

Gdańsk, 15-17 kwietnia 2012 r.
Seminarium naukowo-techniczne pt.

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

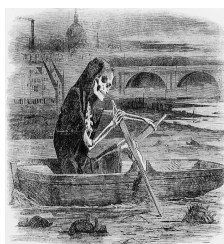


w ramach projektu „Innowacyjne źródło węgla dla wspomagania denitryfikacji w komunalnych oczyszczalniach ścieków”
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego - Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka (Poddziałanie 1.3.1)



Edward Arden and William Lockett in 1914.

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Rysunek satyryczny z 1858 r. przedstawiający rzekę Tamizę



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Fot. Edward Arden, źródło www.google.pl

Edward Arden and William Lockett . 1914, Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters, *J. Soc. Chem. Ind.* 33, 523–539.



Kamienie milowe w oczyszczaniu ścieków

1914 - wdrożenie do oczyszczania ścieków metody osadu czynnego - usuwanie substancji organicznej i częściowe usuwanie związków azotu

1980 - adaptacja osadu czynnego do usuwania związków biogenych



**Osad czynny ma już prawie sto lat,
ale jego możliwości nie zostały jeszcze do końca poznane.**



Ogólna liczba bakterii w osadzie szacowana jest
od $10^9/\text{cm}^3$ do $10^{10}/\text{cm}^3$ (Limpijakom i wsp.2004)

Po zastosowaniu po technik niehodowlanych
z wykorzystaniem barwników epifluorescencyjnych
liczba bakterii w kłaczkach osadu
szacowana jest na do $10 \times 10^{10}/\text{g}$
z czego 80 % to komórki aktywne

Frakcja mikroorganizmów stanowi 5-20 % kłaczką
reszta to substancje koloidalne



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

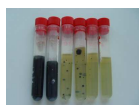
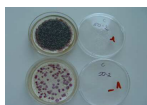
Laboratorium Biotechnologii Środowiska Pracownia Mikrobiologiczna



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Laboratorium Biotechnologii Środowiska Pracownia Mikrobiologiczna

Techniki tradycyjne hodowlane



Phoenix System
(BD Biosciences, USA),

biochemiczna identyfikacja
i ocena antybiotykooporności
szczepów bakteryjnych



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

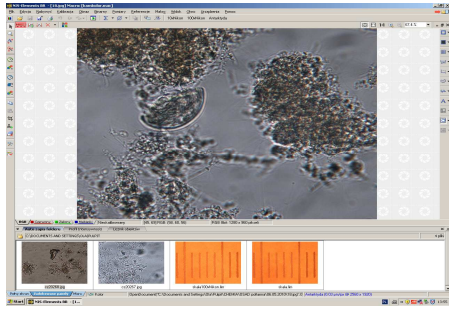
Laboratorium Biotechnologii Środowiska Pracownia Mikrobiologiczna



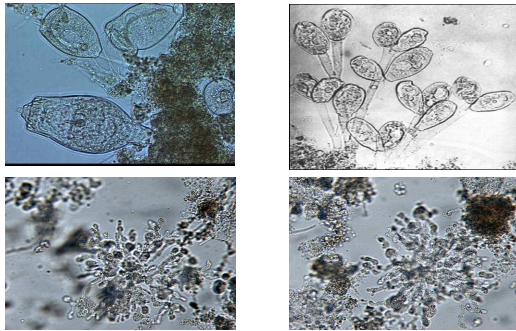
metody mikroskopowe



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

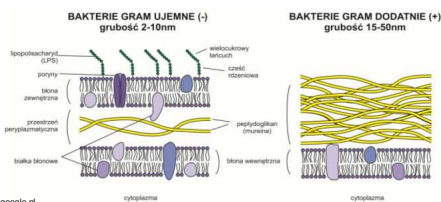


Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

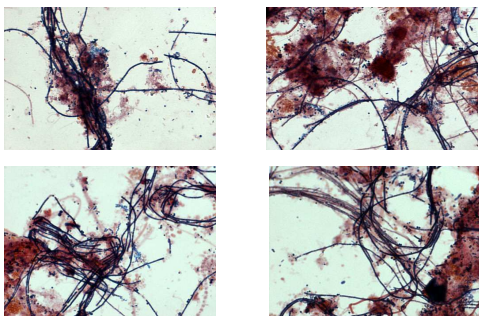
Barwienie metodą Grama



bakterie barwią się
na kolor ciemnofioletowy, prawie czarny, określamy jako **Gram-dodatnie** lub (Gram +),
bakterie odbarwiające się na kolor czerwony, określamy jako **Gram-ujemne** lub (Gram -),

