

Beata Kończak^{1*}, Jagna Karcz², Korneliusz Miksch¹¹Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, Gliwice²Pracownia Mikroskopii Skaningowej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice

Wpłynęło w maju 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Polimery zewnątrzkomórkowe. 2.1. Charakterystyka EPS z wykorzystaniem nowoczesnych technik mikroskopowych. 2.2. Analiza składu białek zewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem techniki SDS-PAGE. 3. Charakterystyka granul. 3.1. Charakterystyka kanałów i porów z wykorzystaniem techniki CLSM. 3.2. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. 3.3. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem techniki PCR-DGGE. 4. Podsumowanie

New microscopic and molecular biology techniques in the evaluation of granular biomass

Abstract: The aerobic granular activated sludge process is a promising technology for compact wastewater treatment plants. This system is superior to conventional activated sludge processes in terms of high biomass retention, high conversion capacity, less biomass production, excellent settleability and resistance to inhibitory and toxic compounds. The majority of research on granular sludge has focused on optimization of engineering aspects related to reactor operation with little emphasis on fundamental microbiology. The combination of physico-chemical characteristics of granular sludge and the new microbiological methods may provide conceptual information benefiting start-up procedures for full-scale granular-sludge reactors. This article presents a short review of microbiological fingerprinting techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), SDS-PAGE or fluorescence in situ hybridization (FISH) and other techniques such as transmission and scanning electron microscopy (TEM, SEM) or confocal microscopy (CLSM) to give additional information about the structure and bacterial composition of granules.

1. Introduction. 2. Extracellular polymeric substances. 2.1. Characterization of EPS by new microscopic techniques. 2.2. Analysis of exoprotein composition by SDS-PAGE technique. 3. Characterization of granules. 3.1. Characterization of canals and pores by CLSM. 3.2. Distribution of micro-population in granule by fluorescent microscopy. 3.3. Distribution of micro-population in granule by PCR-DGGE technique. 4. Summary

Słowa kluczowe: tlenowe granule, polimery zewnątrzkomórkowe, SDS-PAGE, FISH, PCR

Key words: aerobic granule, extracellular polymeric substances, SDS-PAGE, FISH, PCR

1. Wprowadzenie

Najpopularniejszym i stosowanym na szeroką skalę sposobem oczyszczania ścieków jest metoda osadu czynnego. Osad czynny stanowi skupisko różnych grup bakterii zoogloalnych, bakterii nitkowatych, grzybów, glonów i pierwotniaków. Mikroorganizmy te tworzą małe kłaczkę o średnicy 50–300 µm [7, 8, 34]. W reaktorach, w których osad czynny poddany jest działaniu dużych sił hydrodynamicznych, małe agregaty łączą się ze sobą i tworzą granule o sferycznym lub elipsoidalnym kształcie, a ich średnica wynosi wtedy od 0,2 mm do 20 mm. Pierwsze wzmianki o beztlenowych granulach formujących się w reaktorze UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) pojawiły się w latach 80-tych [20]. Obecnie trwają badania nad technologią granulowanego osadu w warunkach tlenowych [17, 21, 37]. Granule o kompaktowej, gęstej strukturze, dużej bioróżnorod-

ności oraz o doskonałych właściwościach sedymentacyjnych wykorzystuje się do oczyszczania ścieków zarówno o niskim, jak i wysokim obciążeniu ładunkiem zanieczyszczeń, usuwania związków azotu i fosforu, a także toksycznych substancji.

Zaletą procesów wykorzystujących granulowany osad czynny jest przede wszystkim zmniejszenie wymiarów reaktorów, w których prowadzone są procesy. Dodatkowo zwiększa się czas retencji i stopień koncentracji biomasy w układzie, a poprzez to następuje poprawa efektów oczyszczania ścieków. Granule osadu czynnego formują się w obecności różnorodnych substratów, takich jak np. glukoza, skrobia, octan sodu, etanol, metanol, fenol, fruktoza, maltoza oraz przy zapewnieniu odpowiednich warunków, takich jak wysokie stężenie tlenu rozpuszczonego, krótki czas sedymentacji, warunki „uczta/głód”, działanie sił hydrodynamicznych, wysokie obciążenie ładunkiem zanieczyszczeń [24]. Dokładny

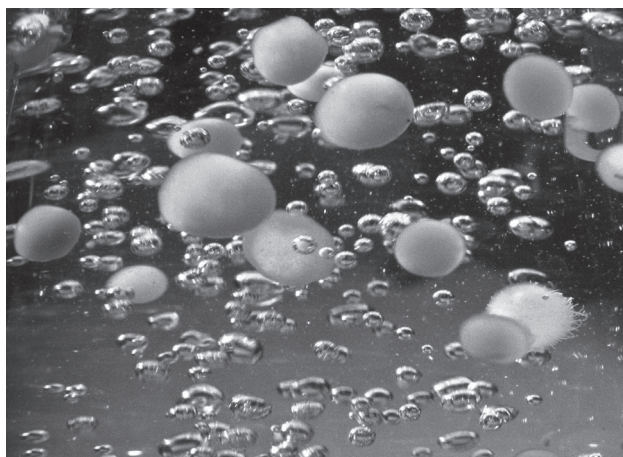
* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 2, 44-100 Gliwice; tel.: (032) 237 26 94; e-mail: beata.konczak@polsl.pl

