

WYKORZYSTANIE METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ W CELU OCENY JAKOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ POWIETRZA WOKÓŁ OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW KOMUNALNYCH

Grzegorz PASTERNAK, Piotr JADCZYK, Barbara KOŁWZAN
Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska, ul. Wybrzeże
Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław; Piotr.jadczyk@pwr.wroc.pl

STRESZCZENIE

Zakres oddziaływania oczyszczalni ścieków bytowo-gospodarczych na środowisko obejmuje emisję bioaerozoli, które stanowić mogą zagrożenie dla ludności oraz zwierząt, korzystających z terenów przyległych. Określenie uciążliwości, ustalenie jej skali oraz źródła może być trudne z wykorzystaniem klasycznych metod mikrobiologicznych, zwłaszcza jeśli na danym terenie znajdować się może więcej niż jeden emitent. W niniejszym artykule przedstawiono przykład wykorzystania metod biologii molekularnej w celu określenia zagrożenia oraz źródła jego pochodzenia. Wykorzystanie tych metod umożliwiło identyfikację drobnoustrojów oraz wyznaczenie ich tzw. molekularnych odcisków palców, pomocnych przy określeniu pochodzenia szczepów.

1. Wstęp

Obiekty związane z gospodarką komunalną są częstym źródłem uciążliwości zapachowej na terenach wokół danego obiektu. Wraz z odorami, których powstawanie związane jest z aktywnością metaboliczną drobnoustrojów, do powietrza dostają się znaczne ilości tzw. bioaerozoli. Bioaerozol zawierać może wirusy, bakterie, grzyby, ich zarodniki oraz formy przetrwalne. Występowanie bioaerozolu na terenach zaludnionych wiązać się może z ryzykiem zakażeń oraz zwiększoną zachorowalnością na choroby o podłożu mikrobiologicznym. Ponadto, dość powszechnym zjawiskiem jest występowanie alergii u osób narażonych na działanie bioaerozolu [1].

W przypadku oczyszczalni ścieków komunalnych, głównym emitentem bioaerozolu są komory osadu czynnego, w których ścieki poddawane są napowietrzaniu. W zależności od warunków meteorologicznych i przeżywalności drobnoustrojów w powietrzu, ich komórki transportowane mogą być na znaczne odległości od źródła emisji. Systematyczna kontrola mikrobiologicznej jakości powietrza wokół oczyszczalni może być pomocna w ocenie wpływu oczyszczalni na środowisko. Niemniej jednak, w przypadku występowania większej ilości źródeł emisji na danym obszarze, ustalenie który z nich jest przyczyną złej jakości powietrza, jest problematyczne z wykorzystaniem klasycznych metod mikrobiologicznych. Podobnie, stwierdzenie czy wyizolowane z powietrza szczepy mikroorganizmów należą do gatunków chorobotwórczych wymaga identyfikacji, której dokonanie z wykorzystaniem klasycznych testów biochemicznych jest obciążone ryzykiem błędów.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było określenie przynależności taksonomicznej szczepów bakteryjnych, wyizolowanych z powietrza wokół oczyszczalni ścieków bytowo-gospodarczych, a także określenie możliwości wykorzystania metod biologii molekularnej do kontroli jakości mikrobiologicznej powietrza.

2. Materiały i metody

Szczepy, poddane identyfikacji oraz charakterystyce, zostały wyizolowane z powietrza wokół oczyszczalni ścieków bytowo-gospodarczych. Szczepy pozyskano w ramach analizy jakości mikrobiologicznej powietrza, z wykorzystaniem metody sedimentacyjnej Kocha. Izolację przeprowadzono dla kolonii bakteryjnych namnożonych na podłożu King B (ISO 16266). Wyizolowane mikroorganizmy przechowywane były na słupkach agarowych (agar odżywczy wzbogacony glukozą).

Wyizolowane szczepy, pochodzące ze świeżej hodowli, poddane zostały izolacji genomowego DNA. Kwasy nukleinowe wyizolowane zostały z wykorzystaniem zestawu do izolacji DNA (Eurx, Polska). Wyizolowane DNA oczyszczone zostało na kolumnach krzemionkowych, poddane analizie ilościowej metodą spektrofotometryczną [2], a następnie posłużyło jako matryca do reakcji PCR. Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem standardowych starterów dla podjednostki 16S rRNA. Elektroforezę, oczyszczanie produktów, sekwencjonowanie oraz analizę sekwencji przeprowadzono zgodnie z metodologią opisaną przez Pasternaka i in. [3].