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Barwienie metodą Grama

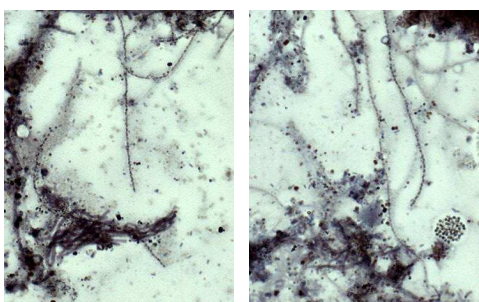


INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA I REGIONALNA

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Barwienie metodą Neissera - odróżnienie bakterii poli-P



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA I REGIONALNA

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Techniki tradycyjne
(obserwacje w mikroskopie jasnego pola i techniki hodowlane)
pozwoliły na opracowanie modelowego zespołu mikroorganizmów.

Jednak ten opis okazał się nieadekwatny do dynamiki metabolizmu
zespołu mikroorganizmów występujących oczyszczalniach

INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA I REGIONALNA

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

grupa organizmów	procent poznanych gatunków
bakterie	<0,5%
grzyby	4,8 %
glony	10 %
rośliny	84 %
owady	12 %
kregowce	90 %

środowisko	procent gatunków identyfikowalnych metodą hodowlaną
wody morskie	0,001 – 0,1 %
wody słodkie	0,25 %
osad czynny	1 - 15 %
gleba	0,3 %

Źródło:
Editor of Nature
Microbial Reviews,
lipiec 2010.



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Znajomość ekologii zespołu mikroorganizmów jest konieczna
do wyjaśnienia czynników wpływających na efektywność i stabilność
biocenozy biologicznej oczyszczalni ścieków
oraz do rozwoju strategii umożliwiających
właściwe wykorzystanie procesów technologicznych.



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Wprowadzenie w latach 90-tych technik molekularnych
umożliwiło określenie składu oraz dynamiki metabolicznej
zespołu mikroorganizmów występujących w osadzie czynnym.

Nie bez znaczenia jest również możliwość analizy
roli kluczowych dominantów,
prowadzących różne typy procesów metabolicznych.



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Techniki hodowlane wskazywały na dominację w osadzie czynnym bakterii należących do *Gamaproteobakterii*, stosunkowo rzadko izolowano bakterie należące do *Betaproteobakterii* (*Acidovorax*, *Alicycigenes* i *Comamonas*), a pojedyncze izolaty z grupy Gramdodatnich należały do *Arthrobacter*, *Microbacterium* i *Mycobacterium*.

Stosowane obecnie analizy wykorzystujące techniki molekularne wykazują natomiast, iż w osadzie czynnym dominują bakterie należące do *Betaproteobakterii*



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

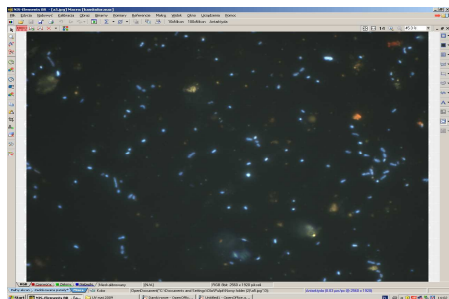
Barwienie DAPI

Określenie liczebności i biomasy komórek bakteryjnych
barwienie DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol)



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Barwienie DAPI



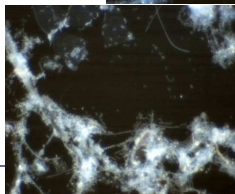
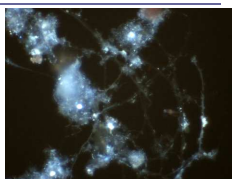
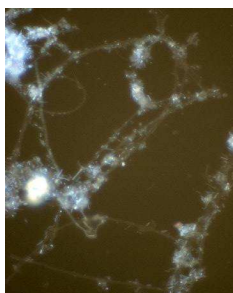
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Barwienie DAPI



