

## STRESZCZENIE

**Wstęp:** Celem nowoczesnej prewencji zjawiska pęcznienia osadu czynnego jest działanie na etapie pojawiania się pierwszych oznak zachwiania równowagi ekosystemu, niedostrzegalnych w standardowo stosowanych metodach analizy oraz wczesne podjęcie odpowiednich czynności minimalizujących ewentualne straty w wydajności oczyszczalni ścieków. Mikrobiom osadu buduje szereg drobnoustrojów, spośród których ok. 80% stanowią bakterie. Wykazują one ogromne zróżnicowanie gatunkowe charakterystyczne dla biocenozy danej oczyszczalni ścieków oraz pory roku. Ze względu na morfologiczne podobieństwo bakterii nitkowatych należących do odmiennych taksonów oraz zależność morfologii od warunków środowiska niemożliwym jest ustalenie uniwersalnych sposobów ich detekcji. Metody molekularne dają możliwość analizy eliminującej morfologiczne podobieństwo bakterii przy ich genetycznej odmienności oraz wykrycia takich zmian w biocenozie osadu, które znacząco wpływają na stan i funkcjonowanie osadu. Dzięki obecności fragmentów konserwatywnych w strukturze genu 16S rRNA możliwa jest jednoczesna amplifikacja większości bakterii w próbce, a rejony hiperzmienne umożliwiają ich różnicowanie na różnych poziomach taksonomicznych.

**Cel pracy:** Wczesne wykrywanie zmian genetycznych w biocenozach bakteryjnych osadu czynnego w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe. Porównanie wzorów restrykcyjnych społeczności bakteryjnych pochodzących z różnych oczyszczalni ścieków oraz pobieranych na przestrzeni roku. Wskazanie genetycznych markerów osadu prawidłowego oraz spęczniałego, których występowanie we wzorach prążkowych prób potencjalnie może być wykorzystane w monitorowaniu pracy osadu czynnego. Opracowanie i optymalizacja testu hybrydyzacji dot-blot z fluorescencyjną detekcją sondy wykorzystującą kropki kwantowe, QDs. Szacowanie liczebności bakterii typu *Chloroflexi* w próbach osadu czynnego i powiązanie jej zmian z określonymi zdolnościami sedymentacyjnymi osadu oraz skutecznością oczyszczania ścieków.

**Materiały i metody:** Badania wykonano na 102 próbach osadu czynnego pochodzących z sześciu oczyszczalni ścieków komunalnych z terenu województwa śląskiego. Próby osadu czynnego, ścieki dopływające do oczyszczalni i oczyszczone zostały poddane także analizie fizykochemicznej. W technice ARDRA (ang. *Amplified rDNA Restriction Analysis*) z użyciem uniwersalnych primerów 27F/1494R i gDNA bakterii z osadu czynnego zamplifikowano fragment 16S rRNA, który poddano analizie restrykcyjnej (*AluI*, *BsuRI*, *DdeI*, *HhaI*, *HinfI*, *MboI*, *MspI*). Na bazie wzorów prążkowych oraz wyników klasteryzacji metodą Warda oceniono zmienność genetyczną poszczególnych osadów. Określono także bioróżnorodność genetyczną osadów w oparciu o indeks Shannona-Wienera ( $H'$ ). W zoptymalizowanym teście hybrydyzacji gDNA zastosowano sondę *chflex* specyficzną wobec bakterii typu *Chloroflexi*, skonstruowaną na bazie analizy *in silico* zsekwencjonowanych fragmentów genu 16S rRNA. Biotynyłowana sonda podlegała detekcji kolorymetrycznej (fosfataza alkaliczna) oraz fluorescencyjnej (kropki kwantowe), celem wyboru korzystniejszej metody.

**Wyniki:** Osad czynny każdej z oczyszczalni ścieków charakteryzował się określonym stałym profilem produktów ARDRA, jak również wykazywał sezonową obecność specyficznych prążków. *DdeI* i *MspI* były najbardziej użytecznymi endonukleazami umożliwiającymi detekcję zmian genetycznych badanych biocenoz. Ich zastosowanie skutkowało uzyskaniem *fingerprints* o najwyższym stopniu zróżnicowania oraz obecnością prążków powiązanych z określonymi właściwościami sedymentacyjnymi czy jakością oczyszczonych ścieków, które mogą posłużyć jako markery molekularne dobrej lub nieprawidłowej kondycji osadu. Najintensywniejsza genetyczna transformacja osadu czynnego każdorazowo miała miejsce na przełomie zimy i wiosny (od końca lutego do początku kwietnia), a zmiany te skutkowały występowaniem określonych prążków. W przypadku różnych oczyszczalni obserwowano jednak występowanie sezonowo specyficznych prążków o zróżnicowanej długości, co wskazywało, że czas zachodzenia intensywnych zmian genetycznych był bardzo zbliżony lecz ich kierunek był już specyficzny dla danego obiektu.

