

OTWARTE SEMINARIA IETU

CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW BAKTERII WYIZOLOWANYCH Z PRZYDOMOWYCH OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW

Łukasz Jałowiecki

Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych
Katowice, 16 listopada 2017

- Przydomowe Oczyszczalnie ścieków
- Charakterystyka fizyko-chemiczna oraz mikrobiologiczna ścieków
- Charakterystyka wyizolowanych szczepów bakterii
- Biodegradacja antybiotyków z grupy fluorochinoli
- Wnioski

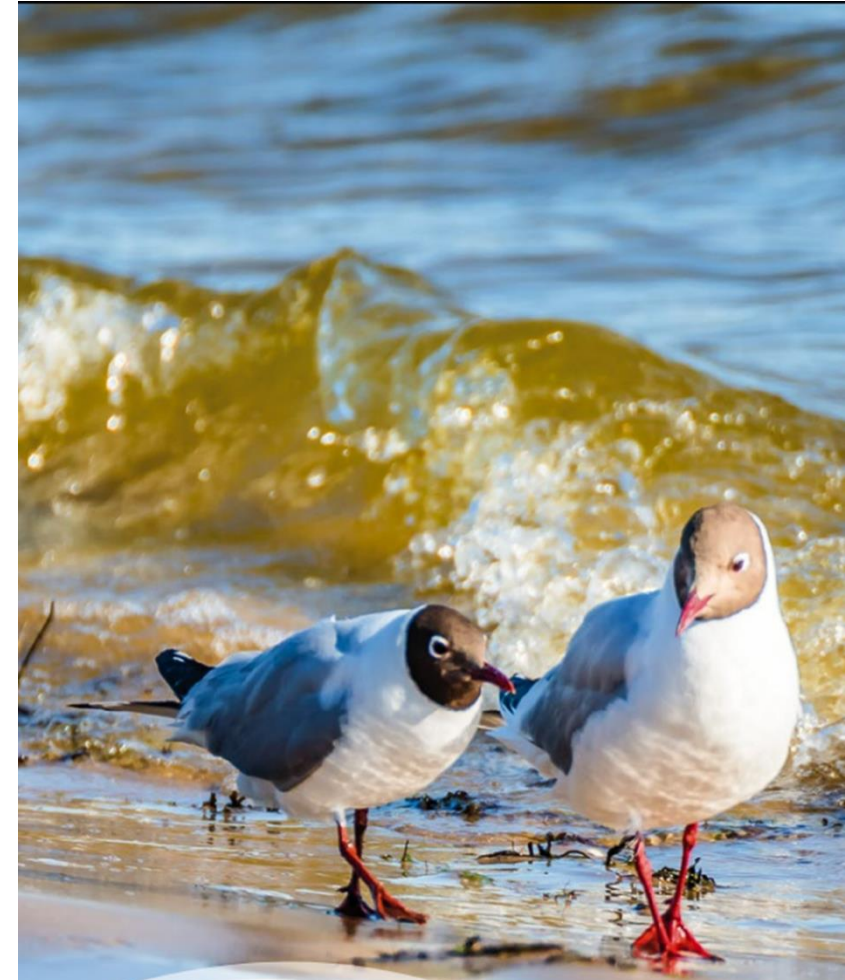
SPIS TREŚCI

Projekt BONUS OPTITREAT dotyczył poprawy efektywności działania biologicznych przydomowych oczyszczalni ścieków w kierunku zwiększenia usuwania biogenów, mikroorganizmów patogennych i związków szkodliwych m.in. farmaceutyków i antybiotyków

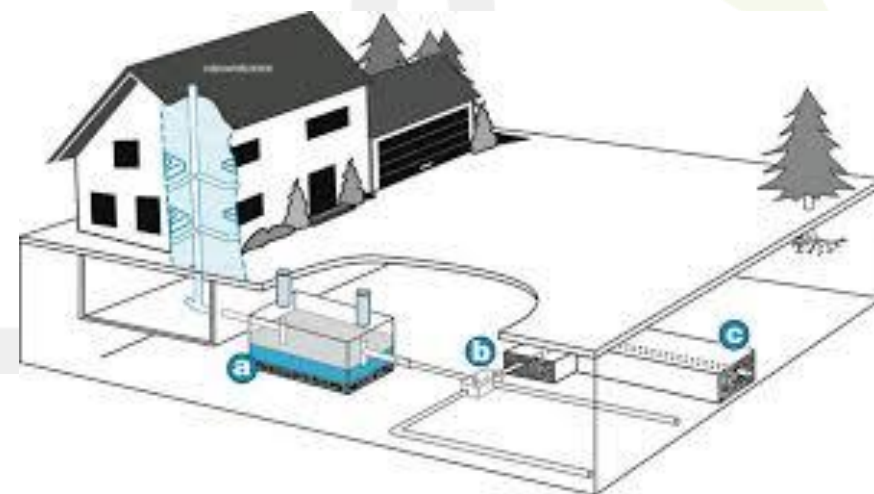
 OPTITREAT

Projekt OPTITREAT był realizowany w latach 2014-2017 przez konsorcjum w składzie: **Szwedzki Instytut Badań nad Środowiskiem (IVL)** – koordynator projektu, niemiecki **Instytut Rozwoju i Oceny Technologii Oczyszczania Ścieków RWTH Aachen** oraz **IETU**. Projekt był współfinansowany przez UE w ramach Programu BONUS-185 oraz NCBiR.

Więcej informacji na stronie www projektu – optitreat.ivl.se



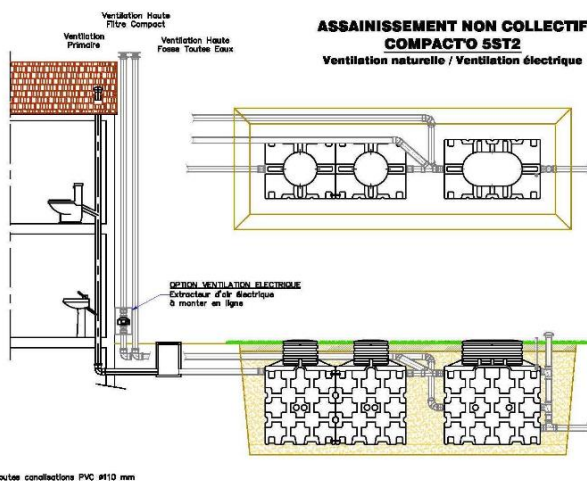
Przydomowa oczyszczalnia ścieków zgodnie z ustawą z dnia 27 kwietnia 2001r. **Prawo ochrony środowiska (Dz. U, 2001 nr 62 poz. 627)** stanowi instalację, czyli stacjonarne urządzenie techniczne lub technologicznie powiązany zespół takich urządzeń. Jej eksploatacja powinna opierać się na przeciwdziałaniu zanieczyszczeniom poprzez zapobieganie lub ograniczenie wprowadzania do środowiska substancji lub energii. Eksploatacja instalacji nie może powodować przekroczenia standardów emisyjnych, określonych przepisami Prawa wodnego.



