w wielu przypadkach niezidentyfikowanych produktów ich degradacji jest powodem toksyczności odcieków [6, 7].

W celu unieszkodliwienia odcieków stosuje się metody fizykochemiczne, takie jak: procesy membranowe, koagulację czy głębokie utlenianie z użyciem ozonu lub nadtlenku wodoru, rzadziej adsorpcję na węglu aktywnym i metody termiczne, jak zatężanie, destylację czy spalanie [8, 9]. Zastosowanie znajdują również metody

biologiczne, prowadzone zarówno w warunkach tlenowych i/lub beztlenowych. Często też łączy się wyżej wymienione metody.

W przeciwieństwie do ścieków komunalnych odcieki ze składowisk odpadów trudno poddają się oczyszczaniu metodami biologicznymi. Jednym z powodów jest obecność w odciekach dużej ilości związków azotu, a głównie azotu amonowego, przy jednoczesnej niekorzystnej proporcji do węgla organicznego. Pomimo tego, metodę osadu czynnego wykorzystuje się często jako jeden ze sposobów biologicznego oczyszczania odcieków pochodzących ze składowisk odpadów komunalnych. Stosowana jest w celu biochemicznego utleniania związków organicznych oraz usuwania azotu w układzie jedno- lub wielostopniowym i w niektórych przypadkach charakteryzuje się wysoką efektywnością - utlenieniu może ulegać nawet ponad 90% azotu amonowego. Rzadko jednak osad czynny jest jedynym stosowanym sposobem oczyszczania odcieków. W większości przypadków stanowi pierwszy etap oczyszczania, po którym wykorzystuje się różnego rodzaju procesy fizyczne lub chemiczne. Utrudnieniami w procesie osadu czynnego, w przypadku oczyszczania odcieków składowiskowych, jest duża wrażliwość mikroorganizmów na niekorzystne temperatury oraz słabe własności sedymentacyjne osadu, powodujące spadek stężenia biomasy w reaktorach na skutek wynoszenia jej z instalacji [2, 10].

Procesy beztlenowego oczyszczania odcieków są podobne do tych zachodzących wewnątrz składowiska odpadów. Są one wykorzystywane do oczyszczania odcieków głównie z młodych składowisk ze względu na duże ilości związków organicznych podatnych na fermentację (lotne kwasy tłuszczowe, alkohole, aldehydy). Mogą być prowadzone w procesie beztlenowego osadu czynnego w reaktorach UASB oraz złożach z wypełnieniem stałym lub ruchomym. Im wyższa temperatura procesu, tym usuwanie zanieczyszczeń zachodzi szybciej. Procesy beztlenowego oczyszczania odcieków pozwalają na 70÷80% usunięcie związków organicznych [2, 10].

Uważa się, że w warunkach tlenowych utlenianie azotu amonowego do azotanów(III) przeprowadzają głównie bakterie *Nitrosomonas* sp. (I faza nitryfikacji). Następnie azot azotanowy(III) jest utleniany do azotanowego(V) z udziałem *Nitrobacter* sp. lub *Nitrospira* sp. (II faza nitryfikacji). Obecnie coraz większą uwagę przykłada się do procesów usuwaniu azotu amonowego ze ścieków na drodze częściowej nitryfikacji czy utleniania azotu amonowego w warunkach anoksycznych lub kombinacji obu procesów. Wyróżnia się metody: częściowej nitryfikacji oraz SHARON, ANAMMOX, CANON i OLAND [11].

Końcowym produktem procesu SHARON jest w 90% azot azotanowy(III) i 10% azot azotanowy(V), do całkowitego usunięcia azotu ze ścieków jako drugi stopień poleca się metodę ANAMMOX.

Proces ANAMMOX opisali Mulder i współprac. [12], którzy badali beztlenowe utlenianie azotu amonowego w obecności azotu azotanowego(V) w skali laboratoryjnej w beztlenowym reaktorze fluidalnym. Van den Graaf i współprac. [13] oraz Bock i współprac. [14] w późniejszych badaniach dowiedli, że raczej azot azotanowy(III), a nie azotanowy(V) jest preferencyjnie wykorzystywany jako akceptor

elektronów. Obecnie przyjmuje się, że ANAMMOX polega na denitryfikacji azotanów(V) lub (III) z azotem amonowym jako donorem elektronów [11].

Odkrycia przeprowadzone w ostatniej dekadzie wskazują na istnienie wyspecjalizowanych bakterii, takich jak: *Kuenenia stuttgartiensis* czy *Brocadia anammoxidans*, prowadzących proces beztlenowego utleniania amoniaku ANAMMOX. Jak wskazują badania zaprezentowane w [15], również bakterie z grupy AOB (*Ammonia-oxidizing bacteria*, między innymi *Nitrosomonas*) potrafią przeżyć w warunkach anoksycznych i usuwać amoniak w zespole z wymienionymi wyżej wyspecjalizowanymi bakteriami ANAMMOX. Badania przeprowadzone w tej pracy mogą potwierdzać, że w warunkach niedoboru tlenu również bakterie z grupy AOB, czyli mające zdolność utleniania azotu amonowego w warunkach tlenowych, mogą adaptować się do warunków anoksycznych i dalej usuwać amoniak, prawdopodobnie wykorzystując azot azotanowy(III) jako donor tlenu.