Najniższą bioróżnorodność genetyczną (wyznaczoną na bazie współczynnika Shannona-Wienera) wykazywały próby zimowe, podczas gdy najwyższą osady wiosenne lub pobierane latem i wczesną jesienią (zależnie od rodzaju endonukleazy użytej w analizie). Zwiększenie bogactwa gatunkowego osadu czynnego sprzyjało poprawie jego właściwości sedymentacyjnych.

Test hybrydyzacji dot-blot z sondą chflex wykazał zmienną liczebność bakterii z typu *Chloroflexi* na przestrzeni roku. Najniższą ich liczebność odnotowywano w miesiącach zimowych, na przedwiośniu sygnał chflex podwyższał się, a wartości maksymalne osiągnęły wiosną (oczyszczalnie z Jaworzna, Łazisk Górnych i „Zagórze” w Sosnowcu) lub wczesną jesienią (obie katowickie oczyszczalnie oraz „Radocha” w Sosnowcu). Wartości sygnału hybrydyzacyjnego dla prób zimowych wykazywały statystycznie istotne różnice ( $p < 0,01$ ) względem sygnału dla prób pobieranych w pozostałych porach roku. Próby osadu czynnego na przestrzeni kolejnych lat cechowały się porównywalnym poziomem liczebności bakterii typu *Chloroflexi*, lecz wartości sygnału hybrydyzacyjnego dla poszczególnych prób w danych sezonach wykazywały różnice i odbiegały od średniej wartości dla danej grupy. Wykazano istotne statystyczne różnice ( $p < 0,05$ ) pomiędzy poziomem liczebności bakterii typu *Chloroflexi* (wyrażonym wartością sygnału hybrydyzacyjnego) dla osadów o wartościach indeksu wyższych niż 150 ml/g a pozostałymi próbami o korzystniejszych właściwościach sedymentacyjnych.

Porównanie zastosowanych technik detekcji biotynylowanej sondy chflex (kolorymetrycznej i fluorescencyjnej, opartej na kropkach kwantowych, QDs) w teście hybrydyzacji dot-blot wykazało użyteczność obu z uwagi na niski współczynnik zmienności sygnału hybrydyzacyjnego chflex (1,74%). Niższy próg detekcji sygnału ( $1,69 \times 10^8$  kopii sekwencji komplementarnej względem fragmentu genu 16S rRNA bakterii z rodzaju *Chloroflexi*), krótszy czas przeprowadzenia analizy oraz łatwiejsza i bezpieczniejsza dla operatora obserwacja i digitalizacja mebran cechowała technikę opartą na zastosowaniu konigatu z fosfatazą alkaliczną (metoda kolorymetryczna). Znacznie szerszy zakres liniowości sygnału hybrydyzacyjnego cechował jednak detekcję fluorescencyjną ( $1,69 \times 10^9$ - $2,03 \times 10^{11}$  kopii sekwencji specyficznej dla bakterii typu *Chloroflexi* względem przedziału  $0$ - $1,69 \times 10^{10}$  dla detekcji kolorymetrycznej), co umożliwiało jednoczesną ocenę poziomu liczebności bakterii typu *Chloroflexi* w próbach pochodzących z różnych pór roku czy oczyszczalni ścieków.