Technologia A



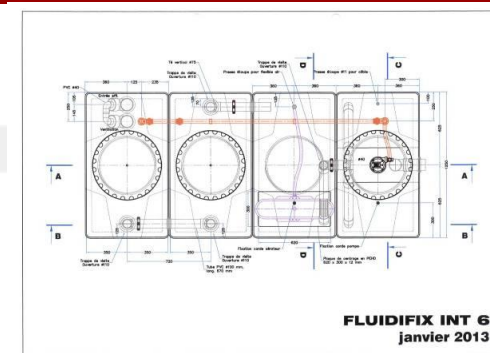
Technologia B



Toutes connexions PVC Ø110 mm



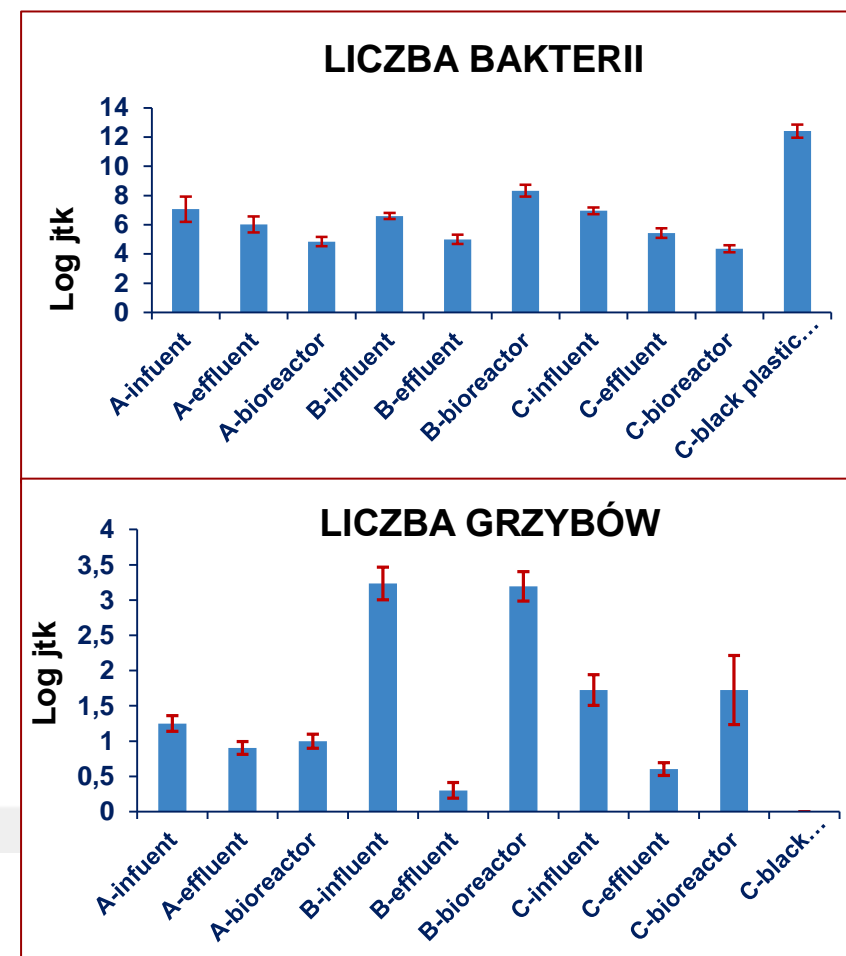
Technologia C



Fizyko-chemiczna

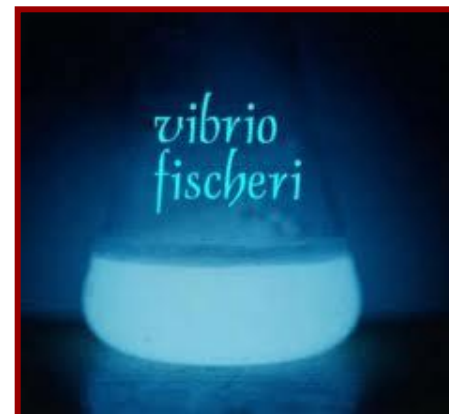
No	Charakterystyka	Jednostka	Influent			Effluent		
			Technologia			Technologia		
			A	B	C	A	B	C
1.	Temperatura	[°C]	10.13±0.07			9.15	9.45	8.8
2.	COD	[mg/l]	730.5±1.41			nd	nd	nd
3.	NH ₄ -N	[mg/l]	32.08±0.28			nd	nd	nd
4.	N _{tot}	[mg/l]	60.83±1.41			nd	nd	nd
5.	P _{tot}	[mg/l]	7.18±0.42			nd	nd	nd
6.	pH	[-]	7.46±0.02			8.95	7.59	7.53
7.	Przewodnictwo	[uS/cm]	838.83±2.82			765	713.5	691
8.	Fracja zawieszona	[FNU]	175.5±9.19			6.7	10.7	7.6
9.	Settleable solids	[ml/l]	nd			< 0.1	< 0.1	0.3

Mikrobiologiczna



Ocenę ekotoksyczności wykonano za pomocą :

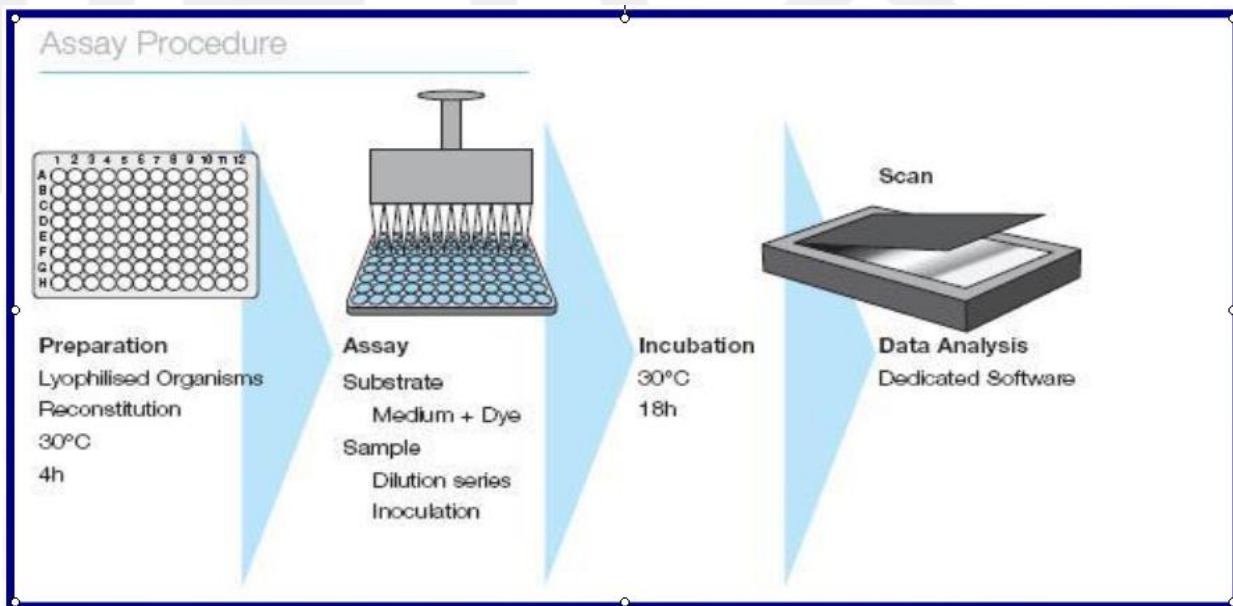
- Testu Microtox
- Testu Spirotox
- Testu MARA



	MICROTOX	SPIROTOX
	TU	TU
ECOBOX (A)-influent	0,73	2,82
ECOBOX (A)-effluent	0	0
ECOBOX (A)-bioreactor_liquid	0	0
COMPACTO (B)-influent	0,9	2,82
COMPACTO (B)-effluent	0	0
COMPACTO (B)-bioreactor_rockwool pieces	0	0
FLUIDIFIX (C)-influent	1,32	2,82
FLUIDIFIX (C)-effluent	0	0
FLUIDIFIX (C)-bioreactor_liquid	0	0



- Test MARA



Conc (mg/l)	SPECIES										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.51	14	1	0	12	4	0	5	4	0	5	0
1.5	17	1	0	1	4	0	1	2	0	10	22
4.6	38	5	19	7	4	0	30	9	0	20	64
14	100	100	68	92	20	100	100	13	2	8	73
42	100	100	100	100	50	100	100	100	32	100	100
125	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

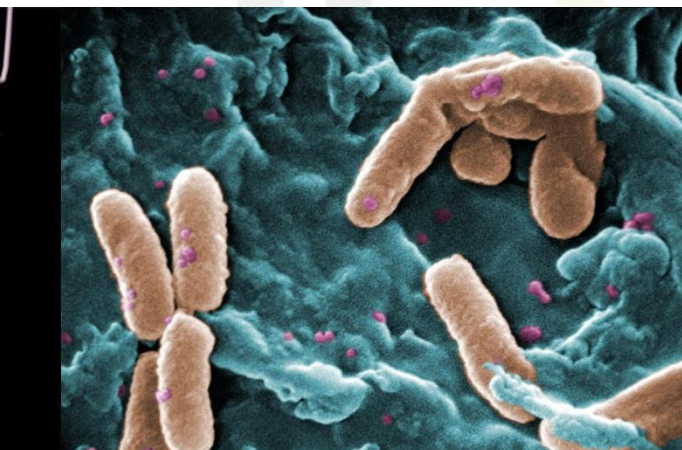
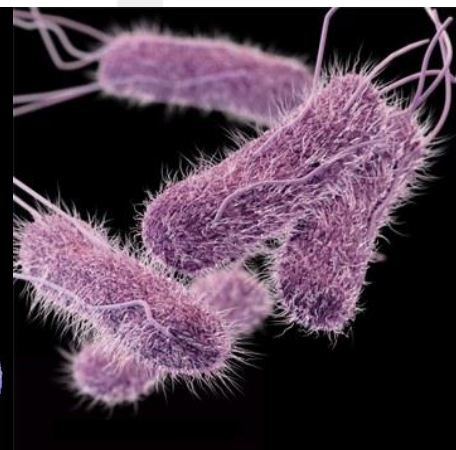
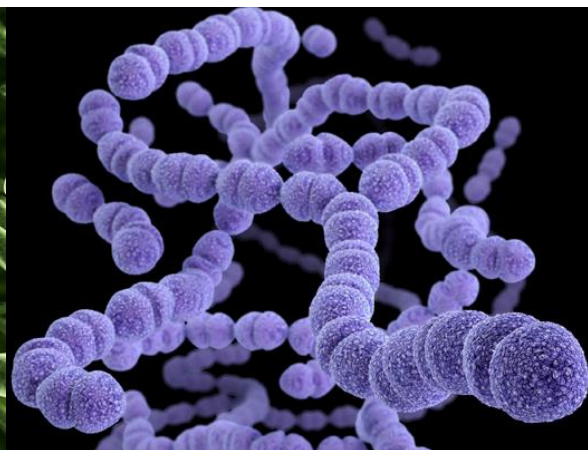
Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mean
MTC	2.4	4.6	6	4.5	19	4.9	3.2	11	32	9.7	2.7	6.5

Growth inhibition values (%)

Most sensitive species = 1

OCENA MIKROBIOLOGICZNA ŚCIEKÓW

	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> 0157	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Proteus</i> sp.
ECOBOX (A)-influent	+	-	+++	+	+	+	+	-
ECOBOX (A)-effluent	-	-	-	-	-	-	-	-
ECOBOX (A)-bioreactor	+	-	+	-	-	+	+	-
COMPACTO (B)-influent	++	-	+++	+	+	+	+	+
COMPACTO (B)-effluent	+	-	+	-	+	+	+	-
COMPACTO (B)-bioreactor	+++	-	+++	+	+	+	+	+
FLUIDIFIX (C)-influent	++	-	++	+	+	+	+	+
FLUIDIFIX (C)-effluent	+	-	+	-	+	+	+	+
FLUIDIFIX (C)-bioreactor	+	-	+	+	++	+	+	+
FLUIDIFIX (C)-black plastic pieces	+++	-	+++	++	+++	+	+	+