Biomasa immobilizowana na nośnikach stałych lub ruchomych znacznie zmienia swoje właściwości, stając się bardziej odporna na czynniki zewnętrzne, działanie substancji toksycznych oraz wymywanie z reaktora. Z tego względu złoża biologiczne często wykorzystywane są do utleniania azotu amonowego występującego w wysokich stężeniach. Bakterie odpowiedzialne za proces nitryfikacji są powszechnie uznawane za wrażliwe na zmiany temperatury, odczynu, obecność substancji toksycznych, a ponadto wolno się rozmnażają. Do wad tej metody zaliczyć należy koszt nośników oraz konieczność utrzymywania wysokiego stężenia tlenu rozpuszczonego w przypadku stosowania złóż fluidalnych [2, 10].

Trudności w izolacji i hodowli bakterii wchodzących w skład osadu czynnego powodują, że w badaniu ich dynamiki ilościowej i składu coraz szersze zastosowanie znajdują szybkie i powtarzalne metody biologii molekularnej. Największym wyzwaniem w ilościowym oznaczaniu tego rodzaju prób są niewielkie ilości organizmów w jednostce objętości i ich złożony, wielogatunkowy skład. Przy obliczaniu ilości tych mikroorganizmów znajdować może zastosowanie technika ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (Q-PCR - *quantitative polymerase chain reaction*), charakteryzującej się wysoką czułością, powtarzalnością i dokładnością pomiarów [16, 17]. Badanie polega na określeniu ilości produktu reakcji w czasie jej trwania (*Real-time PCR*) lub po jej zakończeniu, a następnie przeprowadzeniu porównania pomiędzy próbkami (RQ-PCR - *relative quantification*) lub w odniesieniu do próby kontrolnej (AQ-PCR - *absolute quantification*).

Istnieje kilka podejść do ilościowego oznaczania za pomocą metody PCR liczebności organizmów, a w zasadzie ilości kopii genów charakterystycznych dla badanego gatunku czy grupy organizmów. Do najczęściej wykorzystywanych technik można zaliczyć: MPN-PCR (*most probable number*), cPCR (*competitive* PCR - PCR kompetycyjny, konkurencyjny) czy Real-time PCR. Wybór metody zależy od rodzaju doświadczenia i od tego, czy wymagane jest względne (relatywne) czy absolutne oznaczenie ilościowe. Czynnikiem ograniczającym wybór danej metody może być między innymi znajomość sekwencji nukleotydów badanego fragmentu DNA [17].

Hallier-Soulier i współprac. [18] byli jednymi z pierwszych, którzy zaprezentowali przydatność techniki cPCR (PCR kompetycyjny) do ilościowego oznaczania genów w glebie zanieczyszczonej toluenem. Technika cPCR jest wykorzystywana zarówno do szacowania ilości komórek w różnego rodzaju próbkach środowiskowych, jak na przykład osadach rzecznych [19, 20], jak i badaniu ilości bakterii osadu czynnego w procesach oczyszczania ścieków komunalnych [16]. Metodę tę zastosowali również Wikström i współprac. [21] oraz Phillips i współprac. [22] do ilościowej analizy AOB, opartej na specyficznej amplifikacji genu *16S rDNA*, charakterystycznej dla tej grupy bakterii. Kompetycyjny PCR wykorzystywany był także do określania liczebności bakterii utleniających amoniak na podstawie pomiarów ilości kopii genu *amoA* [23]. Do zalet metody cPCR należy zaliczyć: wysoką precyzję i dokładność przy niedużych nakładach finansowych, a umiejętne kontrolowanie procesu pozwala na dokładne oznaczenie ilościowe - również absolutne. Wadami metody są konieczność obróbki produktów PCR podobnie jak w metodzie MPN oraz możliwość nierównego powinowactwa starterów do sekwencji docelowej i kompetycyjnej [17].

Badanie ilościowe jednej z grup bakterii osadu czynnego opiera się na amplifikacji DNA wyizolowanego ze środowiska, a nie namnożonej w optymalnych warunkach hodowli laboratoryjnych. Dlatego niekiedy konieczne jest zwiększenie czułości metody badawczej, na przykład poprzez zastosowanie nested PCR (PCR „zagnieżdżonego"). Według literatury, ilość AOB w glebie określona za pomocą metody nested cPCR może być 1000 razy wyższa niż obliczona za pomocą metody MPN-PCR [24]. cPCR jest bardzo przydatną techniką, ale przygotowanie odpowiednio skalibrowanej krzywej do precyzyjnego absolutnego określenia liczby bakterii jest trudne, pracochłonne i nie zawsze wykonalne [22].

Chociaż w ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad unieszkodliwianiem odcieków składowiskowych, to opracowanie wysokosprawnych metod ich oczyszczania pozostaje nadal otwartym problemem [10, 25]. Szczególnie istotne wydaje się tu poznanie reakcji organizmów wchodzących w skład osadu czynnego na zastosowane warunki technologiczne oczyszczania odcieków składowiskowych. Z powodu wpływu na tempo wzrostu bakterii utleniających azot amonowy takich czynników, jak: pH, zawartość O_2, temperatura czy obecność substancji o działaniu toksycznym, wczesne wykrycie spadku liczebności populacji może usprawnić kontrolę procesów oczyszczania odcieków oraz zapobiec wymywaniu mikroorganizmów z ciągu technologicznego.