mechanizm granulacji osadu nie został jeszcze poznany i wymaga dalszych badań, tak aby z sukcesem udało się pozyskać granule w pełnowymiarowych reaktorach. W piśmiennictwie odnajdujemy wiele informacji na temat właściwości fizykochemicznych granul, oceny skuteczności usuwania związków węgla, azotu i fosforu. Jednakże, aby móc dokładnie zdefiniować mechanizm formowania granul, konieczne jest poznanie interakcji pomiędzy grupami mikroorganizmów egzystującymi w granuli, poznanie mechanizmu ich adaptacji do życia w warunkach stresowych oraz opisanie relacji pomiędzy strukturą granul a kompozycją ścieków, warunkami pracy reaktora czy jego konfiguracją. Uformowanie granul osadu o zwartej, jednorodnej strukturze, które będą zachowywały długo swoją stabilność, niezależnie od obciążenia reaktora ładunkiem zanieczyszczeń biogenych czy obecności substancji toksycznych w dopływających ściekach, stanowi wyzwanie dla badaczy.

W ciągu ostatnich 10 lat badania skupione były na ocenie populacji mikroorganizmów występujących w granuli, a także dystrybucji polimerów zewnątrzkomórkowych, kanałów i porów w strukturach granul. Oceny mikrostruktury dokonuje się z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik mikroskopowych, takich jak mikroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* (FISH – fluorescent *in situ* hybridization), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM – transmission electron microscopy), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM – scanning electron microscopy), mikroskopia konfokalna (CLSM – confocal laser scanning microscopy), a także nowoczesnych technik biologii molekularnej, takich jak technika PCR-DGGE, analiza białek z wykorzystaniem techniki SDS-PAGE [1, 12, 13, 22, 32]. W artykule zgromadzono najważniejsze informacje dotyczące budowy granul tlenowych w mikro skali. Zebranie i usystematyzowanie wiedzy na temat struktury granul w odniesieniu do warunków, w jakich zostają uformowane jest niezwykle praktyczną wskazówką dla przyszłych badaczy. Wskazuje, w jakim kierunku powinny być prowadzone dalsze badania, pozwala też lepiej zrozumieć istotę i mechanizm procesu formowania granul.

2. Charakterystyka polimerów zewnątrzkomórkowych

Polimery zewnątrzkomórkowe – EPS (Extracellular Polymeric Substances) są to substancje wydzielane przez mikroorganizmy, produkowane podczas lizy komórki bądź adsorbowane z pożywki i akumulowane na powierzchni komórki, do których zaliczamy różnorodne związki organiczne, takie jak egzopolisacharydy (PS), egzoproteiny (PN), DNA, kwasy humusowe, kwasy uronowe itp. Odgrywają one bardzo ważną rolę w procesie granulacji [35].



Rys 1. Tlenowe granule osadu czynnego. (Fot. B. Kończak)

Wydzielanie polimerów zewnątrzkomórkowych jest powszechnie spotykane w przyrodzie. Dla większości mikroorganizmów jest strategią życiową. I tak na przykład bakterie płytki nazębnej intensywnie produkują polimery zewnątrzkomórkowe i tworzą warstwę biofilmu, która pomaga im przyczepić się do powierzchni zęba, długo na niej utrzymać, a dodatkowo zapewnia im ochronę przed siłami mechanicznymi.

Granule są bardzo dynamicznym i aktywnym układem, poddanym silnemu oddziaływaniu sił hydrodynamicznych (rys. 1). Szansę przetrwania mają tylko mikroorganizmy o silnych właściwościach adhezyjnych i mających zdolność wydzielania polimerów zewnątrzkomórkowych [23, 33]. Macierz EPS pokrywająca powierzchnię granul stanowi materiał, do którego przyczepiają się cząstki, komórki bądź małe agregaty komórek, a zarazem pomaga w utrzymywaniu integralności struktur granul. Polimery zewnątrzkomórkowe tworzą kapsułki, które otaczają i zamykają skupiska komórek w granuli osadu. Mogą one też pokrywać ciała orzęsek, bądź też formować macierz wokół kolonii bakterii.

Dzięki otoczce utworzonej z EPS możliwe jest koegzystowanie koło siebie różnych typów mikroorganizmów, nawet, gdy jedno z nich produkuje substancje toksyczne dla innych. I tak na przykład, w środowisku naturalnym kolonie bakterii *Acinetobacter* sp. uniemożliwiają rozwój bakterii *Bacillus sphaericus*, natomiast w granuli obserwuje się wzrost tychże populacji w niewielkiej odległości od siebie. Jest to możliwe dzięki produkcji EPS, które tworzą ochronną przestrzeń dla każdej z kolonii mikroorganizmów i efektywnie adsorbują substancje toksyczne [2].

2.1. Wizualizacja i ocena struktury EPS za pomocą nowoczesnych technik mikroskopowych

Wizualizowanie i ocena struktury EPS za pomocą konwencjonalnego mikroskopu świetlnego jest praktycznie niemożliwe. Stąd też w ostatnich latach coraz

więcej uwagi poświęca się technikom mikroskopii elektronowej oraz konfokalnej.