W podobny sposób wyznaczono tzw. molekularny odcisk palca. Wyizolowane kwasy nukleinowe posłużyły jako matryca do przeprowadzenia reakcji PCR, z wykorzystaniem starterów komplementarnych do odcinka pomiędzy podjednostkami 16S oraz 23S rRNA. Uzyskane produkty PCR analizowane były poprzez rozdział elektroforetyczny oraz oprogramowanie do analizy obrazu Jmicrovision oraz ImageJ.

3. Wyniki

W wyniku przeprowadzonej analizy jakości mikrobiologicznej powietrza pozyskano 9 szczepów bakteryjnych różniących się morfologicznie. Identyfikacja oraz charakterystyka szczepów przeprowadzona i omówiona została na przykładzie szczepów pozyskanych z wybranego podłoża (King B).

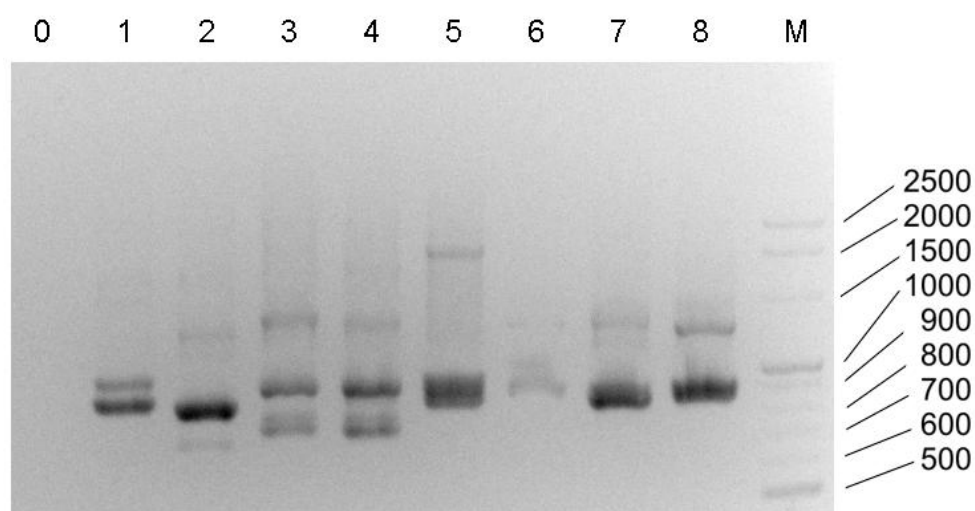
W wyniku reakcji PCR otrzymano produkt o wielkości 1400 pz. Wyniki analizy sekwencji genów kodujących podjednostkę 16S rRNA zostały zestawione w tabeli 1. Zdecydowana większość izolatów zaklasyfikowana została do rodzaju *Pseudomonas*. Szczepy 5.1 oraz 7.1 zostały zaklasyfikowane do rodzaju *Pantoea*. Spośród wszystkich wyizolowanych szczepów, w przypadku jednego wartość zbieżności sekwencji była stosunkowo niska w porównaniu do najbliższego spokrewnionego szczepu. Podobieństwo sekwencji z najbliższym spokrewnionym szczepem *Pantoea agglomerans* (NCBI) wynosiło 96%. Wartość na tym poziomie umożliwia jednak klasyfikację rodzajową szczepu 5.1, w związku z czym został przypisany do rodzaju *Pantoea*. W przypadku szczepów 11.1, 12.1 12.2, 4.1 oraz 7.1 wyniki porównywania sekwencji umożliwiły klasyfikację szczepów jako *P. moraviensis*, *P. psychrotolerans*, *P. psychrotolerans*, *P. putida* oraz *Pantoea agglomerans*. Według starszej klasyfikacji gatunek *Pantoea agglomerans* klasyfikowany był jako *Enterobacter agglomerans*.

Przeprowadzona w obrębie rejonu RIS reakcja PCR umożliwiła wyznaczenie tzw. molekularnych odcisków palca poszczególnych szczepów. Wyniki elektroforetycznego rozdziału produktów elektroforezy przedstawione zostały na rys. 1. Wszystkie z analizowanych szczepów wykazywały heterogeniczność operonu RIS. Zbliżone wzory uzyskano dla szczepów 5.1 oraz 7.1, co sugeruje, że szczepy te należą do tego samego gatunku. W pozostałych przypadkach, w wyniku przeprowadzonego rozdziału produktów PCR uzyskano odmienne wzory dla każdego ze szczepów.