**Wnioski:** Biocenoza osadu czynnego wykazywała sezonowe zmiany w składzie gatunkowym, które obserwowano jako zróżnicowane zestawy fragmentów DNA dla poszczególnych prób, uzyskanych po hydrolizie enzymatycznej amplimerów 16S rRNA z zastosowaniem endonukleaz restrykcyjnych. Użycie poszczególnych enzymów w odniesieniu do tych samych prób skutkowało odmienną złożonością *fingerprintsów*. *DdeI* i *MspI* były najbardziej użytecznymi endonukleazami umożliwiającymi detekcję zmian genetycznych badanych biocenoz. Ich zastosowanie skutkowało uzyskaniem *fingerprintsów*o najwyższym stopniu zróżnicowania oraz obecnością prążków powiązanych z określonymi właściwościami sedymentacyjnymi czy jakością oczyszczonych ścieków. Na bazie analizy wzorów prążkowych ARDRA oraz parametrów fizykochemicznych osadu czynnego i ścieków można było wskazać genetyczne markery (fragmenty restrykcyjne o określonej długości) powiązane z właściwościami sedymentacyjnymi osadu czynnego bądź ze skutecznością oczyszczania ścieków, które mogą być pomocne przy ocenie kondycji osadu i przebiegu procesu oczyszczania. Markery te były jednak specyficzne względem biocenozy bakteryjnej danej oczyszczalni ścieków.

Oszacowana testem hybrydyzacji gDNA dot-blot z sondą chflex liczebność bakterii typu *Chloroflexi* wykazywała zróżnicowanie w poszczególnych porach roku, jak również i pomiędzy oczyszczalniami ścieków. Najmniej obficie bakterie te występowały w miesiącach zimowych, a najintensywniej rozwijały się wiosną bądź wczesną jesienią, zależnie od oczyszczalni ścieków, z której pochodził analizowany osad. W przypadku wybranych oczyszczalni zmiana poziomu sygnału hybrydyzacyjnego chflex skorelowana była z określonymi zdolnościami sedymentacyjnymi osadu czynnego oraz skutecznością oczyszczania ścieków.

**Słowa kluczowe:** osad czynny, pęcznienie osadu czynnego, 16S rRNA, rybotypowanie, hybrydyzacja DNA, kropki kwantowe

## ABSTRACT

**Introduction:** The aim of current activated sludge bulking prevention is action at the stage of the first symptoms of ecosystem imbalance and taking appropriate steps to minimize decrease in sewage treatment efficiency. About 80% of activated sludge microbiome consists of bacteria, which reveal high diversity, specific for the biocenosis of a given wastewater treatment plant and the season of the year. Due to morphological similarity of filamentous bacteria and ability to alter their morphology in response to changes in environmental conditions, it is impossible to detect them with the use of a universal identification method. Misleading and difficult identification by microscopic techniques directs research towards molecular methods, the use of which will enable detection of genetic changes in biocenosis significantly affecting the structure and functioning of the sludge. A reliable detection test can be based on 16S rRNA gene sequences, which are present in all bacteria and composed of regions with higher and lower evolutionary conservation. It gives the opportunity to infer phylogenetic relationships and to identify unknown bacteria.

**Aims of the study:** Early detection of bacterial biocenosis genetic changes occurring in response to variable environmental conditions. Comparison of genetic fingerprints for samples collected from distinct wastewater treatment plants as well as different seasons. Indication of genetic markers for bulking and normal sludge, which could be used in monitoring of activated sludge condition. Development and optimization of the dot-blot hybridization test with fluorescent detection of probe, using quantum dots, QDs. Estimation of the quantity of *Chloroflexi* phylum in activated sludge and linking its changes with specific sedimentation properties of the sludge and effluent treatment efficiency.

**Materials and methods:** Genomic DNA from 102 samples of activated sludge assembled from 6 municipal wastewater treatment plants (WWTPs) located in Silesia served as templates in amplification of 16S rRNA gene fragment with the use of 27F/1492R primers as the first step of ARDRA analysis (*Amplified rDNA Restriction Analysis*). Amplimers underwent hydrolysis by seven endonucleases, separately (*AluI*, *BsuRI*, *DdeI*, *HluI*, *HinfI*, *MboI*, *MspI*), and following electrophoregram analysis. For each collected sample, initial comprehensive physicochemical analysis has been conducted as well. The genetic variability of activated sludge samples was assessed based on the band patterns and the results of clustering using the Ward method. Genetic biodiversity was also determined based on the Shannon-Wiener index ( $H'$ ). The optimized gDNA hybridization test consisted of application of *chflex* probe specific for phylum *Chloroflexi*. This probe had been constructed based on *in silico* analysis of the 16S rRNA gene sequences. The biotinylated probe was subjected to colorimetric detection (alkaline phosphatase) and fluorescent (quantum dots) for choosing the more favourable method.