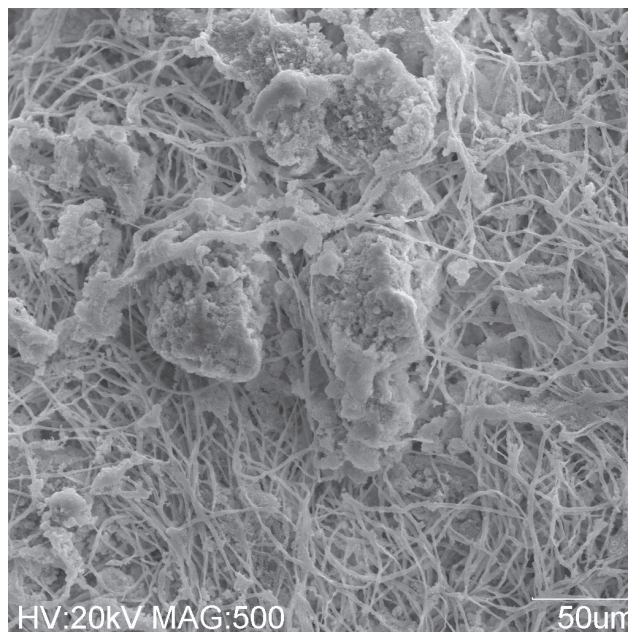
W mikroskopie elektronowym światło widzialne zastąpione jest przez wiązkę elektronów, dzięki czemu można badać strukturę polimerów zewnątrzkomórkowych już na poziomie atomowym. W praktyce wykorzystuje się trzy rodzaje mikroskopów:

- TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy,
- SEM – skaningowy mikroskop elektronowy,
- ESEM – środowiskowy skaningowy mikroskop elektronowy.

Mikroskopia elektronowa z uwagi na wysoką próżnię panującą w komorze mikroskopu wymaga specjalnego przygotowania preparatu. W mikroskopie transmisyjnym typowa procedura obejmuje: utrwalanie, odwadnianie, nasycenie obiektu żywicą syntetyczną i jej polimeryzację, pocięcie bloku żywicy na ultracienkie skrawki (poniżej $0,1\ \mu\text{m}$) oraz barwienie skrawków solami metali ciężkich. Technika ta umożliwia szczegółowe obserwacje na poziomie makrocząsteczkowym elementu struktury obiektu biologicznego, np. komórki bakterii, różniące się powinowactwem do jonów metali ciężkich, a uzyskany obraz tych struktur jest „płaski”, dwuwymiarowy [18].

W przeciwieństwie do TEM preparaty biologiczne badane w mikroskopie elektronowym typu SEM mogą być różnej grubości, a wiązka elektronów skanując powierzchnię analizowanego preparatu uwalnia z niej sygnały elektronowe, które następnie po przetworzeniu dają trójwymiarowy obraz próbki. Ponadto preparaty oprócz utrwalania i odwadniania muszą być wysuszone, w przeciwnym razie umieszczone w próżni mogą stać się źródłem par i spowodować uszkodzenie mikroskopu. Suszenie odbywa się poprzez technikę liofilizacji bądź technikę suszenia w punkcie krytycznym, która pozwala wysuszyć materiał biologiczny bez jego deformacji. Niestety próbki przed suszeniem muszą zostać utrwalone w glutaraldehydzie, który może powodować zmianę struktury EPS i być źródłem niepożądanych artefaktów. Aby tego uniknąć stosuje się stabilizację glikokaliksu poprzez użycie przeciwciała, czy lecytyny, a także barwienie EPS za pomocą barwników zawierających czerwień rutenu, dzięki czemu można wizualizować materiał fibrylarny leżący pomiędzy komórkami [30, 36]. Natomiast nowoczesny mikroskop elektronowy ESEM może pracować przy wyższym ciśnieniu (sięgającym ciśnienia pary nasyconej wody w temp. 20°C), w obecności gazu w komorze obserwacyjnej, dzięki czemu możliwe jest badanie materiałów mokrych i oleistych. Preparaty biologiczne wizualizowane za pomocą ESEM nie wymagają uprzedniego przygotowania próbek ani napyłania ich cząsteczkami złota [39].

Nowe techniki badawcze, takie jak SEM czy TEM, pozwoliły nie tylko na stwierdzenie, iż w obrębie granuli występują różnorodne typy morfologiczne bak-



Rys. 2. Różnorodność form fibrylarnych EPS.
SEM (Fot. J. Karcz)

terii (pałeczki lub ziarenkowce), ale także na określenie dystansu pomiędzy nimi. Okazało się, iż w każdym agregacie utworzonym przez odmienne populacje bakteryjne ten dystans jest inny. W agregatach o gęsto upakowanych komórkach, ilość EPS jest mniejsza niż w agregatach utworzonych z luźno rozrzuconych komórek [19]. Ponadto udało się stwierdzić, iż w centralnej części granuli, znajdują się gęsto upakowane komórki bakteryjne i polimery zewnątrzkomórkowe, natomiast w warstwach zewnętrznych ilość komórek, jak i polimerów zewnątrzkomórkowych jest mniejsza, co z kolei ułatwia dyfuzję oraz transport masy i tlenu rozpuszczonego do głębszych warstw [27, 34].

Le m e r i e i wsp. [19], zwracają uwagę, iż kształt komórek bakteryjnych w centralnej części granuli jest nieregularny, co sugeruje, iż są to martwe komórki. Włókna utworzone z EPS prezentują różnorodność kształtów, deseni, które uwidaczniają się podczas obserwacji za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego, a wynikają z różnorodnej chemicznej kompozycji EPS (rys. 2).