Celem pracy było zbadanie z użyciem techniki ilościowego PCR kompetycyjnego dynamiki liczebności bakterii utleniających amoniak (AOB) w procesie biologicznego oczyszczania odcieków składowiskowych metodą osadu czynnego w zależności od zastosowanych warunków technologicznych (dodanie wypełnienia, warunki beztlenowe, wysoka temperatura).

W pracy nie określano składu gatunkowego mikroflory reaktora ani dynamiki ilościowej poszczególnych gatunków, uwzględniono natomiast sumę wszystkich osobników gatunków posiadających zdolność do rozkładu azotu amonowego na drodze utleniania biochemicznego.

1. Metody badań

1.1. Odcieki składowiskowe

Odcieki wykorzystane w badaniach pochodziły ze składowiska odpadów komunalnych w Kozodrzy (woj. podkarpackie). Składowisko funkcjonuje od 1990 roku i zajmuje obecnie powierzchnię 18,36 ha. Roczna ilość odpadów komunalnych, przyjmowanych do unieszkodliwienia z terenu okolicznych gmin oraz miasta Rzeszowa, wynosi 92 160 Mg/rok. Do badań pobierano odcieki ze zbiornika retencyjnego o pojemności 2295 m^3. Odcieki spływają do niego z 9 zamkniętych kwater o łącznej pojemności 1379,1 tys. m^3 i jednej kwatery otwartej. Odcieki pobrane do badań charakteryzowały się stężeniem azotu amonowego na średnim poziomie 710 mg/l, średnie stężenie związków organicznych wyrażonych jako ChZT wyniosło 8365 mg/l, a BZT_5 - 636 mg/l.

1.2. Stanowisko badawcze

Badania technologiczne nad oczyszczaniem odcieków prowadzono w trzech porcjowych reaktorach typu SBR o pojemności roboczej 2 l. Reaktory pracowały tylko z fazą mieszania (warunki beztlenowe) w temperaturze 42°C. Reaktor SBR 1 pracował tylko z osadem czynnym zawieszonym, zaś SBR 2 i SBR 3 wyposażono w wypełnienie stacjonarne składające się z 4 gąbek PCV o wymiarach: 10 x 3 x 3 cm. Wypełnienie w SBR 2 miało średnicę porów około 2÷3 mm, a w SBR 3 około 4÷5 mm. Czas zatrzymania odcieków w reaktorach wynosił 6 d. Przed doświadczeniem wszystkie reaktory zostały zaszczepione osadem czynnym pochodzącym z miejskiej oczyszczalni ścieków w Łańcucie. Do reaktorów doprowadzano odcieki surowe z dodatkiem wodnego roztworu $NaNO_2$ (proporcja $NH_4^+ : NO_2^- = 1:1$).

1.3. Pobór próbek

Próbki osadu czynnego pobierano przez okres 4 tygodni, co 2 dni, tuż po wymianie odcieków. W celu dokładnego wymieszania zawartości reaktora SBR przed pobraniem próbki obroty mieszadła zwiększano do 500 obr/min. Pobraną próbkę objętości 1,5 ml przenoszono do probówki i wirowano przez 20 minut z siłą 10 000 rcf. Po wirowaniu supernatant wylewano, a osad zawieszano przez wytrząsanie w 1 ml mieszaniny konserwującej (5% SDS, 0,125 M bufor fosforanowo-sodowy) i w tej postaci przechowywano w –20°C do czasu dalszych analiz. Jednocześnie pobierano próby do oznaczenia ilości zawiesiny ogólnej w reaktorach (według metodyki Hermanowicza i współprac. [26]). Po zakończeniu badań określono różnicę masy osadu znajdującego się na wypełnieniach gąbkowych w SBR 2 i 3.

1.4. Izolacja DNA

Izolację DNA przeprowadzano zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Newmana dla bakterii z osadu czynnego [27]. Z próbki przygotowanej w sposób opisany

powyżej pobierano 200 µl zawiesiny, do której dodawano roztworu trawiącego o następującym składzie: 600 µl buforu do trawienia bakterii Proteinazą K (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0), 5 µl Proteinazy K (Roth, 20 000 U/ml), 20 µl Lizozymu (Roth, 8 mg/ml). Próbki inkubowano, intensywnie mieszając przez 60 minut w temperaturze 40°C. Następnie strawione próbki oczyszczano przez odwirowanie (14 000 rcf) kolejno w fenolu, chloroformie i alkoholu izoamylowym (24:1), po czym precypitowano w mieszaninie 500 µl izopropanolu i 40 µl 3 M octanu sodu i płukano w 70% alkoholu etylowym. Otrzymane w ten sposób DNA zawieszano w 30 µl wody wolnej od nukleaz. Ilość DNA w izolacie określano metodą spektrofotometryczną w rozcieńczeniach 1:20 (Shimadzu, UV-1800).