Analiza Bioróżnorodności funkcjonalnej oraz aktywności mikrobiologicznej

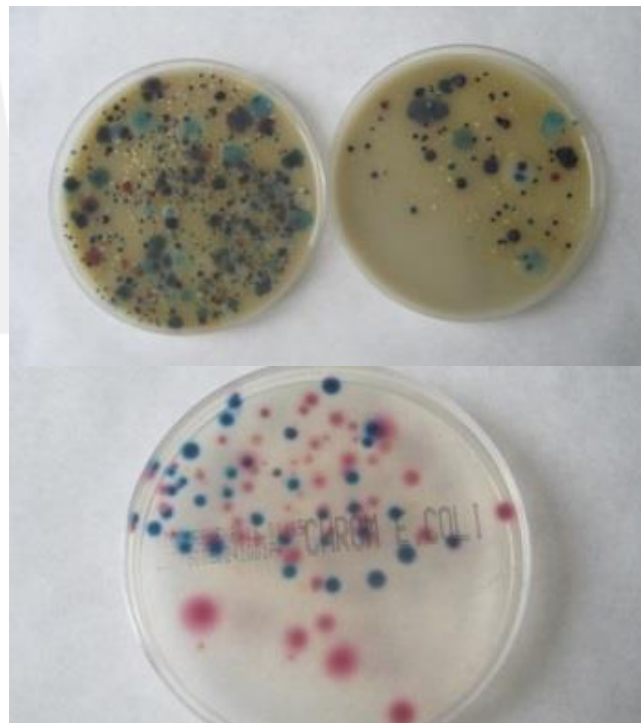
Próba	I				
	AWCD	H	E	S	AUC
TECHNOLOGIA A					
Influent	0.869±0.019	1.403±0.011	1.004±0.007	25±0.00	541.36
Effluent	0.019±0.006	1.183±0.058	0.00	0.00	7.02
Liquid sample (bioreactor)	0.504±0.004	1.342±0.005	1.115±0.025	16±1.00	168.47
TECHNOLOGIA B					
Influent	0.994±0.028	1.423±0.005	0.991±0.012	27±1.16	621.41
Effluent	0.178±0.068	1.467±0.011	0.988±0.007	0.00	225.00
Rockwool material	1.302±0.045	1.482±0.003	0.993±0.002	31±0.00	857.00
TECHNOLOGIA C					
Influent	0.663±0.022	1.406±0.005	0.942±0.004	24.00	320.79
Effluent	0.794±0.015	1.412±0.005	0.947±0.003	24±0.58	283.34
Black plastic pieces	1.230±0.039	1.469±0.004	0.985±0.003	31.00	778.93
Liquid sample (bioreactor)	0.533±0.017	1.369±0.007	0.918±0.005	21±1.16	232.37

Płytki EcoPlate Pozwalają na ocenę aktywności i bioróżnorodności mikrobiologicznej na poszczególnych etapach oczyszczania ścieków, daje to odpowiedź czy proces oczyszczania jest skuteczny mikrobiologicznie lub czy parametry pracy danej oczyszczalni są prawidłowe.

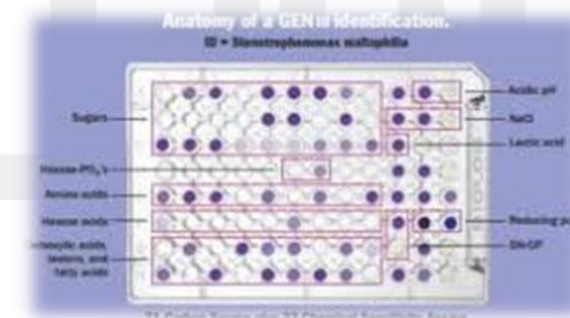
CARBON SOURCES	TECHNOLOGY A			TECHNOLOGY B			TECHNOLOGY C			
	IN	EF	LS	IN	EF	RM	IN	EF	BBM	LS
Amines & Amides (A & A)										
Phenylethylamine										
Putrescine										
Aminoacids (AA)										
Glycyl-L-glutamic Acid										
L-Arginine										
L-Asparagine										
L-Phenylalanine										
L-Serine										
L-Threonine										
Carboxylic & acetic acids (C & AA)										
γ-Hydroxybutyric Acid										
α-Ketobutyric Acid										
2-Hydroxy Benzoic Acid										
4-Hydroxy Benzoic Acid										
D-Galactonic Acid γ-Lactone										
D-galacturonic Acid										
D-glucosaminic Acid										
D-Malic Acid										
Itaconic Acid										
Carbohydrates (Carb)										
α-D-Lactose										
β-Methyl-D-Glucoside										
D-Cellobiose										
D-Mannitol										
D-Xylose										
i-Erythritol										
N-Acetyl-D-Glucosamine										
D,L-α-Glycerol Phosphate										
Glucose-1-Phosphate										
Pyruvic Acid Methyl Ester										
Polymers (Poly)										
α-Cyclodextrin										
Glycogen										
Tween 40										
Tween 80										
Σ	23	8	20	23	31	31	22	21	26	21
SUBSTRATES ≥ 4%	11	6	10	15	3	2	13	11	6	9

Zidentyfikowano ponad 60 szczepów bakterii należących do różnych grup m.in.:

- *Streptococcus*
- *Pseudomonas*
- *Stenotrophomonas*
- *Microbacterium*
- *Lactobacillus*
- *Microbacterium*
- *Alcaligenes*
- *Flavobacterium*
- *Bacillus*
- *Variovorax*
- *Acinetobacter*
- *Chryseobacterium*
- *Aeromonas*
- *Enterococcus*
- *Serratia*



System Biolog umożliwia dokładną identyfikację bakterii na podstawie analizy metabolizmu mikroorganizmów w odniesieniu do zróżnicowanych źródeł węgla, znajdujących się na 96 dołkowej płytce. System Biolog porównuje obserwowane zmiany metaboliczne z największą na świecie bazą danych obejmującą około 2.600 gatunków bakterii.



Ocena aktywności enzymatycznej

Ocena obecności biosurfaktantów

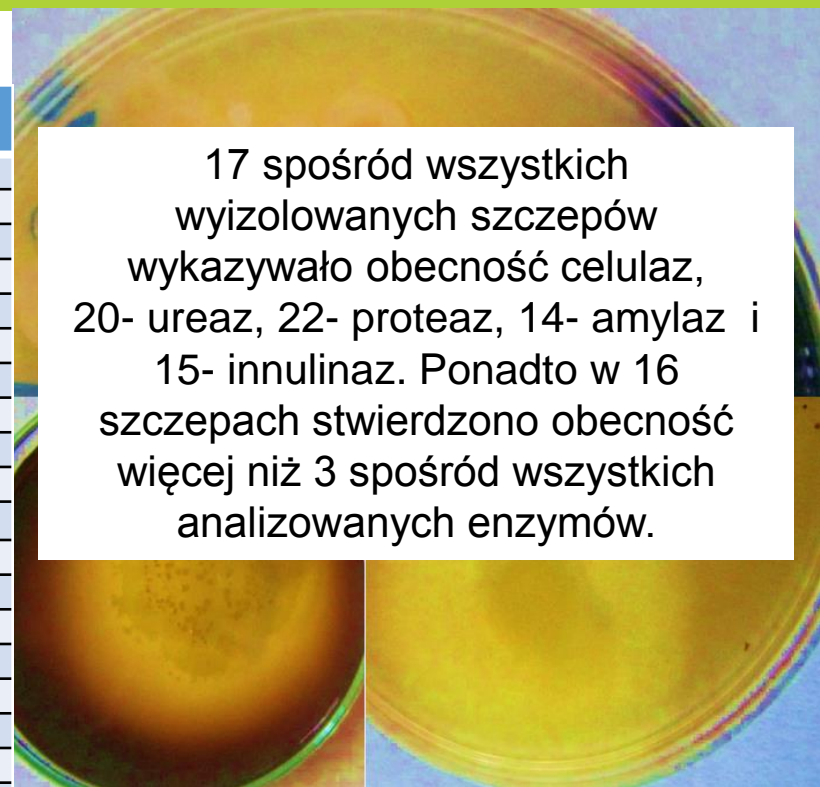
Ocena tworzenia biofilmu

Ocena antybiotykooporności

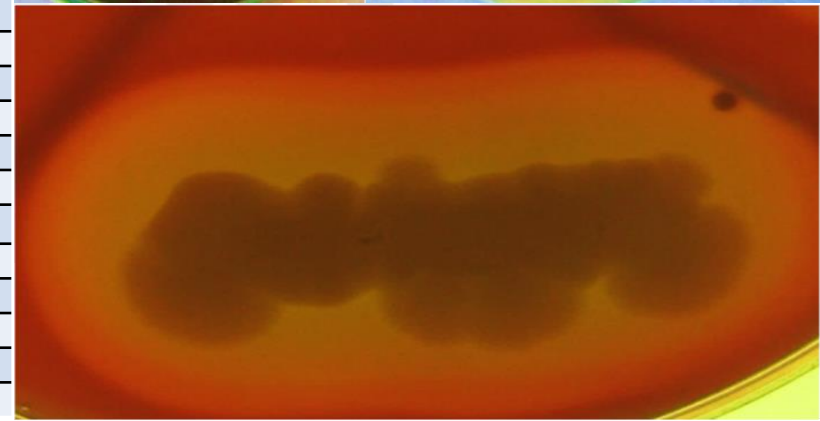


OCENA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

szczep	Lakazy	Innulinazy	Celulazy	Ureazy	Proteazy	Lipazy	Amylazy
Streptococcus australis	+	-	+	+	+	-	+
Pseudomonas fluorescens	-	+	+	+	+	-	+
Stenotrophomonas altophilia	+	-	+	+	+	-	+
Pseudomonas fragi	-	+	-	+	+	-	+
Stenotrophomonas rhizophila	-	-	-	+	+	-	-
Microbacterium flavescens	-	+	+	+	+	-	+
Lactobacillus coryniformis	-	-	+	-	+	-	+
Microbacterium maritpicum	-	+	+	+	+	-	+
Alcaligenes faecalis ss faecalis	-	-	+	+	-	+	-
CDC group II-E A	-	-	-	-	-	+	-
Pseudomonas chlororaphis	-	-	-	+	+	-	-
CDC group II-H	-	+	+	-	+	-	-
Flavobacterium hydatis	-	+	+	+	+	+	+
Flavobacterium resinovorum	+	+	+	-	+	+	+
Mycobacterium brumae	-	+	+	+	+	-	+
Flavobacterium hydatis	-	-	-	+	-	-	-
Bacillus horti	+	-	+	-	-	+	-
Variovorax paradoxus	+	+	+	+	+	+	-
Bacillus alcalophilus	+	-	-	+	+	+	-
Acinetobacter johnsonii	-	+	-	-	-	+	-
Chryseobacterium balustinum	-	+	+	+	+	-	-
Aeromonas bestiarum	-	+	-	+	+	-	+
Enterococcus haemoperoxidus	-	+	-	-	-	-	-
Paenibacillus azoreducens	-	-	-	-	-	-	-
Carnobacterium divergens	+	-	-	-	-	+	-
Streptococcus criceti	+	+	-	+	+	+	-
Pseudomonas fulva	+	+	+	-	+	+	+
Flavobacterium tirrenicum	+	+	+	+	+	+	+
Sphingobacterium multivorum	-	+	+	+	+	-	-
Serratia marcescens	-	-	-	+	+	-	+