Nowy pogląd na temat polimerów zewnątrzkomórkowych przyniosła technika mikroskopii konfokalnej CLSM (confocal laser scanning microscopy), stanowiąca odmianę mikroskopii świetlnej, charakteryzującej się dużą rozdzielczością i kontrastem. Dzięki tej technice udało się zidentyfikować i określić dystrybucję międzykomórkowych EPS. M c S w a i n i wsp. [23] podają, iż kompozycja i stężenie EPS zmienia się wraz z głębokością warstwy. W technice CLSM świeże, uwodnione granule wybarwiają się stosując barwniki zawierające odpowiedni fluorochrom, który wiąże się z reaktywnymi grupami. Do najpopularniejszych zaliczamy:

- Fluoresceina (FITC) (488 nm/500–550 nm)* – barwnik reagujący z grupami aminowymi, służący do wybarwienia wszystkich białek i aminocukrów [3];
- Konkanawalina A (conA) (561/570–590 nm)* – służy do wybarwienia α -mannopiranozy i α -glukopiranozy (polisachrydy) [25];
- Biały kalkofluor (CW) (347/450 nm)* – wybarwia ściany komórkowe bakterii i grzybów [15];
- Grupa barwników SYTO – wybarwienie kwasów nukleinowych oraz znakowanie żywych i martwych komórek, dzięki wykorzystaniu różnicy w przepuszczalności błon komórkowych; najczęściej stosuje się SYTO63 (633/650–700 nm)* i Syto Blue (458/460–480 nm)* [3];
- Czerwień Nilu (514/625–700 nm)* – wybarwienie lipidów [14].

Badania techniką mikroskopii konfokalnej wykazały, iż zewnętrzne warstwy granul utworzone są przede wszystkim z żywych komórek, „sklejonych” ze sobą za pomocą α - i β -D-glukopiranozy (polisacharydy) i chronione są warstwą lipidów. Natomiast białka rozproszone są w całej objętości, przy czym ich największa ilość znajduje się w centrum granuli [1, 9, 23]. Chen i wsp. [9] i Adav i wsp. [1], zwracają uwagę no to, iż centrum granuli utworzone jest przede wszystkim z martwych komórek, zatem obecne tam białka, to najprawdopodobniej polimery wewnątrzkomórkowe, uwolnione w wyniku lizy komórek. W centrum granuli penetracja substratu i tlenu jest utrudniona, uwolnione białka mogą więc stanowić źródło substancji odżywczych dla żywych i aktywnych mikroorganizmów z tej strefy.

2.2. Analiza składu białek zewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem techniki SDS-PAGE

Jak wspomniano powyżej, białka są istotnym komponentem granul, dla tego wielu badaczy podejmuje się prób analizy jakościowej białek współtworzących macierz EPS. W tym celu wykorzystuje się najczęściej technikę SDS-PAGE. Jest to jedna z metod elektroforezy polegająca na rozdzielaniu białek w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu (SDS). SDS jest związkami denaturującym i oplaszczającym białko. W wyniku jego działania wszystkie białka nabierają charakteru liniowego, posiadają ładunek ujemny i mogą swobodnie migrować w żelu, przy czym szybkość ich migracji zależy od masy cząsteczkowej białka. Po wybarwieniu żelu, uzyskane prążki porównuje się ze wzorcem, dzięki czemu można wyznaczyć masę cząsteczkową analizowanych białek [26]. Badacze podają, iż egzoproteiny występujące w macierzy EPS mają masę cząsteczkową rzędu 31–97,4 kDa. W wyniku analizy profilu białek w żelu, Feng i wsp. [12] stwierdzili, iż

ilość białek wzrasta wraz z procesem granulacji, często też pojawiają się nowe prążki, które świadczą o tym, iż mikroorganizmy syntetyzują nowe białka podczas łączenia się w agregaty. Istnieje także korelacja pomiędzy ilością zewnątrzkomórkowych białek a hydrofobowością komórek. Stwierdzono, iż wraz z procesem granulacji rośnie ilość wydzielanych białek, wzrasta hydrofobowość, maleje natomiast ładunek powierzchniowy.

3. Charakterystyka granul

3.2. Struktura granul

Tlenowe granule charakteryzuje heterogenna budowa, a każda granula składa się z kilku małych agregatów ułożonych radialnie bądź w postaci koncentrycznych warstw. W większych granulach obserwuje się obecność mikrogranul w obrębie jednej, dużej granuli [11, 23, 31].

Warstwowa i heterogenna budowa granuli jest wynikiem ograniczonej dyfuzji substratów i tlenu do wnętrza granuli. Środowisko chemiczne w granuli często zmienia się diametralnie wraz z głębokością. Substancje biogenne występujące w cieczy otaczającej są konsumowane przez mikroorganizmy z warstw zewnętrznych i ich stężenie maleje wraz z głębokością. Z drugiej strony wzrasta stężenie produktów metabolicznych, które akumulowane są we wnętrzu granuli. Zatem, ograniczona dyfuzja wywołuje poziomy bądź odwrotny gradient substancji i generuje zmienność mikroorganizmów w granuli, które dostosowują się do lokalnych warunków. Najlepszym tego przykładem jest ograniczona dyfuzja tlenu. Tlen konsumowany jest szybko w powierzchniowych warstwach granuli (do 100 μ m głębokości) przez mikroorganizmy wykazujące tlenowy metabolizm i utleniające azot amonowy do azotynów. Natomiast w głębszych warstwach powstają warunki odpowiednie do rozwoju, mikroorganizmów utleniających azotyny do azotanów [4, 10]. W centrum granuli, gdzie dyfuzja tlenu jest ograniczona, azotany zredukowane są do wolnego azotu.