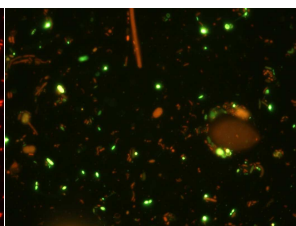
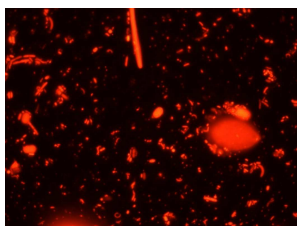
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Barwienie DAPI



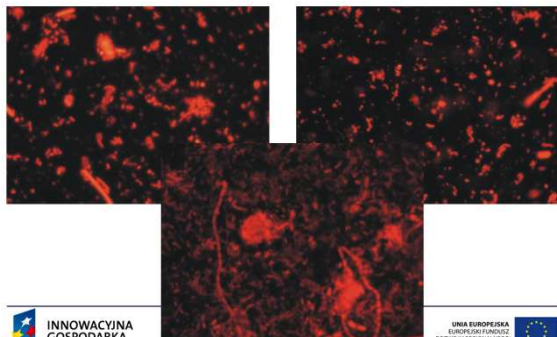
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Określenie aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych
barwienie BacLight viability kit staining (Live/Dead -L/D))



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Określenie aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych

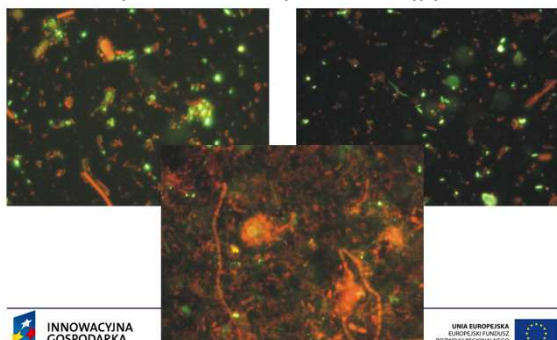


INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Określenie aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych

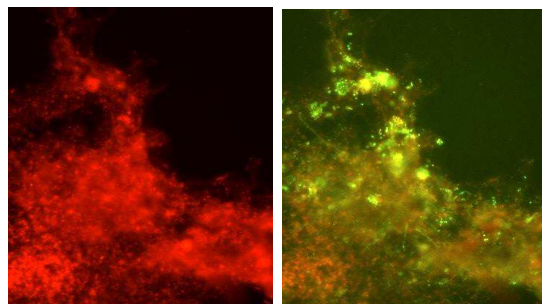


INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Określenie aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych

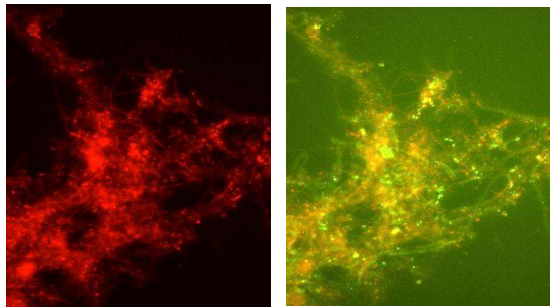


INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Określenie aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych



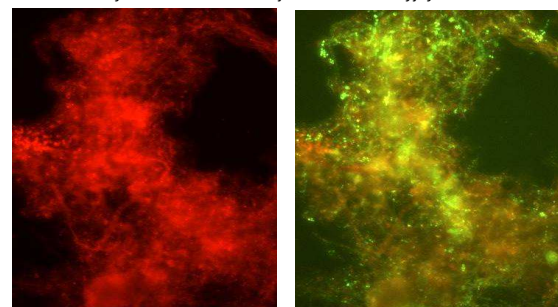
INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA INNOWACJI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Określenie aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych



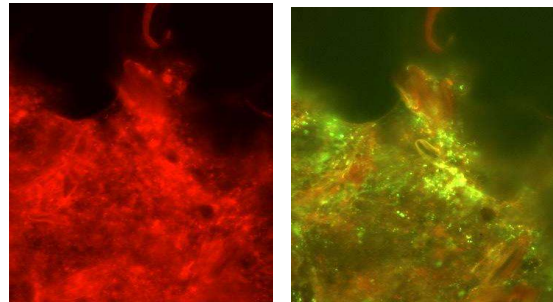
INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA INNOWACJI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Określenie aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych



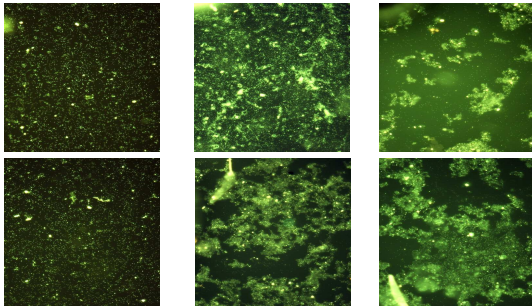
INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA INNOWACJI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

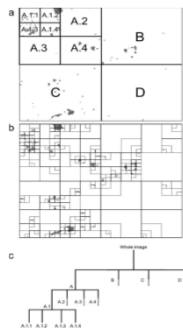


Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Barwienie cząstek wirusowych (Sybr Gold II)



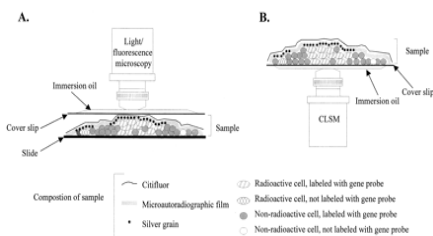
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Quantification
of uncultured microorganisms
by fluorescence microscopy
and digital image analysis

Daims H. & Wagner M., Appl Microbiol Biotechnol, 2007

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Źródło: www.google.pl

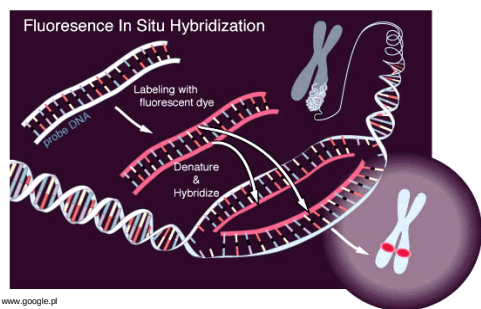
Fluorescencyjna Hybrydyzacja In Situ (FISH)

technika służąca do wykrywania określonej sekwencji DNA za pomocą komplementarnych sond znakowanych fluorochromami.

W celu analizy badanego materiału konieczne jest użycie mikroskopii fluorescencyjnej.

Popularne znaczniki fluorescencyjne:

Znacznik	maksymalne wzbudzenie / emisja (długości fali)	Kolor
Cy3	552 nm / 565 nm	Czerwony
Cy5	649 nm / 670 nm	Niebieski
FLUOS	494 nm / 523 nm	Zielony
DAPI	350 nm / 456 nm	Niebieski
SYBR Green	494 nm / 520 nm	Zielony



Źródło: www.google.pl

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

	inv. DAPI	FITC	SpO	TR	Cy5	DEAC	profile	MCB pattern
#2								
der (2)								

Źródło: www.google.pl

INNOWACYJNA GOSPODARKA NISZCZONA PRZEMISŁOWOŚĆ

UNIA EUROPEJSKA EUROPEJSKI FUNDUSZ ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Źródło: www.google.pl

INNOWACYJNA GOSPODARKA NISZCZONA PRZEMISŁOWOŚĆ

UNIA EUROPEJSKA EUROPEJSKI FUNDUSZ ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