1.5. Konstrukcja kompetytora, reakcja cPCR

W pracy zastosowano metodykę zaproponowaną przez Phillipsa i współprac. [22], zgodnie z którą do reakcji PCR użyto starterów reakcji CTO189f i CTO654r, zaprojektowanych przez Kowalchuka i współprac. [28], oraz βAMOf, zaprojektowanego przez McCaiga i współprac. [29]. Startery te pozwalają na amplifikację fragmentu genu *16S rRNA* charakterystycznego dla β-proteobakterii utleniających azot amonowy. Do skonstruowania kompetytora reakcji użyto konwencjonalnego (o standardowej długości) startera CTO189f i startera CTO654r/INT1 [22] o długości 42 nukleotydów, zawierającego na jednym z końców sekwencję nukleotydów zgodną z sekwencją leżącą wewnątrz projektowanego amplikonu, a na drugim zgodną z sekwencją komplementarną do primera CTO654r. W ten sposób z sekwencji kompetytora usunięto fragment stanowiący około 10% amplikonu, co pozwoliło na odróżnianie kompetytora w rozdziale elektroforetycznym, ale nie spowodowało różnic w efektywności w jednoczesnej amplifikacji obu produktów reakcji. Uzyskany w ten sposób kompetytor był następnie namnożony za pomocą starterów CTO189f i CTO654r.

Obie reakcje PCR (Eppendorf Mastercycler) poprzedzała 5-minutowa predenaturacja w 95°C, po której następowało 25 cykli o następującym profilu termicznym: denaturacja w 94°C przez 40 sekund, przyłączanie starterów w 55°C przez 30 sekund, wydłużanie nici w 72°C przez 2 minuty. Ostatni segment wydłużano w ostatnim cyklu o 5 minut. Reakcje wykonywano w objętości 100 µl z użyciem gotowego zestawu odczynników 2 x PCR Master Mix (A&A Biotechnology, Polska) i dodatkiem po 2,5 µl starterów (10 mM GENOMED, Polska).

Następnie kompetytor został oczyszczony z substratów reakcji za pomocą złoża krzemionkowego (Clean-UP, A&A Biotechnology, Polska) i poddany serii kolejnych rozcieńczeń w następujący sposób: 10 µl kompetytora przenoszono do probówki zawierającej 90 µl wody wolnej od nukleaz i dokładnie mieszano, z tak przygotowanego rozcieńczenia pobierano znowu 10 µl i przenoszono do kolejnej probówki z 90 µl wody, i tak dalej, uzyskując 9 kolejnych, 10-krotnych rozcieńczeń od $1 \cdot 10^{-1}$ do $1 \cdot 10^{-9}$.

Wstępne badania wykazały, że ilość kopii badanego genu w próbach izolowanych z reaktorów była zbyt niska, aby umożliwić jej ocenę ilościową za pomocą

konwencjonalnej reakcji PCR. Dlatego matrycę reakcji wstępnie namnażano, stosując dwuetapowy nested PCR. W pierwszym etapie startery βAMOf i CTO654r pozwalały amplifikować nieco dłuższy fragment DNA, natomiast określenia dynamiki ilościowej kopii genów w poszczególnych próbach następowały w drugim etapie reakcji i wyglądały następująco: do serii 10 probówek reakcyjnych dodawano po 1 µl kolejnych rozcieńczeń kompetytora i po 1 µl takiej samej matrycy DNA, wstępnie namnożonej w pierwszym etapie reakcji. W obu etapach reakcję prowadzono w objętości 20 µl z wykorzystaniem takich samych odczynników. Reakcje PCR miały również taki sam profil termiczny, z tym że ilość cykli w drugim etapie zwiększono do 30. W celu potwierdzenia prawidłowości wykonania i powtarzalności reakcji każda próba została zbadana co najmniej dwukrotnie w obecności odczynnikowej próby kontrolnej.
Po zakończeniu doświadczenia próby z każdego reaktora zostały amplifikowane za pomocą starterów reakcji CTO189f i CTO654r, sekwencjonowane, a uzyskane sekwencje porównane z danymi z Banku Genów (*National Center for Biotechnology Information*) za pomocą algorytmu BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*).

1.6. Rozdział produktów PCR i ocena dynamiki ilościowej AOB

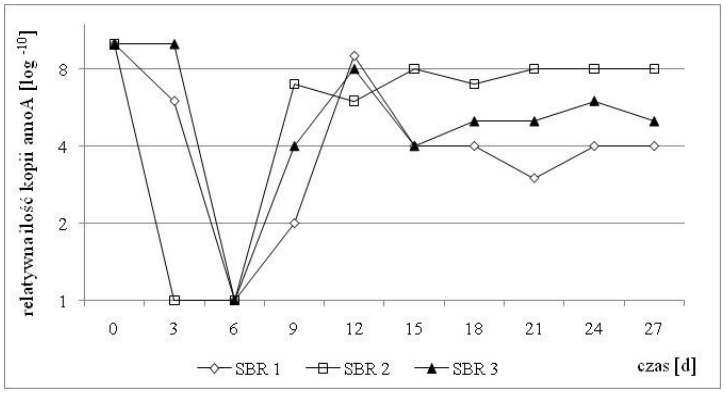
Produkt drugiego etapu nested cPCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym (Roth, Agarose NEEO ultra-quality, 0,5N TBE, pH = 8,0, EtBr) w obecności ekwimolarnej drabiny (100 bp, Roth) jako wzorca masy molekularnej. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 0,5N TBE przez 100 minut przy stałej wartości napięcia 80 V (Bio-Rad).