Tabela 1. Wyniki identyfikacji wybranych mikroorganizmów wyizolowanych z powietrza wokół oczyszczalni ścieków komunalnych.
Wyniki uzyskano poprzez sekwencjonowanie odcinka kodującego 16S rRNA

Nazwa szczepu	Najbliższy krewny	Wartość max ident., %
11.1	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	98
12.1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	98
12.2	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	98
3.1	<i>Pseudomonas graminis</i>	97
4.1	<i>Pseudomonas putida</i>	98
5.1	<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Enterobacter agglomerans</i>)	96
7.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	98
9.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	97

Uzyskane wyniki identyfikacji oraz charakterystyka szczepów wyizolowanych ze środowiska pozwalają przypuszczać, że wyizolowane mikroorganizmy wyposażone były w odmienny zestaw cech, nawet jeśli należały do tego samego gatunku.



Rys. 1. Molekularny odcisk palca szczepów wyizolowanych z powietrza wokół oczyszczalni ścieków komunalnych: 0 – kontrola, 1 – szczep 3.1, 2 – szczep 4.1, 3 – szczep 5.1, 4 – szczep 7.1, 5 – szczep 9.1, 6 – szczep 12.1, 7 – szczep 11.1, 8 – szczep 12.2, M – marker 100 bp+.

4. Dyskusja

Wśród wszystkich mikroorganizmów, których sekwencja 16S rRNA wykazywała największe podobieństwo do sekwencji szczepów poddanych identyfikacji, nie wykryto mikroorganizmów patogennych. Najbliżej spokrewnione szczepy należały do bakterii glebowych [4] oraz bakterii wyizolowanych z filofery [5]. Niemniej jednak właściwości oraz doniesienia literaturowe dotyczące niektórych gatunków wskazują na ich pochodzenie związane ze ściekami komunalnymi. Gatunek *P. psychrotolerans* został po raz pierwszy wyizolowany w klinice dla zwierząt [6]. Z kolei gatunek *Pantoea agglomerans*, znany wcześniej jako *Enterobacter agglomerans* izolowany był często z odchodów ludzkich oraz

zwierzęcych. Jest on patogenem oportunistycznym, mogąym wywoływać zakażenia ran, układu krwionośnego czy moczowego [7].

Przynależność szczepów do wymienionych gatunków mogłaby wskazywać na ich pochodzenie związane z emisją bioaerozolu przez urządzenia stosowane do oczyszczania ścieków. Pamiętać należy jednak, że z uwagi na stosunkowo niskie (< 99%) wartości podobieństwa sekwencji, przynależność gatunkową wybranych szczepów należałoby potwierdzić również innymi metodami.

Wykorzystanie techniki tzw. molekularnego odcisku palca umożliwiło ich charakterystykę w stopniu wystarczającym, aby określić ich pochodzenie, gdyby podobne badania przeprowadzone zostały dla próbek ścieków pobranych na terenie oczyszczalni.

5. Wnioski

Identyfikacja szczepów poprzez sekwencjonowanie odcinka 16S rRNA wykazała, że wśród wyizolowanych z powietrza wokół oczyszczalni mikroorganizmów, znajdować się mogły bakterie pochodzące ze ścieków poddawanych procesom oczyszczania.

Wśród mikroorganizmów poddanych identyfikacji prawdopodobnie wykryto gatunek o charakterze patogenu oportunistycznego.

Wyznaczenie molekularnych odcisków palca, umożliwić może identyfikację źródła skażenia środowiska mikroorganizmami.

Literatura

1. Douwes J., Thorne P., Pearce N., Heederik D.: Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Annals of Occupational Hygiene* 2003, 47, 187-200.
2. Glasel J.A.: Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995, 18, 62-63.
3. Pasternak G., Rutkowski P., Sliwka E., Kolwzan B., Rybak J.: Broad Coal Tar Biodegradative Potential of *Rhodococcus erythropolis* B10 Strain Isolated from Former Gasworks Site. *Water Air and Soil Pollution* 2008, 214, 599-608.
4. Tvrzova L., Schumann P., Sproer C., Sedlacek I., Pacova Z., Sedo O., Zdrahal Z., Steffen M. and Lang E.: *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006, 56, 2657-2663.
5. Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., Erler W., Burghardt J., Seyfarth W.: A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999, 49, 297-308.
6. Trujillo M.E., Velazquez E., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Rivas R., Mateos P.F., Martinez-Molina E.: *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004, 54, 1459-1463.
7. Gavini F.R.A.N., Mergaert J.O.R.I., Beji A.M.O.R., Mielcarek C.H.R.I., Izard D.A.N.I., Kersters K.A.R.E. and de Ley J.O.Z.E.: Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1989, 39, 337-345.