SPECTRAL KARYOTYPING

Normal Human Chromosomes

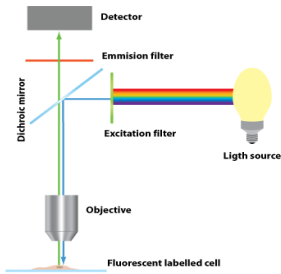
Chromosomes from Human Cancers

Źródło: www.google.pl

INNOWACYJNA GOSPODARKA NISZCZONA PRZEMISŁOWOŚĆ

UNIA EUROPEJSKA EUROPEJSKI FUNDUSZ ROZWOJU REGIONALNEGO

Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

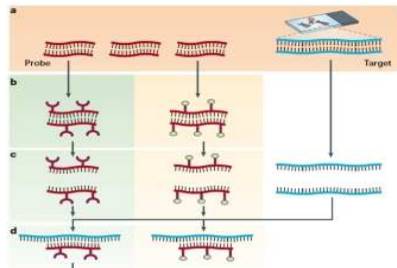


Źródło: Amann R. i wsp. Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

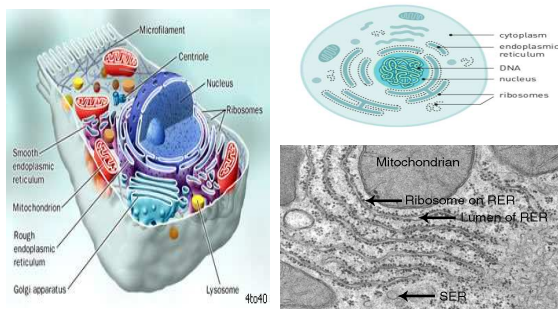
Fluorescencyjna Hybrydyzacja In Situ



Źródło: Amann R. i wsp. Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen

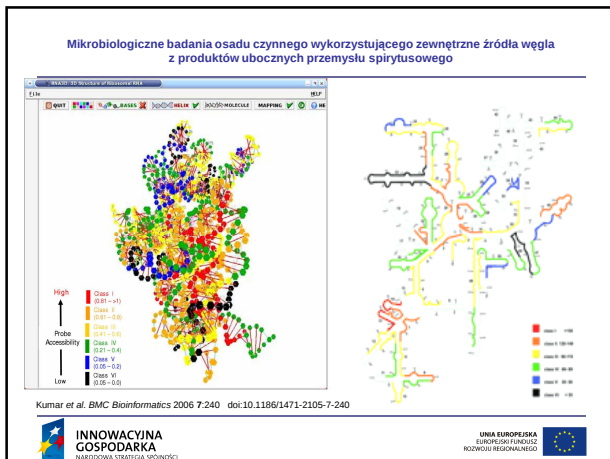


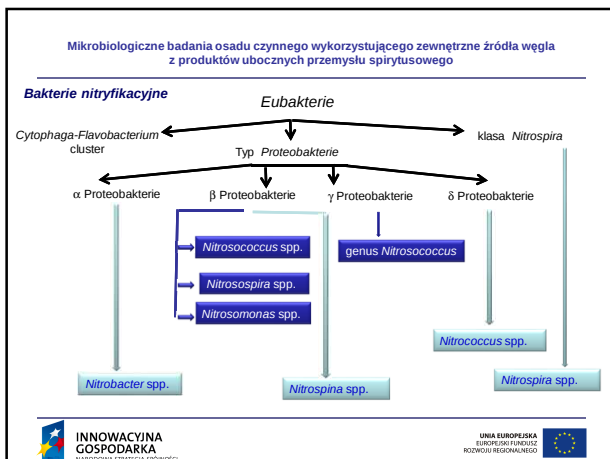
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