Agregaty bakterii utleniających azot amonowy są wydłużone radialnie, co związane jest z krokową dyfuzją tlenu do wnętrza granuli, a także z odwrotnym gradientem azotu amonowego uwalnianego z głębokich warstw utworzonych z martwych komórek. Radialne wydłużanie agregatów jest też strategią przeżyciową, ponieważ posiadają one wtedy wysoki stosunek powierzchni do wysokości, co znacznie poprawia transfer substratu. Grubość warstwy aktywnej w dużej mierze zależy od koncentracji substancji biogennej w cieczy oraz aktywności metabolicznej mikroorganizmów. Kiedy występuje nadmiar substancji odżywczych, penetrują w głąb i warstwa aktywna jest wtedy cieńsza. Natomiast, gdy substancji odżywczych jest mniej, przeciwnie są one szybko zużywane i wtedy warstwa aktywnych mikroorganizmów jest relatywnie grubsza.

* (eksytacja/emisja)

Tabela I

Charakterystyka poszczególnych warstw granuli [1, 16, 23, 24, 32, 33]

Warstwa	Średnia głębokość warstwy od powierzchni granuli i jej grubość	Rola w granuli, informacje dodatkowe
Warstwa utworzona z agregatów bakterii utleniających azot amonowy	70 μm (głębokość), 20 μm (grubość)	Najaktywniejsza warstwa, której grubość zależy od ilości tlenu i stopnia jego dyfuzji.
Fakultatywne bakterie beztlenowe	Koncentracja wzrasta, aż osiąga maksymalną wartość na głębokości 450 μm i aż do 850 μm utrzymuje stałą wartość	Przeprowadzają procesy tlenowego i beztlenowego utleniania zanieczyszczeń.
Obligatoryjne bakterie beztlenowe (<i>Bacteroides sp.</i>)	850 μm (głębokość), 150 μm (grubość)	Odpowiedzialne za beztlenowe procesy rozkładu zanieczyszczeń.
Białka	Rozproszone w całej objętości granuli	Są źródłem substancji zapasowych dla mikroorganizmów z głębszych warstw.
Polisacharydy	Występują w całej objętości, przy czym największe stężenie polisacharydów występuje tuż przy powierzchni	Stanowią szkielet granuli. Mogą utrudniać dyfuzję substratu w głąb granuli.
Kora utworzona z martwych komórek w centrum granuli	Głębokość 1000 μm . Grubość zależy od średnicy granuli	Dostarczają monomerów i wolnego azotu do warstw zewnętrznych.

W każdej granuli wyróżnić możemy dwie strefy: korę oraz obrzeże. Luźna warstwa zewnętrzna utworzona jest w głównej mierze przez bakterie, orzęski osiadłe i grzyby. Ta część granuli jest najbardziej dynamicznym i aktywnym układem poddanym silnemu oddziaływaniu sił hydrodynamicznych. W granulach o kompaktowej i zwartej strukturze, w powierzchniowych warstwach obserwuje się tylko grzyby i orzęski. Kora utworzona jest przez gęsto upakowane komórki bakteryjne i polimery zewnątrzkomórkowe [27, 34].

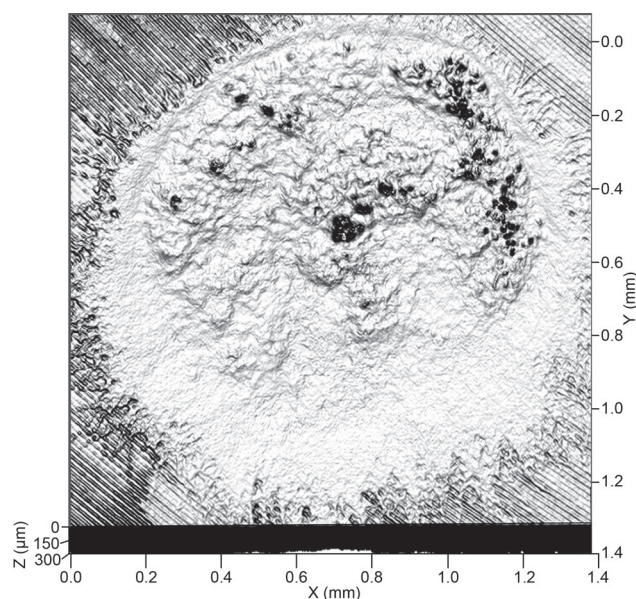
3.1. Wizualizacja kanałów i porów z wykorzystaniem techniki CLSM

Kanały i pory obserwowano w granulach kulturowanych na pożywce z dodatkiem octanu sodu [38]. Tworzą one w granuli sieć, która uczestniczy w transporcie substratów i metabolitów. L e m a i r e i wsp. [19] podają, iż w dużych granulach występuje duży por, połączony systemem kanalików z warstwami zewnętrznymi (rys. 3). Ponadto informują, iż duże granule o zbitiej strukturze z czasem rozpadają się i tworzą się z nich nowe granule.

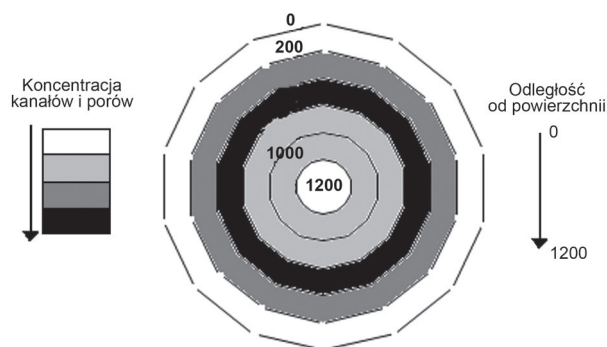
Kanały często wypełnione są polimerami zewnątrzkomórkowymi, a transport w nich przypomina transport wód podziemnych, które cyrkulują wolnymi przestrzeniami i porami występującymi w glebie. W tym typie kanałów nie występują mikro-agregaty, ze względu na stały przepływ cieczy w kanałach, który uniemożliwia adhezję i powoduje wymywanie cząstek. W sytuacji, gdy kanały nie są wypełnione polimerami zewnątrzkomórkowymi, transport przypomina ruch wód śródładowych, który nie jest prawie niczym ograniczony. Ten typ kanałów najczęściej ulokowany jest pomiędzy dwoma agregatami o kształcie przypominającym „kalafiorową różyczkę”.