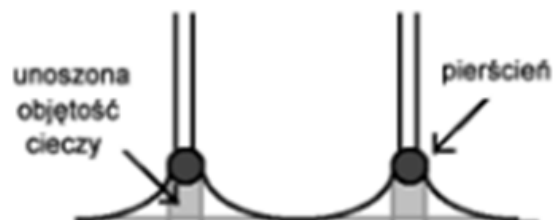
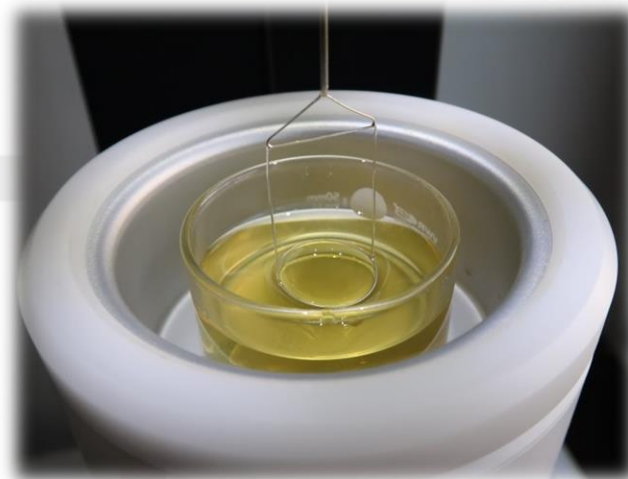


17 spośród wszystkich wyizolowanych szczepów wykazywało obecność celulaz, 20- ureaz, 22- proteaz, 14- amylaz i 15- innulinaz. Ponadto w 16 szczepach stwierdzono obecność więcej niż 3 spośród wszystkich analizowanych enzymów.

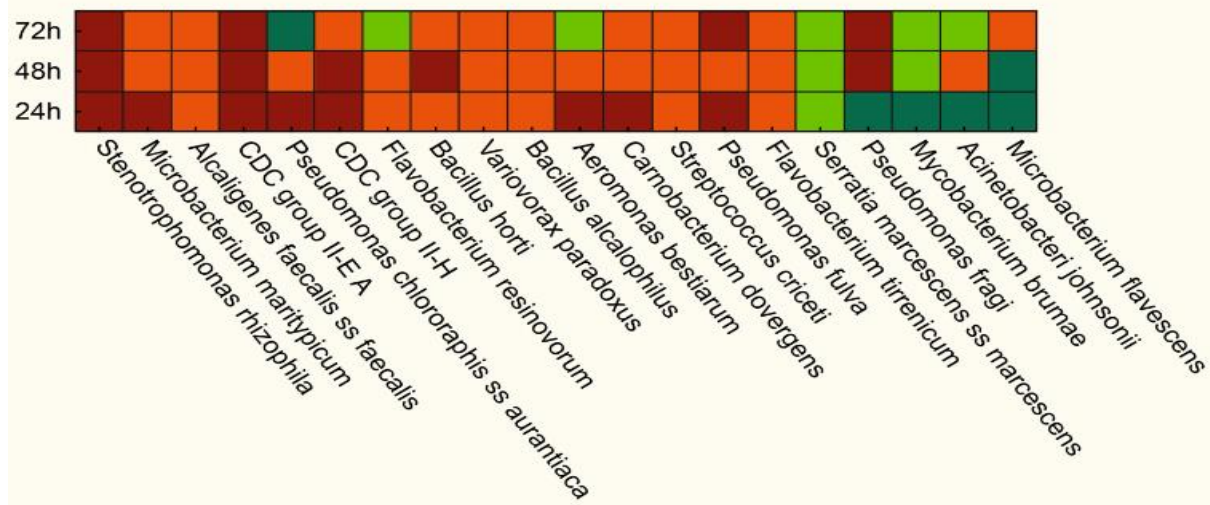
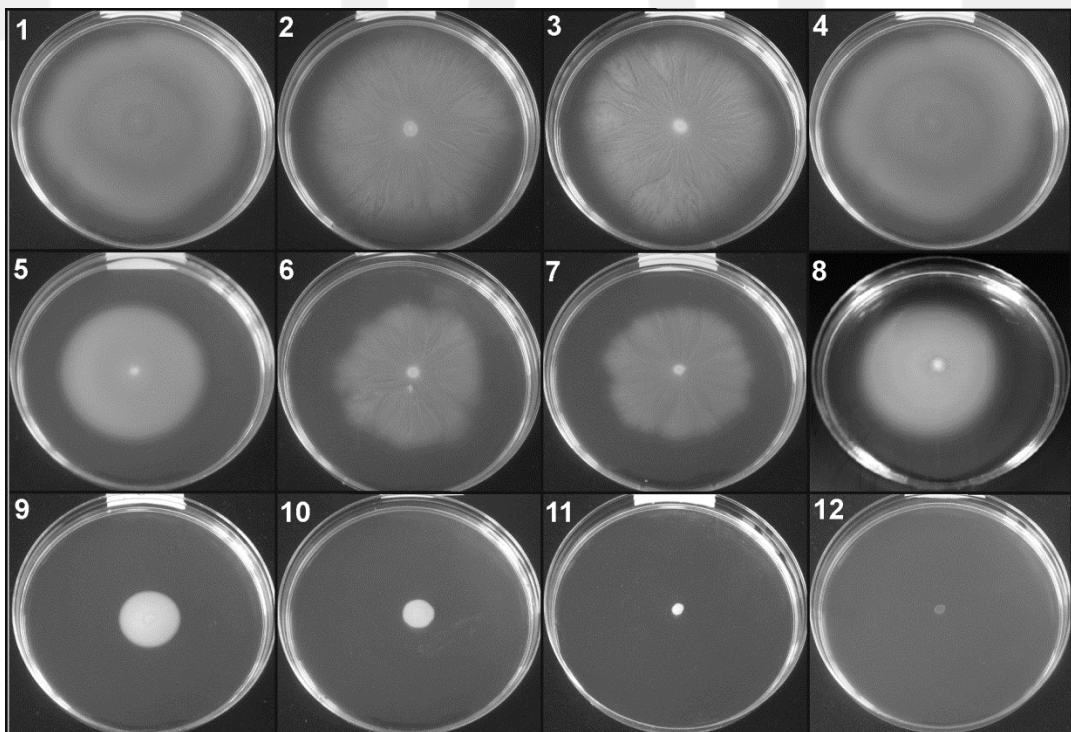
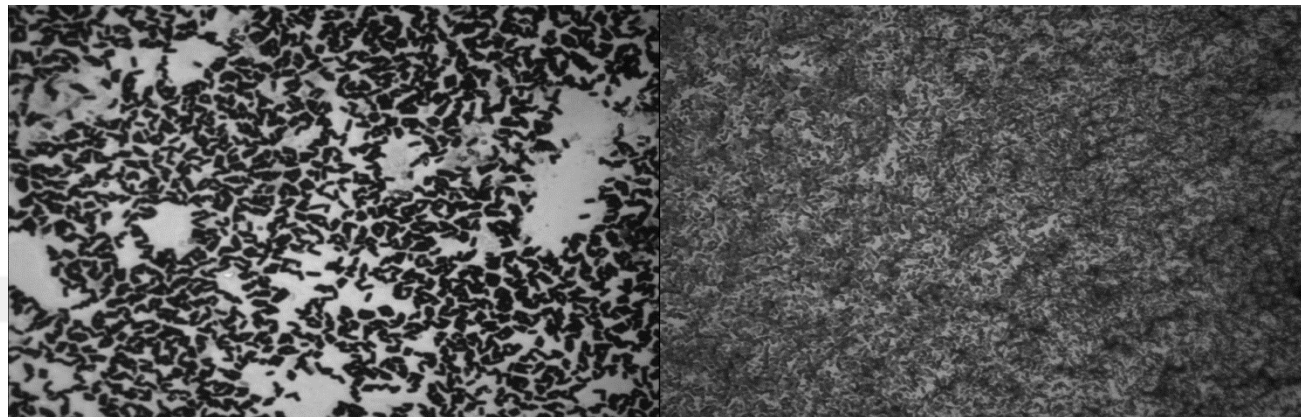


Zasada pomiaru napięcia powierzchniowego metodą DuNouya opiera się na pomiarze siły potrzebnej do oderwania platynowego pierścienia od powierzchni cieczy.