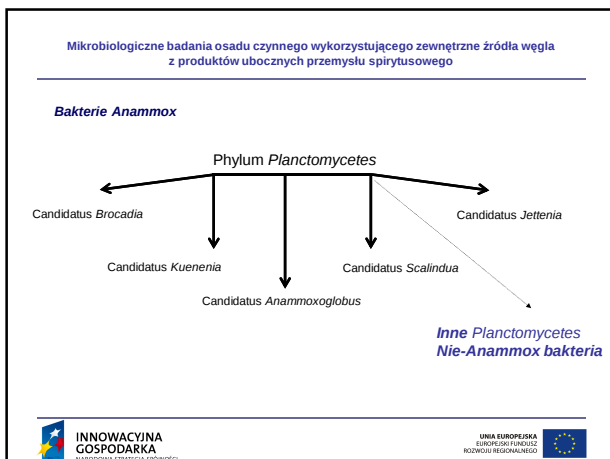


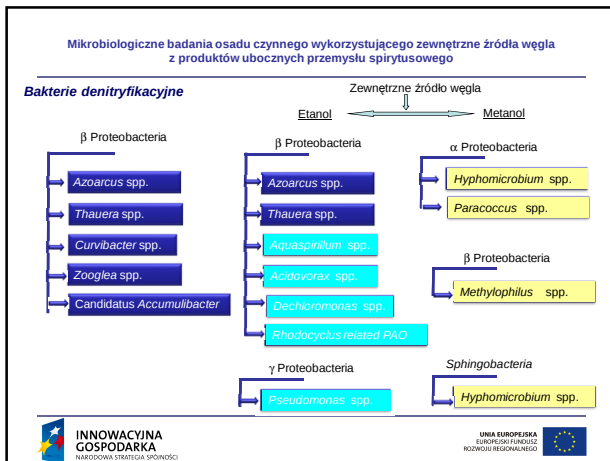
Źródło: www.google.pl

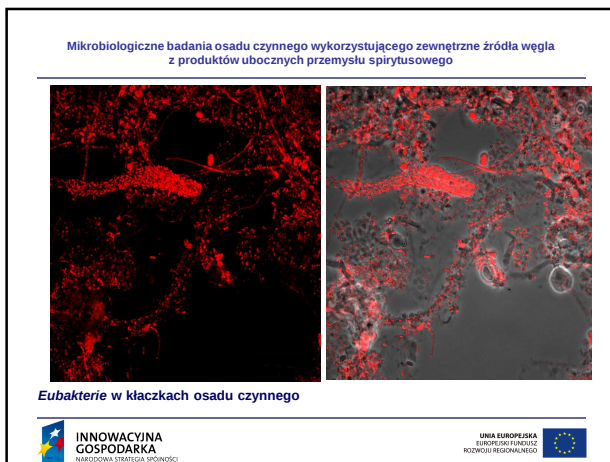


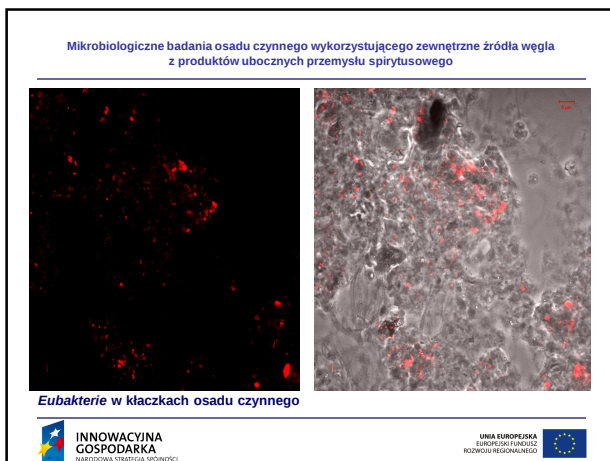




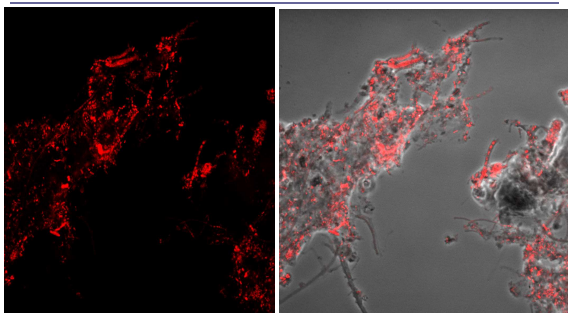








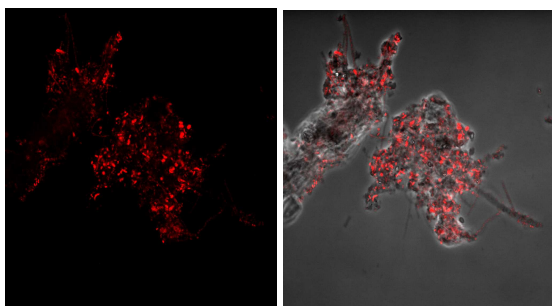
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Eubakterie w kłaczkach osadu czynnego (zewnętrzne źródło węgla – etanol)