Wyniki rozdziałów obrazowano w świetle UV (312 nm) i dokumentowano w formie plików graficznych (MicroDOC). Długości amplikonów potwierdzano przy użyciu programu GelAnalyzer2010 [30], natomiast porównania ilości DNA w poszczególnych prążkach dokonywano za pomocą pomiarów densytometrycznych, korzystając z oprogramowania ImageJ 1.38 x [31].

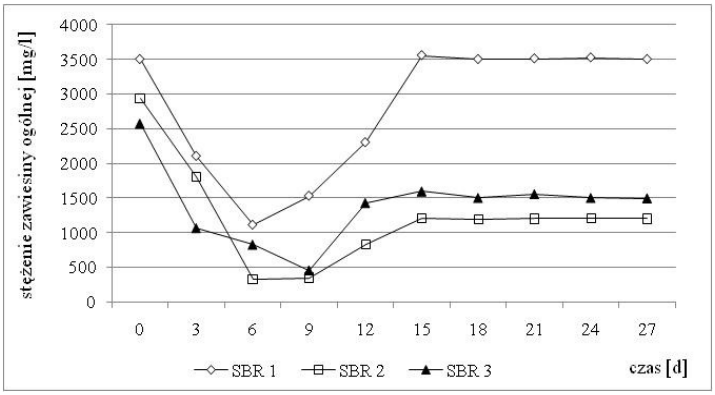
2. Wyniki

Porównanie otrzymanych sekwencji DNA o długości 400 bp z danymi dostępnymi w Banku Genów potwierdziło, że w pracy badano fragment genu *16S rRNA* o wysokiej homologii (97÷99%) z sekwencjami *Nitrosomonas* sp. i innych AOB, izolowanych z instalacji do oczyszczania ścieków; algorytm BLASTn wskazał jako najbliższą sekwencję o numerze FM997820.1 opisaną jako pochodzącą z reaktora częściowej nitryfikacji w systemie z bioreaktorem ANAMMOX.

Zgodnie z zastosowaną metodyką badań, na obrazach uzyskanych z elektroforez poszukiwano miejsc, w których pomiar densytometryczny prążków reprezentujących produkty amplifikacji kompetytora i matrycy wskazywał możliwie zbliżone wartości. Uzyskane w doświadczeniu wyniki amplifikacji genu *16S rRNA* metodą cPCR przedstawiono na rysunku 1. Ilość osadu czynnego w poszczególnych reaktorach w trakcie trwania doświadczenia pokazano na rysunku 2.



Rys. 1. Dynamika ilościowa AOB w trakcie procesu oczyszczania odcieków składowiskowych na podstawie relatywnej analizy ilościowej genu *16S rRNA*



Rys. 2. Stężenie zawiesiny ogólnej w SBR w kolejnych dniach trwania doświadczenia

Z prezentowanych danych wynika, że już po 3 dniach prowadzenia doświadczenia uwidoczniły się różnice w ilości bakterii utleniających amoniak w osadzie czynnym w poszczególnych reaktorach. Najwięcej kopii badanego genu obserwowano w SBR 3, najmniej zaś w SBR 2. Jeżeli porównamy to z całkowitą ilością osadu czynnego, to w SBR 3 osadu było najmniej (około 2500 mg/l), a najwięcej (około 3500 mg/l) w SBR 1. Po 6 dniach od rozpoczęcia doświadczenia we wszystkich reaktorach zaobserwowano gwałtowny spadek ilości kopii *16S rDNA* (poniżej progu wykrywalności w zastosowanej metodyce badań).

We wszystkich reaktorach przez okres pierwszego tygodnia ilość zawiesiny ogólnej sukcesywnie się zmniejszała, przy czym największy spadek odnotowano w SBR 2. W dalszych dniach doświadczenia stwierdzono wzrost ilości kopii *16S rDNA* wraz ze wzrostem stężenia osadu we wszystkich reaktorach. W SBR 2 wzrost ilości kopii badanego genu był najwyższy przy jednoczesnym najniższym przyroście ilości osadu czynnego. Zarówno ilości kopii badanego genu, jak i osadu czynnego ustabilizowała się w 15 dniu doświadczenia. Najwięcej kopii genu stwierdzono w osadzie czynnym pobranym z SBR 2, najmniej z SBR 1. Odwrotną

tendencję można zauważyć w przypadku ilości osadu czynnego, w SBR 2 średnie stężenie zawiesiny ogólnej wyniosło 1200 mg/l, zaś w SBR 1 - 3500 mg/l.

W pracy stwierdzono wyższe stężenie osadu zawieszonego w SBR 1 w porównaniu z osadem zawieszonym w SBR 2 i 3. Przed rozpoczęciem i po zakończeniu badań określono wagę wkładu gąbkowego w reaktorach. W SBR 2 osad czynny wypełniający gąbki ważył 8,312 g, a w SBR 3 - 4,254 g, natomiast ilość kopii badanego genu w SBR 3 była niższa o trzy rzędy wielkości.