Z h e n g i wsp. [38] badali techniką mikroskopii konfokalnej dystrybucję kanałów i porów o średnicy większej niż 0,1 μm z użyciem TetraSpec Fluorescent Microsphere Standards (Molecular Probes, OR, USA). Wykazali oni pozytywną relację pomiędzy aktywnością granul a obecnością porów. Wykazali też, iż ilość porów maleje wraz ze wzrostem średnicy granul. Najprawdopodobniej jest to wynikiem zablokowania porów przez polimery zewnątrzkomórkowe. Mniejsza ilość wolnych porów wpływa na ograniczony transport substancji biogennych do wnętrza, a to z kolei wpływa na mniejszą aktywność mikroorganizmów tej strefy.

Jak podają I v a n o w i wsp. [16] grubość warstwy porów koreluje ze średnicą granuli. Jako przykład podają,



Rys. 3. Dystrybucja kanałów i porów w tlenowej granuli. CLSM (ultraskrawek o grubości 300 μm). (Fot. B. Kończak)



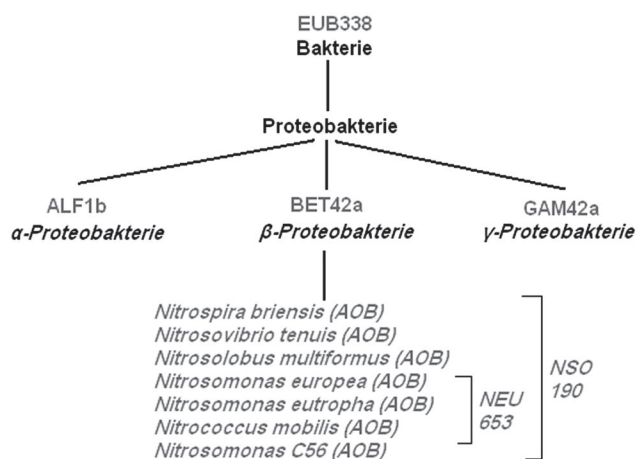
Rys. 4. Rozkład kanałów i porów w granuli o średnicy 1200 µm

iz w granuli o średnicy 1000 µm, grubość warstwy porów sięga 350 µm. Natomiast w granuli o średnicy 550 µm, grubość ta wynosi 250 µm. W granuli, której średnica wynosi 1200 µm rozkład porów i kanałów prezentuje się tak jak przedstawia to rys. 4.

Pory i kanały penetrują granule aż do głębokości 900 µm. Największa ich koncentracja występuje w obszarze 300–500 µm od powierzchni granuli. Zaznaczają także, iż w przypadku dużych granul nie obserwuje się penetracji cząstek o średnicy większej niż 0,1 µm do centralnych warstw granuli.

3.2. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

Dystrybucję żywych i martwych populacji w granuli bada się z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych SYTO63 i BacLight Live-Dead Staining Kit. Zarówno w centrum, jak i na powierzchni obserwuje się komórki zamknięte w macierzy utworzonej z EPS. Żywe komórki występujące w powierzchniowych warstwach mają gładką powierzchnię i kolisty kształt, natomiast martwe komórki występujące w centrum charakteryzuje nieregularny kształt [19]. Podczas oceny składu populacji granulowanego osadu często wykorzystuje się mikroskopię fluorescencyjną i cytogenetyczną technikę



Rys. 5. Sondy używane w badaniach granulowanego osadu czynnego

hybrydyzacji *in situ* służącą do wykrywania w badanym materiale genetycznym określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnych sond DNA.

Dzięki mikroskopii fluorescencyjnej można określić dystrybucję poszczególnych grup mikroorganizmów w granuli. W badaniu tym wykorzystuje się podstawowe sondy, takie jak ALF1b, BET42a, GAM42a, które pozwalają na określenie rozmieszczenia w granuli mikroorganizmów należących do klas: Alfa, Beta i Gamma proteobakterii. Sondy te używa się w połączeniu z EUB338I. Jak podają F i g u e r o a i wsp. [13] większość bakterii, współtworzących mikro-populacje w granuli należy do klasy β-proteobakterie. Pozostałe należą do klasy γ- i większość z nich to mikroorganizmy nitkowate. Ze względu na to, iż granule osadu czynnego mogą być wykorzystane do oczyszczania ścieków ze związków azotu, bardzo często wykonuje się badania, mające na celu określenie dystrybucji bakterii nityfikacyjnych w granuli. W tym celu najczęściej używamy sond NEU653 oraz NSO190. Badania F i g u e r o a i wsp. [13] wykazały dominację bakterii heterotroficznych w granuli i tylko niewielki udział bakterii nityfikacyjnych z rodzaju *Nitrosomonas* (sonda NEU653).

Podobne wyniki badań zaprezentowała A r r o j o i wsp. [5], którzy podają, iż większość bakterii należy do bakterii amonifikacyjnych. Populacje bakterii nityfikacyjnych występowały rzadziej i przede wszystkim były to bakterie z rodzaju *Nitrospira* i *Nitrobacter*.