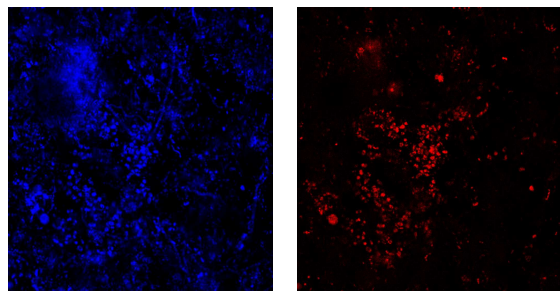
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Eubakterie w kłaczkach osadu czynnego (zewnętrzne źródło węgla – oleje fuzlowe)



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

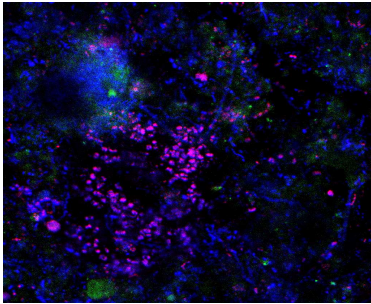


Eubakterie w kłaczkach osadu czynnego

Bakterie denitryfikacyjne - *Thauera* spp.



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Eubakterie i bakterie denitryfikacyjne - *Thauera* spp. (zewnętrzne źródło węgla – oleje fuzlowe)

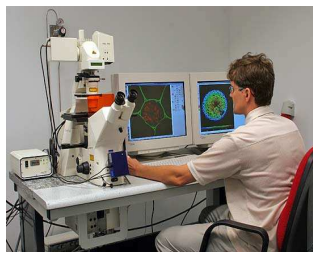
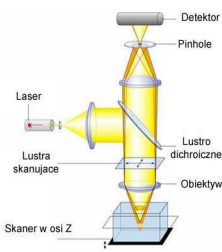


INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA DZIAŁALNOŚĆ

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Źródło: www.google.pl

Mikroskop konfokalny

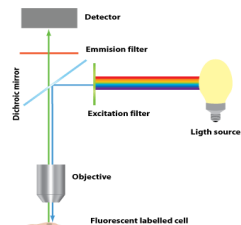


INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA DZIAŁALNOŚĆ

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Źródło: www.google.pl

Mikroskop fluorescencyjny



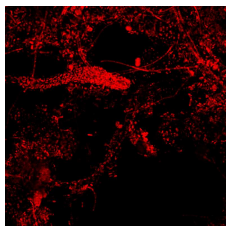
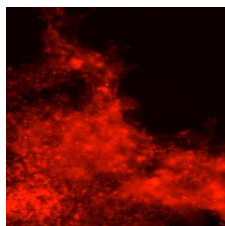
INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA DZIAŁALNOŚĆ

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Eubakterie
w kłaczkach
osadu czynnego



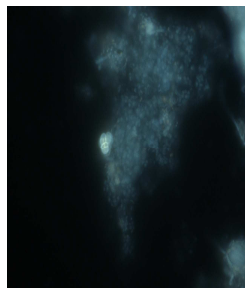
obraz w mikroskopie:

fluorescencyjnym

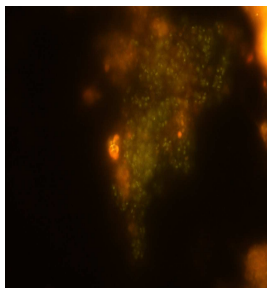
konfokalnym



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Kłaczek osadu czynnego barwiony DAPI