Wśród 11 spośród wszystkich wyizolowanych szczepów zaobserwowano spadek napięcia powierzchniowego

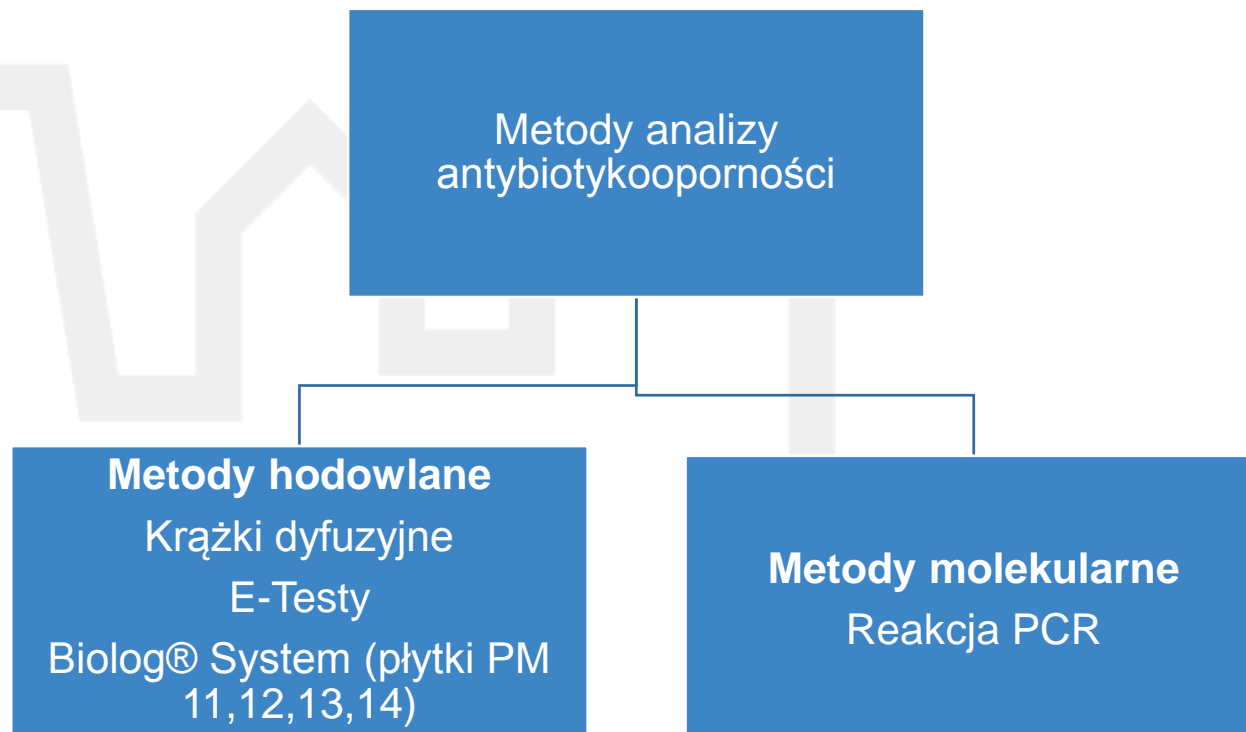


Badania wykazały, że większość badanych szczepów posiada zdolność tworzenia biofilmu. 15 spośród analizowanych szczepów zaklasyfikowano do tzw. „silnych producentów” biofilmu (ang. *strong biofilm producer*), 4 - do „średnich producentów” (ang. *moderate biofilm producer*), natomiast 11 - nie wykazywało zdolności tworzenia błony biologicznej.