3. Dyskusja

W pracy zastosowano metodę relatywnego pomiaru ilości cząsteczek *16S rDNA*, która pozwala na obserwowanie dynamiki ilościowej mikroorganizmów w zależności od warunków technologicznych, natomiast nie pozwala na stwierdzenie dokładnej ilości osobników w jednostce objętości. Aby przeprowadzić tego typu pomiar, należałoby dokonać wstępnej kalibracji metody względem wzorca, który stanowiłaby czysta kultura bakterii zawierających badany gen [16, 22, 23]. Jednak zastosowana w pracy, dla poprawienia czułości, dwuetapowa technika nested PCR znacznie komplikuje proces absolutnej kwantyfikacji AOB. Przed rozpoczęciem doświadczenia wszystkie reaktory zaszczepiono osadem czynnym pochodzącym z miejskiej oczyszczalni ścieków w Łańcucie. Jest to oczyszczalnia, do której trafiają ścieki bytowo-gospodarcze o charakterze znacznie różniącym się od odcieków składowiskowych, dlatego można było się spodziewać, że organizmy wchodzące w skład osadu czynnego musiały przejść okres adaptacji do nowego środowiska. Rzeczywiście w pracy obserwowano znaczny spadek liczebności AOB po 6 dniach, który mógł wynikać z adaptacji do nowych warunków, przebudowy składu gatunkowego czy przemieszczania się mikroorganizmów z toni reaktora do wkładów. Ten proces obserwować można również, analizując całkowitą ilość osadu w reaktorach. Należy jednak pamiętać, że osad czynny składa się nie tylko z bakterii AOB, ale również innych mikroorganizmów, a także glonów, pierwotniaków i wreszcie nieożywionej części materii organicznej i mineralnej.

Ganigué i współprac. [32] badali za pomocą analizy sekwencji DNA populacje AOB w stanowiącym pierwszy stopień przed reaktorem ANAMMOX reaktorze SBR, oczyszczającym odcieki o wysokim stężeniu azotu amonowego (średnio 3772 mg/l). Badania prowadzono w temperaturze 36°C przy czasie zatrzymania odcieków w reaktorze wynoszącym od 3 do 6 d. Wszystkie wykryte przez autorów bakterie były podobne do *Nitrosomonas*, przy czym w momencie założenia doświadczenia (zaszczepienia reaktora) stwierdzili pięć jednostek taksonomicznych (OTU), podczas gdy po 450 dniach tylko jedna z nich zdominowała środowisko.

Jak wskazują badania Limpiyakorn i współprac. [33], przeprowadzone w skali technicznej, oprócz bakterii mających zdolność do biochemicznego utleniania azotu amonowego (AOB), w oczyszczalniach ścieków komunalnych można też stwierdzić obecność prowadzących ten sam proces archeonów (AOA). Analizując sekwencję genu *amoA*, stwierdzili oni we wszystkich badanych obiektach dominację nieznanych *Nitrosomonas* spp. oraz *N. europea* i *N. oligotropha*, jednak w reak-

torach, do których dopływały ścieki z wyższą kontentacją azotu amonowego, mogą dominować nieznane gatunki *Nitrosomonas* spp. Znacząca liczba AOA występowała we wszystkich badanych obiektach, co sugeruje ich ważną rolę w oczyszczaniu ścieków, jednak w obiektach o podwyższonej zawartości azotu amonowego zawartość genów *amoA* charakterystycznych dla AOB była wyższa o ponad cztery rzędy wielkości.

Cho i współprac. [34] badali populacje mikroorganizmów w przepływowym reaktorze beztlenowym ANAMMOX, wyposażonym w granulowane złoże. Analiza sekwencji genu *16S rRNA* wykazała, że oprócz gatunków prowadzących proces beztlenowego utleniania amoniaku (przede wszystkim *Brocadia anammoxidans*), w reaktorze można też wykryć proteobakterie. Szczególnie podkreśla się rolę *Nitrosomonas* utrwalającego warunki anoksyczne przez usuwanie tlenu rozpuszczonego i dostarczającego azotynów bakteriom anammox.

Zdaniem Poth i Focht [35], przy stężeniu tlenu poniżej 0,8 mg O_2/l *Nitrosomonas* wykorzystuje azot azotanowy(III) jako akceptor elektronów do produkcji NO, N_2O oraz N_2. Dzięki temu straty azotu amonowego mogą wynosić nawet 15%. Zart i Bock [36] podają, że po wprowadzeniu tlenku azotu bakterie utleniające azot amonowy mogą go przekształcać w gazowy N_2 ze znacznie większą (około 60%) wydajnością, a także azotany(III) w proporcji odpowiadającej około 40% utlenianego azotu amonowego.

Jako wypełnienie reaktorów mogą być stosowane: węgiel aktywny, piasek, plastik lub gąbki PCV. Organizmy rosną na powierzchni nośników i wewnątrz ich porowatej struktury [37]. Do tej pory uwaga badaczy koncentrowała się tylko na zwiększeniu szybkości nitryfikacji [38]. Jednoczesne zastosowanie nośników biomasy pozwala na lepszy przyrost biomasy i wydłużenie czasu przebywania mikroorganizmów osadu czynnego w reaktorze. Karapinar i Kargi [39] zastosowali gąbki jako wypełnienie w reaktorze FBBR. Dzięki temu koncentracja biomasy w reaktorze wyniosła 55 g/l. Pozwoliło to na utrzymanie warunków beztlenowo-tlenowych w reaktorze. Stosunek biomasy zawieszonej do biomasy na nośniku wyniósł 42%. Wprowadzenie wypełnienia z gąbki pozwoliło na zwiększenie ilości biomasy o 90%.