**Results:** Activated sludge from each WWTP has characterized its appropriate restriction products profile, but there were also many bands common with all WWTPs. DNA fragments characteristic only for bulking sludge and normal sludge were also noticed, what gives possibility of bulking symptoms molecular detection. *DdeI* and *MspI* were the most suitable for detection genetic changes of activated sludge biocenosis. Their use resulted in obtaining most diverse fingerprints and the presence of bands associated with specific sludge properties or the quality of treated wastewater. They could be used as molecular markers for sludge condition assessment. The most intensive genetic transformation of activated sludge has always taken place at the turn of winter and spring (from the end of February to the beginning of April), and these changes were seen as occurring of specific bands in fingerprints. However, seasonally specific bands of different lengths were observed for various treatment plants, which indicated that the time of intensive genetic changes was very similar, but their direction was already specific for the given object. Winter samples showed the lowest genetic biodiversity (determined on the basis of the Shannon-Wiener index), while the highest - activated sludge collected during spring or in summer and early autumn

(depending on the type of endonuclease used in the analysis). Increasing the richness of the activated sludge species contributed to the improvement of its sedimentation properties.

Variable quantity of *Chloroflexi* type bacteria were observed throughout the year. The lowest numbers were estimated during the winter season, in the early spring the *chflex* signal increased, and the maximum values were achieved in spring (WWTPs in Jaworzno, Łaziska Górne and "Zagórze" in Sosnowiec) or early autumn (both WWTPs in Katowice and "Radocha" in Sosnowiec). The *chflex* hybridization signal values for winter sludge showed statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) relative to the signal for samples collected in other seasons. Activated sludge over the next years are characterized by a comparable level of *Chloroflexi* bacteria, but the hybridization signal values for individual samples in given seasons showed differences and deviated from the average value for a given group. Statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) between the number of *Chloroflexi* bacteria (expressed in hybridization signal value) for samples with Sludge Volume Index (SVI) values higher than 150 mL/g relative to others presenting better sedimentation properties were shown.

Both techniques of the biotinylated *chflex* probe detection (colorimetric and fluorescent, based on quantum dots, QDs) in the dot-blot hybridization test were shown to be useful due to the low coefficient of variation of the *chflex* hybridization signal (1.74%). Lower signal detection threshold ( $1.69 \times 10^8$  copies of a sequence complementary to a fragment of the 16S rRNA gene of bacteria of the *Chloroflexi* phylum), shorter analysis time, as well as easier and safer for the operator observation and digitization of the blots characterized the technique based on the use of an alkaline phosphatase conjugate (colorimetric method). However, much wider range of linearity of the hybridization signal described the fluorescence detection ( $1.69 \times 10^9$ - $2.023 \times 10^{11}$  copies of the sequence specific for *Chloroflexi* bacteria compared to the range of  $0$ - $1.69 \times 10^{10}$  for colorimetric detection), which enabled the simultaneous quantification of *Chloroflexi* type bacteria in samples from different seasons or WWTPs.

**Conclusions:** Variations in the number and length of restriction products point at the permanent transformation of sludge community. The rearrangement is most intensive at the turn of winter and spring, what is expressed by different fingerprints obtained during ARDRA analysis. However, not all genetic changes of biocenoses relate to bulking process. *DdeI* and *MspI* were the most useful endonucleases enabling detection of biocenoses genetic changes. Their application resulted in obtaining fingerprints with the highest degree of differentiation and the presence of bands associated with specific sedimentation properties or the quality of treated wastewater. Based on ARDRA results and the physicochemical parameters of the activated sludge and sewage, it was possible to identify genetic markers (specific restriction fragment) associated with the sedimentation properties of the activated sludge or with efficiency of wastewater treatment. They could be helpful in assessing the condition of the sludge. However, these markers were specific to bacterial biocenosis of a given wastewater treatment plant.

The number of *Chloroflexi* bacteria showed seasonal variation as well as the level was varied between WWTPs. These bacteria were the least abundant in the winter samples, and they increased most intensively in spring or early autumn, depending on samples origin. For some wastewater treatment plants, the changes in the *chflex* hybridization signal level correlated with SVI values and effluent treatment efficiency.

**Keywords:** activated sludge, bulking, 16S rRNA, ribotyping, DNA hybridization, quantum dots