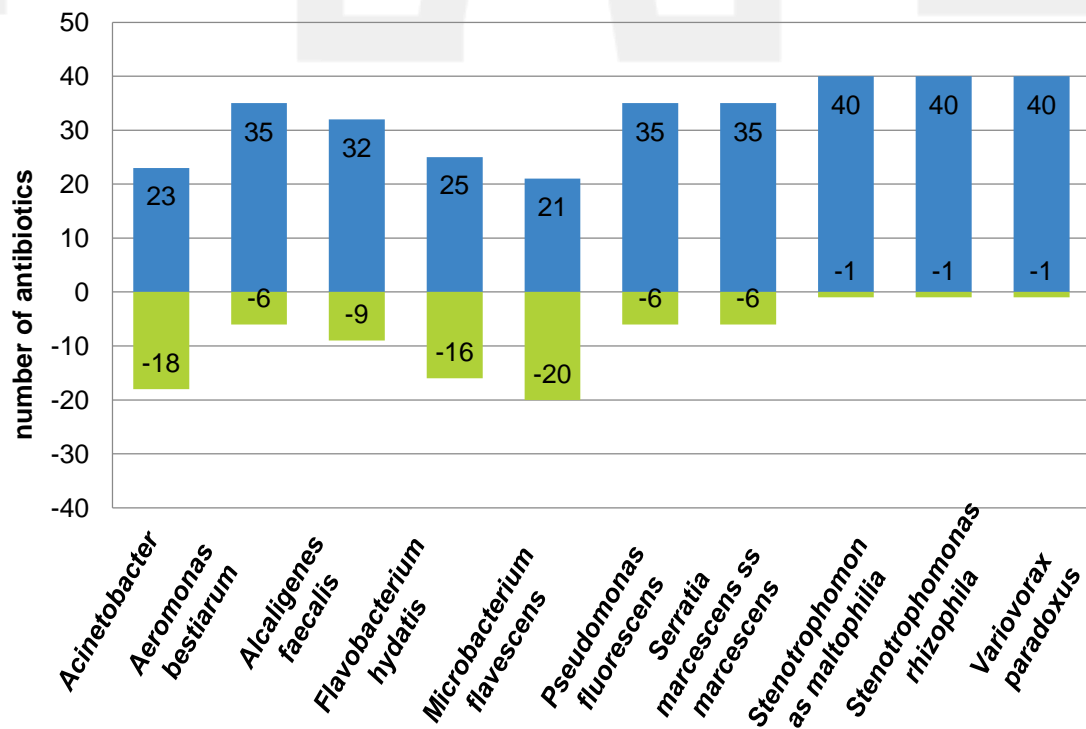




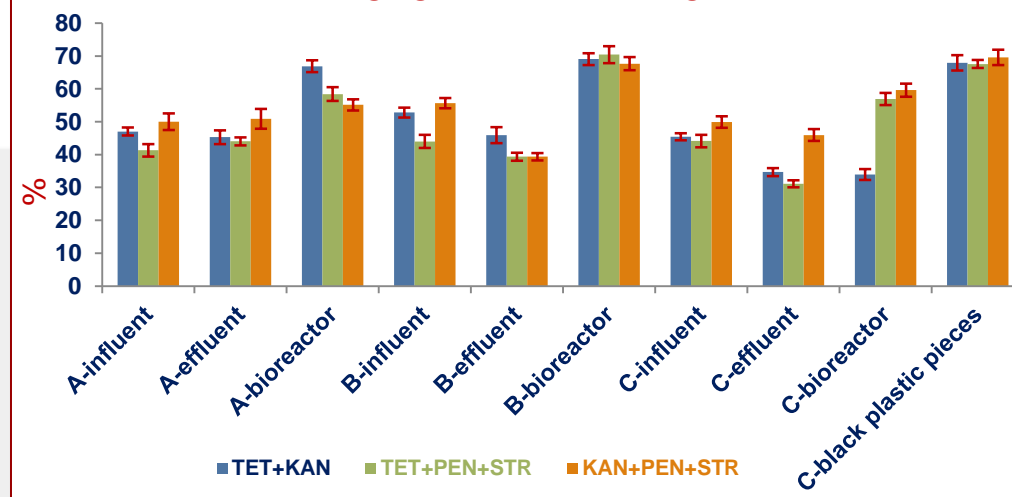
© Getty Images



Krażki dyfuzyjne

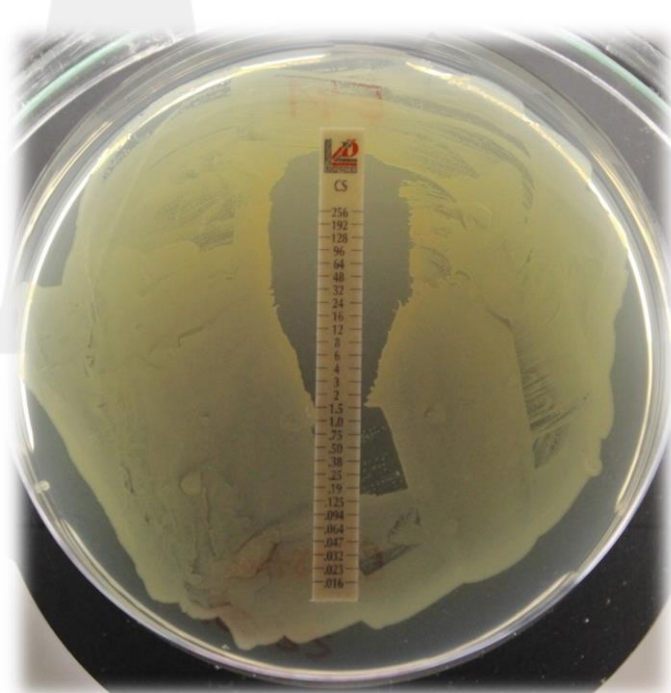


BAKTERIE OPORNE NA ANTYBIOTYKI



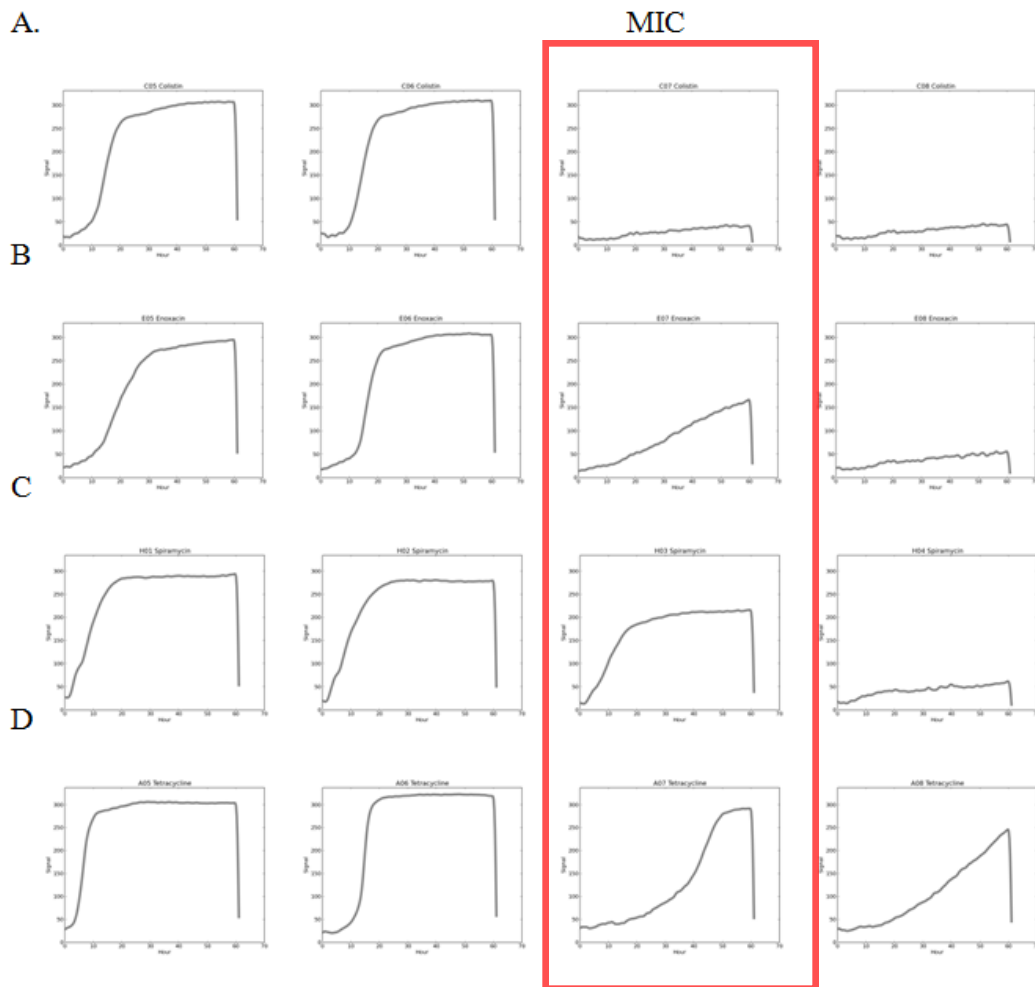
■ antibiotic number-sensitive
■ antibiotic number-resistance

E-Testy

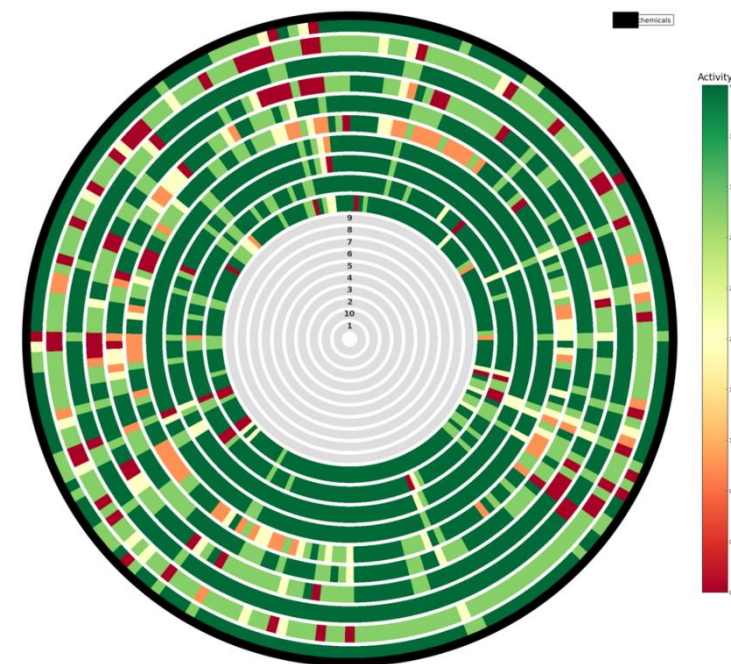


CIPROFLOXACIN	0,002-32,
GENTAMICIN	0,064-1024
AZITHROMYCIN	0,016-256,
AZTREONAM	0,064-1024
CEFEPIME	0,016-256
DORIPENEM	0,002-32
ERTAPENEM	0,002-32
MUPIROCIN	0,064-1024
NORFLOXACIN	0,016-256
OFLOXACIN	0,002-32
TRIMETHOPRIM	0,002-32
SULFAMETHOXAZOLE SXT	0,002-32
NALDIC ACID	

Biolog® System (płytki PM 11,12,13,14)



Active ring

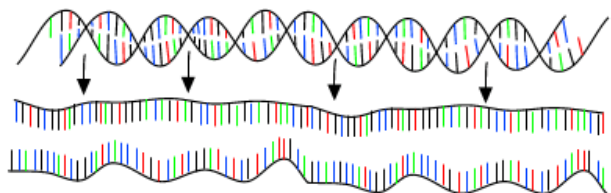


F

Identyfikację wieloopornych szczepów bakterii (MDR- ang. *multidrug resistance*) i wyznaczenie wartości MIC możliwe jest m.in. dzięki zastosowaniu systemu BIOLOG®. W systemie tym płytki o sygnaturze PM11-PM14 i oprogramowania Omnilog umożliwiają określenie wrażliwości szczepów bakterii na kilkadziesiąt chemioterapeutyków

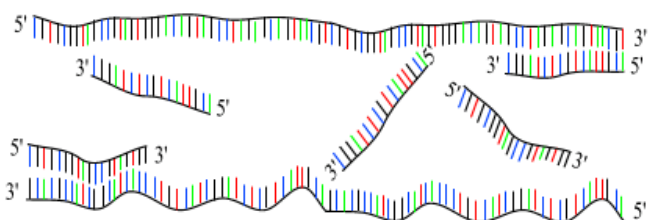
Przebieg reakcji PCR

Reakcja PCR przebiega w 3 etapach cyklicznie, w zmieniających się temperaturach:



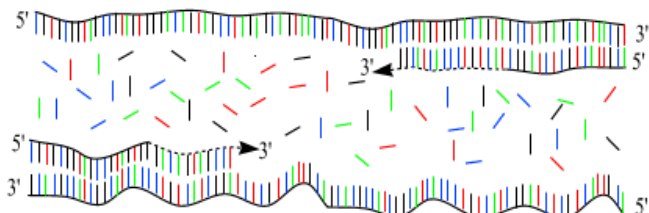
Etap I: denaturacja

Pod wpływem wyższej temperatury (95st.C) podwójna nić DNA rozpada się na pojedyncze nici



Etap II: przyłączenie tzw. "primerów"

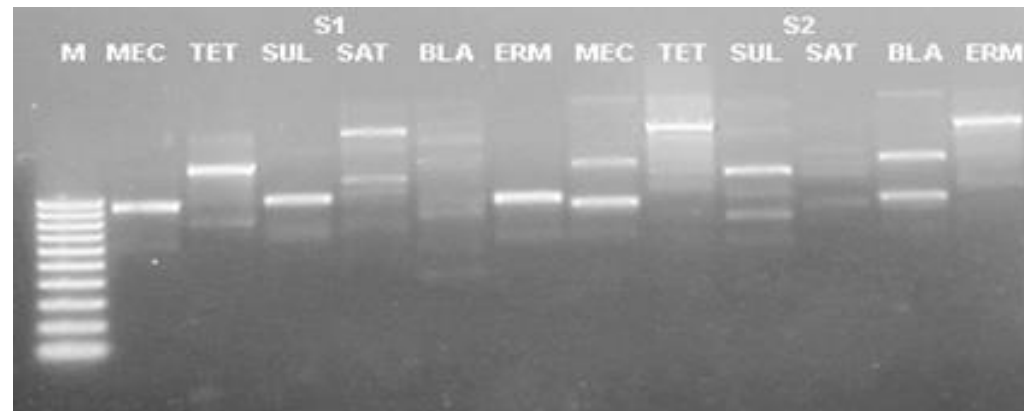
Primery to syntetyczne, krótkie fragmenty DNA, które na zasadzie komplementarności przyłączają się do obu krańców odcinka DNA, który chcemy powielić.



Etap III: wydłużanie "primerów"

Do przyłączonych primerów specjalny enzym polimeraza Taq dobudowuje wolne nukleotydy, odtwarzając kopię pierwotnej nici DNA.

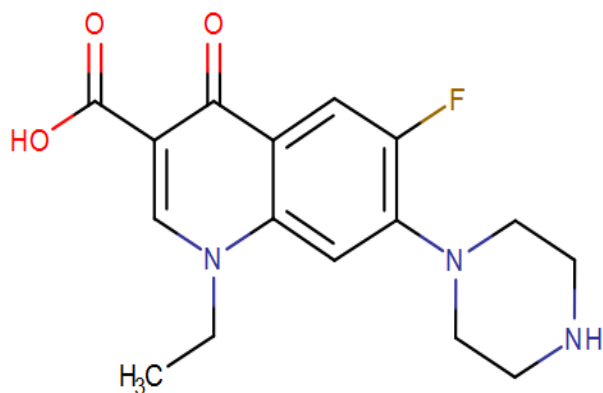
W kolejnych cyklach reakcji PCR ilość powielonych fragmentów pierwotnej matrycy DNA ulega zwiększeniu w postępie geometrycznym, osiągając nawet do 1 miliona kopii (po 30-40 cyklach). Dzięki temu możliwa jest analiza mikrośladów biologicznych, a nawet pojedynczych komórek.