Należy zaznaczyć, że wyniki przedstawione w niniejszej pracy opierały się tylko na badaniu osadu zawieszonego w toni reaktora, natomiast nie pobierano prób z gąbek dlatego, że reaktory pracowały w warunkach atoksycznych, a próby manipulacji wkładami powodowałyby ich ekspozycję na warunki tlenowe. Obecnie opracowywana jest technika bezinwazyjnego pobierania wkładów z zachowaniem warunków anoksycznych.

Wnioski

Opisane w pracy badania dynamiki liczebności bakterii utleniających amoniak w odciekach składowiskowych umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

1. Porównując dynamikę liczebności AOB na podstawie ilości kopii genu *16S rRNA* w próbkach pobranych z reaktorów, można stwierdzić, że najmniejsze wahania liczby bakterii obserwowano w SBR 2. W warunkach doświadczenia ten rodzaj wypełnienia rektora okazał się najbardziej optymalny dla zastosowanych warunków technologicznych.
2. Opisane w pracy wyniki opierały się na badaniu próbek z osadu czynnego zawieszonego. Z powodów technicznych nie pobierano próbek z gąbkowych wypełnień reaktorów. Dlatego wyniki mogą nie odzwierciedlać w pełni obrazu zmian dynamiki ilościowej AOB w procesie biologicznego oczyszczania odcieków. W związku z tym należy opracować system ilościowego poboru próbek z wypełnień z zachowaniem beztlenowych warunków w reaktorach i bez znaczącego ubytku wypełnień.

Podziękowanie

Badania finansowane z grantu MNiSW nr N N523 481434: Wpływ warunków technologicznych na efektywność oczyszczania odcieków składowiskowych z uwzględnieniem dynamiki populacji wybranych gatunków AOB i NOB w osadzie czynnym.

Literatura

[1] El-Fadel M., Bou-Zeid E., Chahine W., Alayli B., Temporal variation of leachate quality from pre-sorted and baled municipal solid waste with high organic and moisture content, Waste Management 2002, 22, 3, 269-282.
[2] Surmacz-Górska J., Miksch K., Kita M., Możliwości podczyszczania odcieków z wysypisk metodami biologicznymi, Archiwum Ochrony Środowiska 2000, 26, 3, 43-54.
[3] Kang K-H., Shin H.S., Park H., Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications, Water Research 2002, 36, 16, 4023-4032.
[4] Kulikowska D., Charakterystyka oraz metody usuwania zanieczyszczeń organicznych z odcieków pochodzących z ustabilizowanych składowisk odpadów komunalnych, Ecological Chemistry and Engineering 2009, 16, 3, 389-402.
[5] Kaczorek K., Ledakowicz S., Deamonifikacja odcieków z wysypiska na złożu torfowym, Inżynieria i Aparatura Chemiczna 2002, 3, 65-66.
[6] Żygadło M., Gospodarka odpadami komunalnymi, Wyd. Politechniki Świętokrzyskiej, Kielce 1998.
[7] Clément B., Persoone G., Janssen C., Le Dû-Delepierre A., Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. I. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests, Chemosphere 1997, 35, 11, 2783-2796.
[8] Chou S., Huang C., Effect of Fe^{2+} on catalytic oxidation in a fluidized bed reactor, Chemosphere 1999, 39, 12, 1997-2006.
[9] Zhang H., Choi H.J., Huang Ch-P., Optimization of Fenton process for the treatment of landfill leachate, Journal of Hazardous Materials 2005, 125, 1-3, 166-174.
[10] Janosz-Rajczyk M. (red.), Badania wybranych procesów oczyszczania ścieków, Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2008.
[11] Khin T., Annachharte A.P., Novel microbial nitrogen removal processes, Biotechnology Advances 2004, 22, 7, 519-532.