Badania z wykorzystaniem techniki FISH wciąż wymagają ustalenia jednoznacznej procedury. Jak do tej pory nie udało się ustalić optymalnego czasu inkubacji prób z sondami, z reguły wynosił on od 5 do 30 min. Ze względu na ograniczoną dyfuzję substratu, czas inkubacji powinien być dobrany zgodnie ze średnicą granul [9, 23].

3.2. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem techniki PCR-DGGE

Badania populacji współtworzących granule z wykorzystaniem tradycyjnych metod posiewowych są nieużyteczne ze względu na wolne tempo wzrostu, zwłaszcza bakterii nityfikacyjnych. Rozwiązanie tych problemów przyniosła technika PCR-DGGE. Technika PCR polega na amplifikacji badanej sekwencji DNA przy użyciu pary oligonukleotydowych starterów, z których każdy jest komplementarny do jednego końca sekwencji docelowej DNA. Startery te są wydłużane w kierunku przeciwnym, za pomocą termostabilnej polimerazy DNA, w cyklu, który obejmuje trzy podstawowe etapy:

- denaturacja dwuniciowej matrycy – 90–95°C,
- wiązanie starterów do jednoniciowej matrycy 50–65°C,
- synteza nici komplementarnej 68–72°C.

Wizualizacji produktów PCR dokonuje się poprzez rozdzielanie elektroforetyczne z wykorzystaniem m.in. elek-

troforezy w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE). Cząsteczki DNA umieszczone w żelu migrują w polu elektrycznym od ujemnie do dodatnie naładowanej elektrody, a ich szybkość zależy od wielkości cząsteczki. Następnie prążki wybarwia się bromkiem etydyny i stają się one widoczne po naświetleniu światłem UV [26].

Technikę PCR-DGGE wykorzystuje się między innymi w celu określenia populacji dominujących w tlenowych granulach w zależności od warunków prowadzenia procesu [28, 29]. Wykonuje się też analizy ilości i bioróżnorodności populacji bakterii z grupy Alfa, Beta proteobakterii, a także bakterii utleniających azot amonowy (AOB) czy bakterii nityfikacyjnych podczas rozruchu i normalnej pracy reaktorów biologicznych z klasycznym osadem czynnym oraz granulowaną biomasą [32]. Badania Baek i in. [6] wykazały, iż technika PCR-DGEE może być wykorzystana w monitoringu populacji bakterii utleniających azot amonowy w oczyszczalniach ścieków.

4. Podsumowanie

W ostatniej dekadzie wiele pionierskich badań poświęconych jest formowaniu tlenowych granul. Głównym zainteresowaniem cieszą się badania charakteryzujące fizykochemiczne właściwości granul, takie jak rozmiar, hydrofobowość, ładunek powierzchniowy, gęstość, morfologia. Pomimo, iż na całym świecie wzrasta bardzo szybko liczba publikacji skupiających się wokół tematu granulowanego osadu czynnego, wciąż nieznanymi jest wiele aspektów związanych z formowaniem granul. Dalsze badania powinny dać odpowiedź na wiele nurtujących pytań, takich jak: skąd wynika utrata stabilności granul i jak ją poprawić, jaki jest skład mikropopulacji współtworzących granule, jakie znaczenie mają polimery zewnątrzkomórkowe, a zwłaszcza międzykomórkowe, czy występuje zmienność ilości i kompozycji EPS w trakcie formowania granul. Odpowiedzi na te pytania należy szukać w oparciu o fundamentalne badania mikrobiologiczne. Połączenie fizykochemicznych metod z nowoczesnymi technikami mikroskopii (SEM, TEM, ESEM) i biologii molekularnej (FISH, PCR-DGGE, SDS-PAGE) pozwoli na uzyskanie pełnego obrazu na temat charakterystyki granul i może być źródłem niezbędnych informacji do projektowania reaktorów w pełnej skali, a następnie do ich rozruchu.

Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr N N523 453936)

Piśmiennictwo

1. Adav S.S., Lee D.-J., Tay J.-H.: Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Wat. Res.* **42**, 1644–1650 (2008)