Rozkład elektroforetyczny po amplifikacji genów oporności na antybiotyki (badania własne).
M-marker wielkości 1000-100kbp,
MEC-metycylina, TET- tetracyklina,
SUL- sulfonamid SAT- gentamycyna,
BLA- β-laktamy, ERM- erytromycyna,
S1,S2- szczepy bakterii.

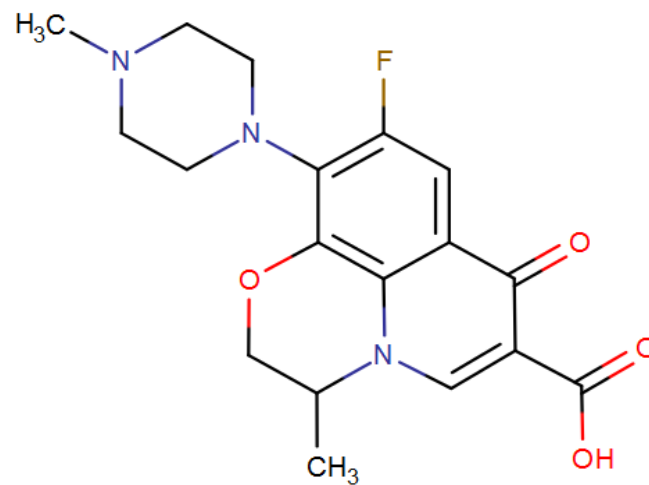


BIODEGRADACJA ANTYBIOTYKÓW Z GRUPY FLUOROCHINOLI



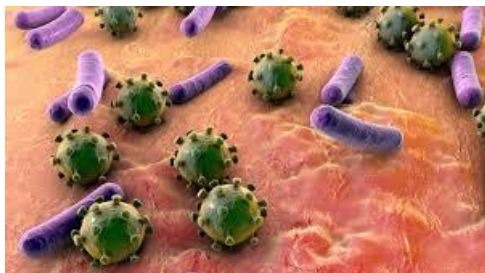
Norfloksacyna (numer CAS 70458-96-7; NOR).
Syntetyczny chemioterapeutyk z grupy fluorochinolonów. Hamuje aktywność gyrazy DNA. Działa bakteriobójczo na większość Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich gatunków bakterii

Ofloksacyna (numer CAS 82419-36-1; OFL).
Syntetyczny chemioterapeutyk z grupy fluorochinolonów. Hamuje aktywność gyrazy DNA odpowiedzialną za wprowadzanie superskrętów do helisy DNA



POZYSKIWANIE SZCZEPÓW MIKROORGANIZMÓW O POTENCJALE BIODEGRADACYJNYM

1. Wybór szczepów bakterii
2. Hodowla na podłożu z antybiotykiem
3. Testy selekcyjne
4. Identyfikacja gatunkowa wybranego mikroorganizmu



Wybór
szczepów
bakterii

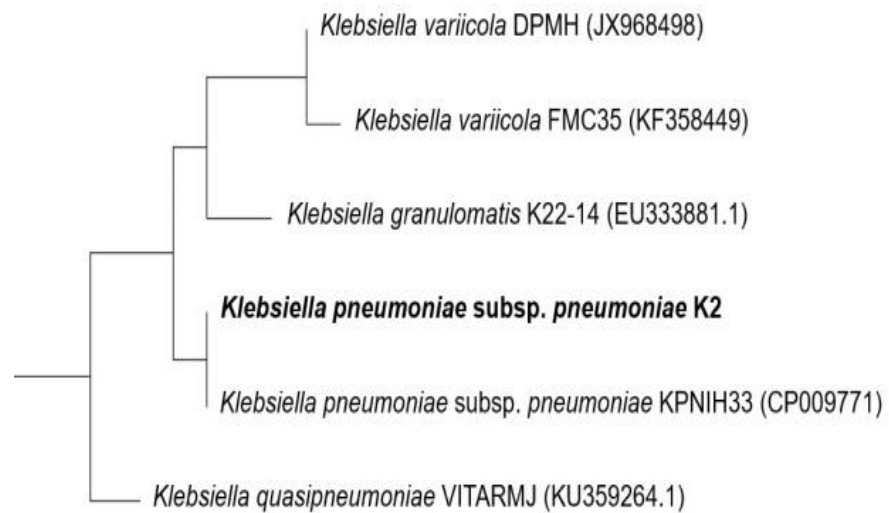
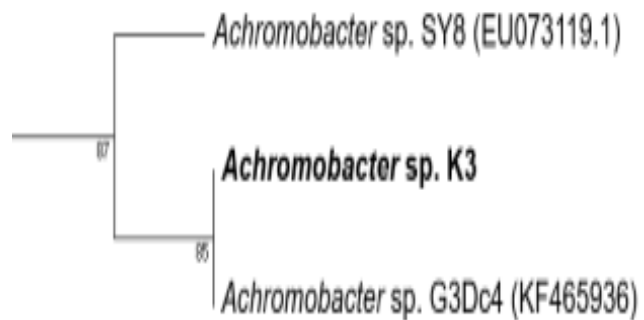
LB +10mg/l
antybiotyku

Wyznaczenie
MIC

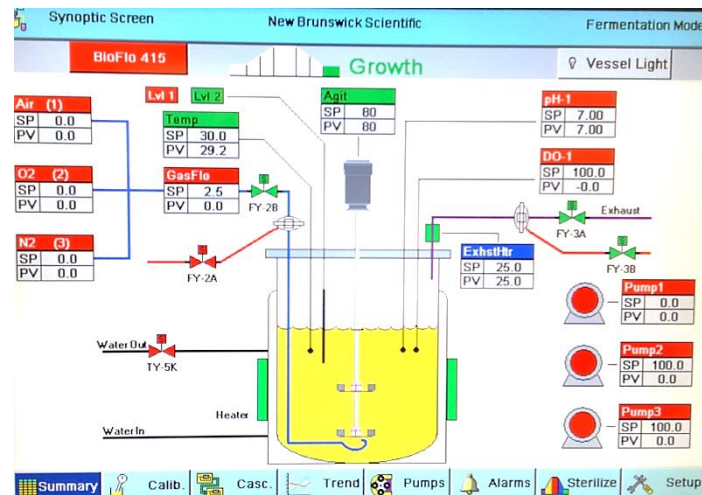
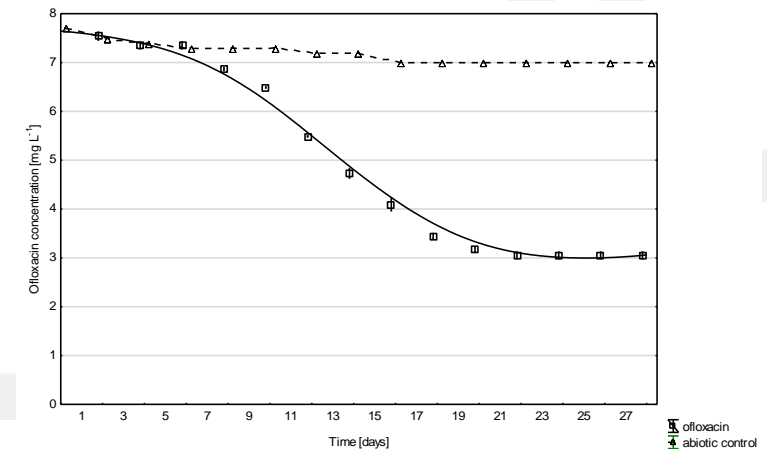
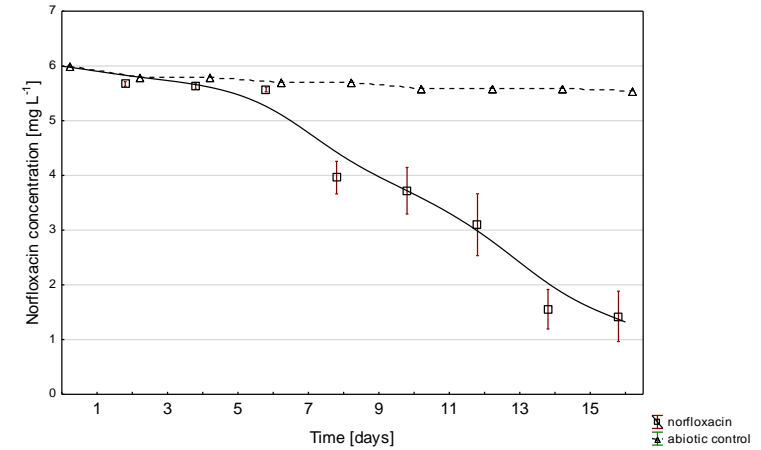
Identyfikacja
16S rRNA