[12] Mulder A., van den Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G., Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, FEMS Microbiology Ecology 1995, 16, 3, 177-183.
[13] van de Graaf A.A., Mulder A., de Bruijn P., Jetten M.S.M., Robertson L.A., Kuenen J.G., Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process, Applied and Environment Microbiology 1995, 61, 4, 1246-1251.
[14] Bock E., Schmidt I., Stüven R., Zart D., Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor, Archives of Microbiology 1995, 163, 1, 16-20.
[15] Lek Noophan P., Sripiboon S., Damrongsri M., Munakata-Marr J., Anaerobic ammonium oxidation by Nitrosomonas spp. and anammox bacteria in a sequencing batch reactor, Journal of Environmental Management 2009, 90, 2, 967-72.
[16] Dionisi H.M., Layton A.C., Harms G., Gregory I.R., Robinson K.G., Sayler G.S., Quantification of Nitrosomonas oligotropha-like ammonia-oxidizing bacteria and Nitrospira ssp. From full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR, Applied and Environmental Microbiology 2002, 68, 1, 245-253.
[17] Sharma S., Radl V., Hai B., Kloos K., Mrkonjic F., Engel M., Schauss K., Schloter M., Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR, Journal of Microbiological Methods 2007, 68, 445-452.
[18] Hallier-Soulier S., Ducrocq V., Mazure N., Trauffaut N., Detection and quantification of degradative genes in soils contaminated by toluene, FEMS Microbiology Ecology 1996, 20, 2, 121-133.
[19] Cébron A., Garnier J., Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France), Water Research 2005, 39, 20, 4979-4992
[20] Berthe T., Garnier J., Petit F., Quantification of nitrifying bacteria of the genus Nitrobacter in an aquatic system (Seine estuary, France), Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 1999, 322, 6, 517-526.
[21] Wikström P., Wiklund A., Andersson A.C., Forsmann M., DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types, Journal of Biotechnology 1996, 52, 2, 107-120.
[22] Phillips C.J., Paul E.A., Prosser J.I., Quantitative analysis of ammonia oxidising bacteria using competitive PCR, FEMS Microbiology Ecology 2000, 32, 2, 167-175.
[23] Bjerrum L., Kjær T., Birger Ramsing N., Enumerating ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples using competitive PCR, Journal of Microbiological Methods 2002, 51, 2, 227-239.
[24] Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W., The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, Applied and Environmental Microbiology 1997, 63, 4704-4712.
[25] Kulikowska D., Oczyszczanie odcieków ze składowisk odpadów komunalnych z wykorzystaniem metod osadu czynnego oraz adsorpcji na węglu aktywnym, Czasopismo Techniczne, seria Środowisko, Wyd. Politechniki Krakowskiej, Kraków 2007, 2, 145-155.
[26] Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Koziorowski B., Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków, Arkady, Warszawa 1999.
[27] Klimiuk E., Pokój T., Ciesielski S., Polihydroksykwasy syntezowane przez mikroorganizmy - stan obecny i kierunki rozwoju, [w:] Trendy w biotechnologii środowiskowej, red. I. Wojnowska-Baryła, Wyd. UWM w Olsztynie, Olsztyn 2008.
[28] Kowalchuk G.A., Stephen J.R., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M., Woldendorp J.W., Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturating gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments, Applied and Environmental Microbiology 1997, 63, 1489-1497.
[29] McCaig A.E., Prosser J.I., Embley T.M., Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia-oxidisers, FEMS Microbiology Letters 1994, 120, 3, 363-368.
[30] Lázár I. Jr., Lázár I, GelAnalyzer 2010, www.gelanalyzer.com

[31] Bourne R., Fundamentals of Digital Imaging in Medicine, Springer-Verlag, London 2010.
[32] Ganigué R., Gabarró J., Sànchez-Melsió A., Ruscalleda M., López H., Vila X., Colprim J., Balaguer M.D., Long-term operation of a partial nitritation pilot plant treating leachate with extremely high ammonium concentration prior to an anammox process, Bioresource Technology 2009, 100, 23, 5624-5632.
[33] Limpiyakorn T., Sonthiphand P., Rongsayamanont C., Polprasert C., Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants, Bioresource Technology 2011, 102, 4, 3694-3701.
[34] Cho S., Takahashi Y., Fujii N., Yamada Y., Satoh H., Okabe S., Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor, Chemosphere 2010, 78, 9, 1129-1135.
[35] Poth M., Focht D.D., N-kinetic analysis of N_2O production by Nitrosomonas eutropha: an examination of nitrifier denitrification, Applied and Environment Microbiology 1985, 52.
[36] Zart D., Bock E., High rate of aerobic nitrification and denitrification by Nitrosomonas eutropha grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO_2 or NO, Archives of Microbiology 1998, 169, 4, 282-286.
[37] Kargi F., Eyiisleyen S., Batch biological treatment of synthetic wastewater in a fluidized bed containing wire mesh sponge particles, Enzyme and Microbial Technology 1995, 17, 2, 119--123.
[38] Arnz P., Esterl S., Nerger C., Delgado A., Wilderer P.A., Simultaneous loading and draining as a means to enhance efficacy of sequencing biofilm batch reactors, Water Research 2000, 34, 5, 1763-1766.
[39] Karapinar I., Kargi F., Effect of particle number density on wastewater treatment performance of a fluidized-bed bioreactor, Enzyme and Microbial Technology 1996, 19, 2, 140-144.

Quantitative Dynamics of AOB in the Biological Treatment of Landfill Leachate in Anaerobic Conditions

Waste disposal, even on properly designed and operated landfills may be environmentally hazardous. One of the most onerous aspects of landfilling is formation of the leachate, characterized by high concentrations of ammonia nitrogen and organic compounds. One of the most common method applied for nitrogen neutralization in landfill leachate is biological treatment based on biochemical decomposition of an ammonia by micro-organisms expressing gene of ammonia monooxygenase. The way to increasing efficiency of this process is the application of different types of fillings creating optimal conditions for microorganisms life.

Leachate used in the study came from a large scale municipal waste landfill in Kozodrza (podkarpackie province, Poland). The research was conducted in three sequential batch reactors of 2 l (SBR 1-3), in anaerobic conditions, high temperature (42°C) and a constant HRT of 6 d. SBR 1 ran with suspended activated sludge, while the SBR 2 and 3 were equipped with PVC filling of different pore diameters (respectively 2÷3 and 4÷5 mm). The samples of sludge were examined for number of *16S rDNA* copies characterized for ammonia oxidizing β-proteobacteria. Comparing the quantitative dynamics of *16S rRNA* gene in samples it was found that fillings used in the SBR 2 resulted in slightest hesitation of the number of bacteria during the process of their adaptation to technological conditions. The ammonia nitrogen removal efficiency in all reactors was related to the number of *16S rRNA* gene copies.

Keywords: landfill leachate, SBR, AOB, *16S rRNA*, Q-PCR