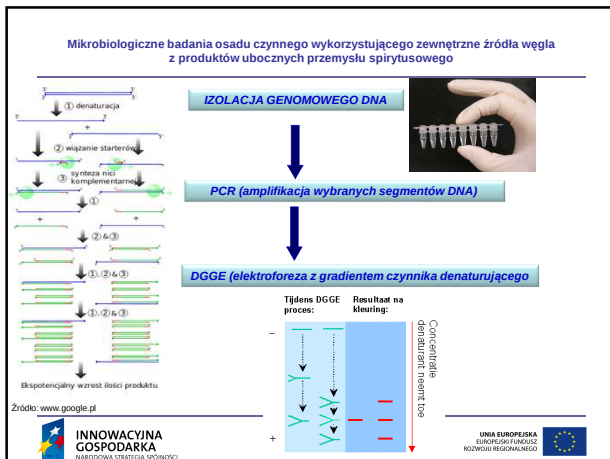
Bakterie PAO w kłaczkach osadu czynnego

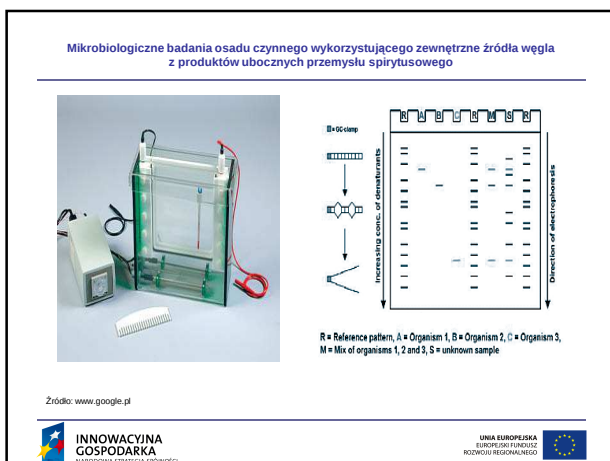


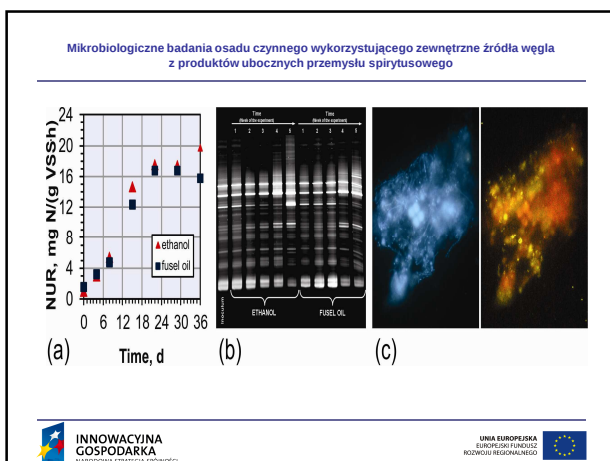
Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Analiza zróżnicowania gatunkowego bakterii osadu czynnego
metodą PCR-DGGE



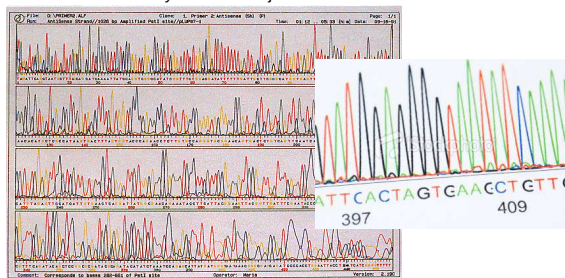






Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Wyniki sekwencjonowania



Źródło: www.google.pl



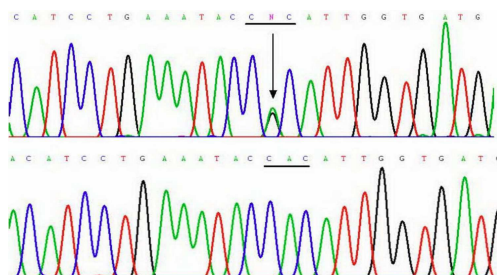
INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA ROZWOJU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego

Porównywanie sekwencji



Źródło: www.google.pl

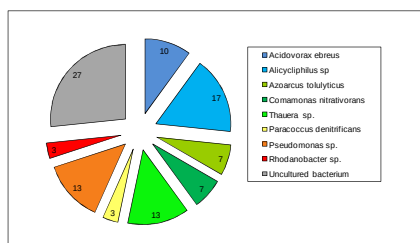


INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA ROZWOJU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Mikrobiologiczne badania osadu czynnego wykorzystującego zewnętrzne źródła węgla
z produktów ubocznych przemysłu spirytusowego



Metoda PCR-DGGE - różnicowanie gatunkowe bakterii osadu czynnego
(zewnętrzne źródło węgla - oleje fuzlowe)



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA ROZWOJU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Podsumowanie

Członkowie zespołu badawczego