KONSORCJUM BAKTERYJNE

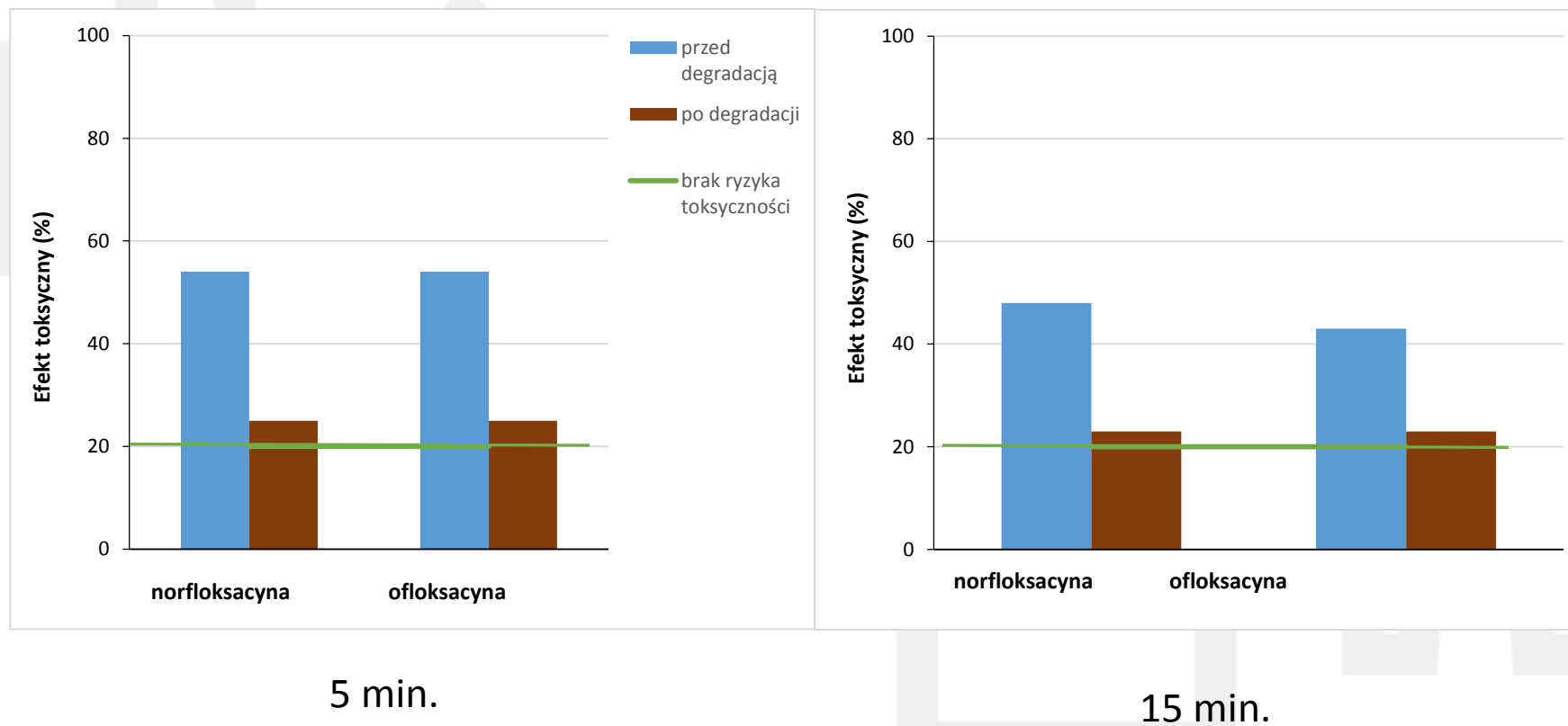
	Nazwa szczepu
K2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
K3	<i>Achromobacter</i> sp.



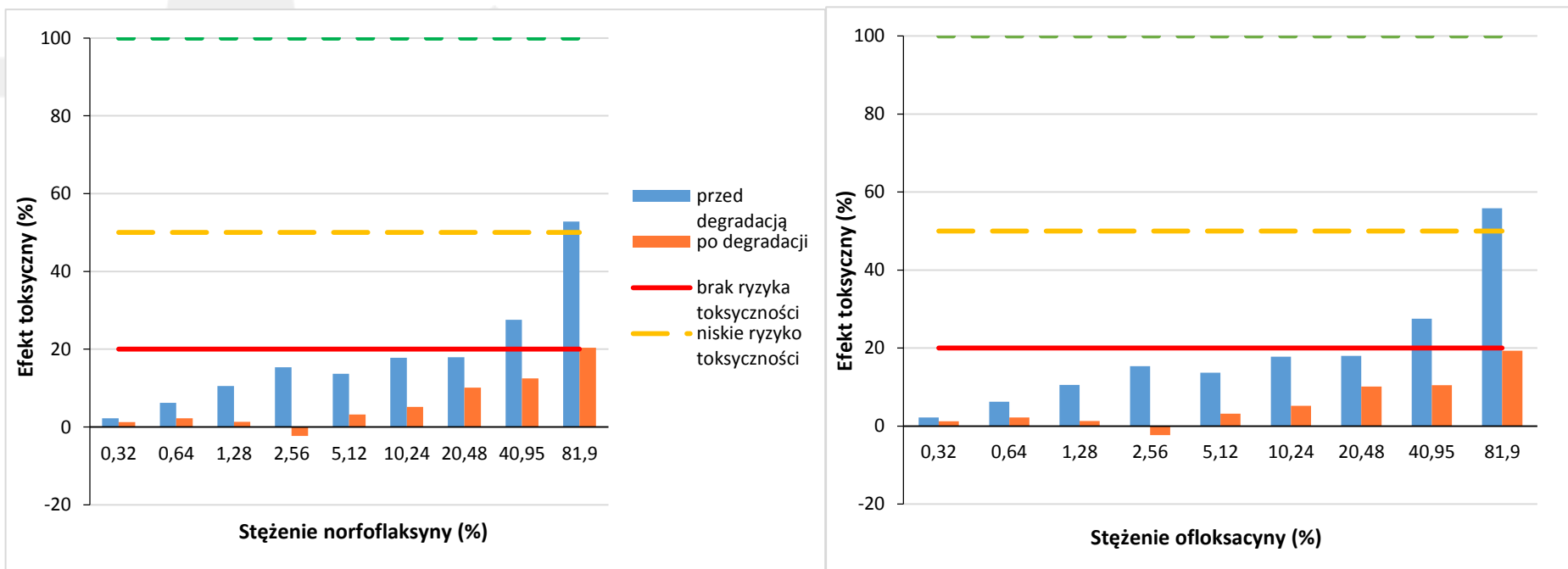
DEGRADACJA W BIOREAKTORZE NEW BRUNSWICK™ BIOFLO® 415



Wyniki testu Screening Test



Wyniki Testu Basic Test 81,9%



- Płytki EcoPlate systemu BIOLOG™ oraz system Microtox pozwalają one na ocenę poszczególnych etapów oczyszczania ścieków, oraz dają odpowiedź czy proces oczyszczania przebiega prawidłowo
- Mikroorganizmy pozyskane z WWT mogą być doskonałym źródłem enzymów mogących pełnić różne funkcje. Kolekcja takich szczepów mogłaby stanowić dobrą bazę do stworzenia komponentów, dających szansę na wprowadzenie innowacyjnych rozwiązań w różnych gałęziach przemysłu.
- Mikroorganizmy wyizolowane z takiego środowiska mogą służyć do stworzenia kolekcji szczepów o potencjale biodegradacyjnym

Jałowiecki Ł., Chojniak J., Dorgeloh E., Hegedusova B., Ejhed H., Magnér J., Płaza G.:

Microbial community profiles in wastewaters from onsite wastewater treatment systems technology; Plos One.

Chojniak J., **Jałowiecki Ł.**, Dorgeloh E., Hegedusova B., Ejhed H., Magnér J., Płaza G.:

Application of BIOLOG system for characterization of *Serratia marcescens* ss *marcescens* isolated from onsite wastewater technology (OSWT).

Płaza G, **Jałowiecki Ł.**, Chojniak J., Dorgeloh E., Hegedusova B., Ejhed H., Magnér J.,

Application of phenotypic microarrays (PMs) to characterize the multi-antibiotic resistance of bacteria isolated from onsite wastewater treatment technologies Folia Microbiologica.

Jałowiecki Ł., Chojniak J., Płaza G., Dorgeloh E., Ejhed H. Antibiotic susceptibility of

bacteria isolated from onsite wastewater treatment facilities, International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM

Application of the BIOLOG system for characterization of *Serratia marcescens* ss *marcescens* isolated from onsite wastewater technology (OSWT)*

Joanna Chojniak¹, Łukasz Jałowiecki¹, Elmar Dorgeloh², Berta Hegedusova², Helene Ejhed³, Jörgen Magnér³ and Grażyna Płaza^{1*}

¹Department of Environmental Microbiology, Institute for Ecology of Industrial Areas, Poland; ²Development and Assessment Institute in Waste Water Technology at RWTH Aachen University, Germany; ³Natural Resources & Environmental Effects, IVL Swedish Environmental Research Institute, Sweden

The scope of this study was to apply the Biolog system (KESCO) grouping (Hejazi & Falkiner, 1997). It is well



RESEARCH ARTICLE

Microbial Community Profiles in Wastewaters from Onsite Wastewater Treatment Systems Technology

Łukasz Jałowiecki¹, Joanna Małgorzata Chojniak¹, Elmar Dorgeloh², Berta Hegedusova², Helene Ejhed³, Jörgen Magnér³, Grażyna Anna Płaza^{1*}

¹ Department of Environmental Microbiology, Institute for Ecology of Industrial Areas, Katowice, Poland, ² Development and Assessment Institute in Waste Water Technology at RWTH Aachen University, Aachen, Germany, ³ Natural resources & Environmental Effects, IVL Swedish Environmental Research Institute, Stockholm, Sweden

* pla@ietu.katowice.pl



Badania były realizowane w ramach projektu pt.: “Optimization of small wastewater treatment facilities (OPTITREAT)” nr. 2112932-1 finansowanego przez BONUS EEIG oraz NCBIR

Dziękuję za uwagę

Łukasz Jałowiecki

ekspert wiodący - bioróżnorodność środowiska

Zakład Badań i Rozwoju

Tel. 32 254 60 31 wew. 119

E-mail: l.jalowiecki@ietu.pl