2. Adav S.S., Lee D.-L., Lai J.H.: Aerobic granules with inhibitory strains and role of extracellular polymeric substances. *J. Hazardous Materials*, **174**, 24–428 (2010)
3. Adav S.S., Lin J., Yang Z., Whiteley Ch.G., Lee D.J., Peng X.F., Zhang Z.P.: Stereological assessment of extracellular polymeric substances, exo-enzymes, and specific bacterial strains in bioaggregates using fluorescence experiments. *Biotechnology Advances*, **28**, 255–280 (2010)
4. Ahn J., Daidau T., Tsenuda S., Hirata A.: Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Wat. Res.* **36**, 403–412 (2002)
5. Arrojo B.: Advanced systems for biological treatment of high nitrogen-loaded wastewater, Praca doktorska, Uniwersytet Santiago de Compostela, 2007, s. 16–20
6. Baek K., Park C., Oh H.M., Yoon B.D., Kim H.S.: Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge treating different types of wastewater. *J. Microbiol Biotechnol.* **20**, 1128–1133 (2010)
7. Burdman S., Jurkevitch E., Diaz M., Gil-Serrano A., Okon Y.: Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 259–264 (2000)
8. Burdamn S., Okon Y., Jurkevitch E.: Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**, 91–110 (2000)
9. Chen M.Y., Lee D.J., Tay J.H.: Distributions of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Granules. *Appl. Microbiol. Biot.* **73**, 1463–1469 (2007)
10. De Beer D., Stoodley P., Roe F., Lewadowski Z.: Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1131–1138 (1994)
11. Felipe M.O., Juan L., Ramón M., Flor C.L., Jorge G.: Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Bioresource Technol.* **94**, 43–48 (2004)
12. Feng X., Zhuc N., Chen J.: Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 551–557 (2007)
13. Figueroa, M., Alonso J., Campos, J.L., Méndez Pampín R.J., Mosquera A.: Identificación de microorganismos implicados en la eliminación de nitrógeno en sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante técnicas de biología molecular. *Tecnología del Agua*, **317**, 44–53 (2010)
14. Fowler S.D., Greenspan P.: Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with Oil Red. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 833–836 (1985)
15. Hoch H.C., Galvani C.D., Szarowski D.H., Turner J.N.: Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*, **97**, 580–588 (2005)
16. Ivanov V., Tay J.-H., Tay S.T.-L., Jiang R.: Removal of micro-particles by microbial granules used for aerobic wastewater treatment. *Wat. Sci. Technol.* **50**, 147–154 (2004)
17. Jang A., Yoon Y.-H., Kim I.S., Kim K.-S., Bishop L.P.: Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *J. Biotechnol.* **105**, 71–82 (2003)
18. Karcz J.: Nowoczesna mikroskopia elektronowa w diagnostyce środowiska. *Problemy Środowiska i Jego Ochrony*, **15**, 223–244 (2007)
19. Lemaire R., Webb R.I., Yaun Z.: Microscale observation of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient rich industrial wastewater. *ISME J.* **2**, 528–541 (2008)
20. Lettinga, G., van Velsen A. F. M., Hobma S. W., De Zeeuw W., Klapwijk A.: Use of upflow sludge blanket reactor concept for

- biological waste water treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioengineer.* **22**, 699–734 (1980)
21. Liu Y., Wu W., Tay J., Wang J.: Formation and long-term stability of nitrifying granules in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technol.* **99**, 3919–3922 (2008)
 22. MacLeod F.A., Guiot S.R., Costerton J.W.: Electron microscopic examination of the extracellular polymeric substances in anaerobic granular biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 481–485, (1995)
 23. McSwain B.S., Irvine R.I., Hauser M., Widerer P.A.: Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1051–1057 (2005)
 24. Mosquera A., Figueroa M., Morales N., Val Á., Campos J.L., Méndez Pampín, R.J.: Chapter II: Aerobic granulation (w) Innovative Technologies for Urban Wastewater Treatment Plants, red. Lema J.M., Uniwersytet Santiago de Compostela, 2010, s. 35–38
 25. Rao M.V.R., Atreyi M., Rajeswari M.R.: Fluorescence studies on concanavalin-A. *J. Biosci.* **6**, 823–828 (2007)
 26. Raszka A., Ziembinska A., Wiechetek A.: Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej. *Czasopismo Techniczne*, **2**, 101–114 (2009)
 27. Sheng G.P., Yu H.Q., Li X.Y.: Stability of sludge flocs under shear conditions: roles of extracellular polymeric substances (EPS). *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 1095–1102 (2006)
 28. Song Z., Zhang K., Tong L.: Influence of temperature on the characteristics of aerobic granulation in sequencing batch airlift reactors. *J. Environment. Sci.* **21**, 273–278 (2009)
 29. Song Z., Pana Y., Zhang K., Ren N., Wang A.: Effect of seed sludge on characteristics and microbial community of aerobic granular sludge. *J. Environment. Sci.* **22**, 1312–1318 (2010)
 30. Stewart P., Murga R., Srinivasan R., de Beer D.: Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Wat. Res.* **29**, 2006–2009 (1995)
 31. Tay J.H., Ivanov V., Pan S., Tay S.T.L.: Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 254–257 (2002)
 32. Wang F., Xia S.Q., Liu Y., Chen X.S., Zhang J.: Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up of aerobic granular sludge. *J. Environment. Sci.* **19**, 996–1002 (2007)
 33. Wang Z.-W., Liu Y., Tay J.-H.: Biodegradability of extracellular polymeric substances produced by aerobic granules. *Microbiol. Biotechnol.* **74**, 462–466 (2007)
 34. Weber S.D., Ludwig W., Schliefer K.-H., Fried J.: Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms, *Appl. Environ. Biotechnol.* **73**, 6233–6240 (2007)
 35. Wingerder J., Neu T.R., Flemming H.C. Microbial extracellular polymeric substances, red. Flemming H.C., Springer, Berlin, 1999, s. 3–9
 36. Woźnica A., Karcz J., Nowaka A., Gmur A., Bernas T.: Spatial architecture of nitrifying bacteria biofilm immobilized on polyurethane foam in an automatic biodetector for water toxicity. *Microscopy and Microanalysis*, **16**, 550–560 (2010)
 37. Zheng Y.-M., Yu H.-Q., Sheng G.-P.: Physical and chemical characteristic of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochemistry*, **40**, 645–650 (2005)
 38. Zheng YM, Yu HQ.: Determination of the pore size distribution and porosity of aerobic granules using size-exclusion chromatography. *Wat. Res.* **41**, 39–46 (2007)
 39. [www.http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Zawadzki03](http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Zawadzki03); Zawadzki M., 14 wrzesień 2005 (on-line), Skaningowa mikroskopia elektronowa – zalety, wady, zastosowania, dostępne on-line 06.05.2011