

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”, CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE

CATEDRA DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ

Andreea-Ionela Miclea

TEZĂ DE DOCTORAT

-Rezumat-

**Identificarea prin metode moleculare a comunității de
microorganisme de la nivelul unui bioreactor anammox pentru
tratarea fluidelor reziduale bogate în compuși toxici cu azot**

Conducător științific

Prof. Dr. Nicolae Dragoș

**Cluj-Napoca
2010**

CUPRINS

INTRODUCERE.....	3
OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	5
MATERIALE ȘI METODE	5
MATERIAL BIOLOGIC.....	5
METODE MOLECULARE	5
REZULTATE	9
IDENTIFICAREA MICROORGANISMELOR ANAMMOX PRIN AMPLIFICAREA PARȚIALĂ A GENEI PENTRU ARNr 16S URMATĂ DE SECVENȚARE	9
IDENTIFICAREA BACTERIILOR ANAMMOX PRIN FISH	10
IDENTIFICAREA MEMBRILOR NON-ANAMMOX AI COMUNITĂȚII MICROBIENE DIN BIOREACTORUL CU MEMBRANĂ ..	14
HIBRIDAREA <i>IN SITU</i> CU FLUORESCENȚĂ CONFIRMĂ PREZENȚA BACTERIILOR NON-ANAMMOX ÎN CADRUL COMUNITĂȚII DIN BIOREACTOR	18
EVALUAREA PREZENȚEI BACTERIILOR NON-ANAMMOX ÎN BIOREACTOARELE DE CONTROL	22
DISCUȚII	25
OBTINEREA UNEI CULTURI ÎN SUSPENSIE.....	25
SCHIMBUL DE POPULAȚII ANAMMOX.....	26
DIVERSITATEA BACTERIILOR NON-ANAMMOX DIN BRM	28
CONCLUZII GENERALE	32
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	33

Cuvinte cheie: anammox, PCR-DGGE, FISH, filogenie

Introducere

Evoluția omului și a societății a determinat acumularea formelor reactive ale azotului în ecosisteme și atmosferă, din cauza intensificării activităților antropogene. Agricultură intensivă, industrializarea și urbanizarea agresivă au condus la creșterea impactului asupra calității apei, solului și aerului, asupra biodiversității ecosistemelor acvatice și implicit asupra gradului de acoperire a necesităților de apă. Se estimează că activitatea umană contribuie cu 30%-45% din totalitatea de azot fixat la nivel global, în ecosisteme terestre și acvatice.

Poluarea cu compuși toxici pe bază de azot determină acidifierea solurilor și a apei, reducerea biodiversității ecosistemelor terestre și acvatice, reducerea stratului de ozon, modificări ale climei, afectând în mod direct sănătatea umană (Galloway și colab., 2003).

Reziduurile rezultate în urma activității umane constituie o sursă considerabilă de forme reactive ale azotului, iar fluxurile de ape reziduale vor crește ca urmare a creșterii populației și a urbanizării intense. Astfel, tratarea apelor reziduale permite reducerea poluării prin eliberarea unei concentrații mai mici de azot reactiv în mediu.

Îndepărtarea azotului din apele reziduale se realizează în mod convențional prin procese microbiene, precum nitrificarea și denitrificarea. Eficiența acestor procese depinde de diferențierea spațială și temporală datorită condițiilor diferite de desfășurare a procesului și a microorganismelor implicate. Reacția de nitrificare necesită un consum mare de oxigen iar denitrificarea necesită o sursă externă de donori de electroni (precum metanol, acetat, etanol, lactat, glucoză) deoarece carbonul organic prezent în mod natural în apele uzate este limitat (Van Dongen și colab., 2001). Limitările impuse de acest sistem sunt, deci, legate de necesitatea mare de oxigen, controlul pH-ului, lipsa retenției, limitarea totalului de carbon organic (Jetten și colab., 2002).

Prin descoperirea (Mulder și colab., 1995) procesului anammox (anaerobic ammonium oxidation, oxidarea anaerobă a azotului amoniacal) și a naturii microbiologice a acestuia (van de Graaf și colab., 1996), s-a identificat o metodă de tratare alternativă celei convenționale, mai eficientă și mai puțin costisitoare. Procesul anammox reprezintă oxidarea azotului amoniacal la azot gazos, în condiții anaerobe, având nitritul ca acceptor de electroni. Anammox fiind un proces autotrof, nu necesită adaos de CBO pentru a se realiza denitrificarea (van de Graaf și colab., 1996), reducând costurile de achiziționare a donorigilor de electroni. Dacă anammox este

combinat cu un pas inițial de nitrificare, doar o parte din $\text{NH}_4^+\text{-N}$ trebuie nitrificat la NO_2^- în timp ce bacteriile anammox ar combina restul de azot amoniacal cu nitritul pentru a forma N_2 gazos, reducându-se astfel cantitatea de O_2 și înjumătățindu-se costurile de aerare pentru reacția de nitrificare (Jetten și colab., 2002).

Deși microorganismele anammox au fost inițial îmbogățite din sisteme de tratare a apelor reziduale (van de Graaf și colab., 1996, Strous și colab., 1999), prezența și activitatea lor nu este restricționată doar la nivelul acestor ecosisteme (Schmid și colab., 2003; Thamdrup și Dalsgaard, 2002; Dalsgaard și colab., 2003; Kuypers și colab., 2003). În context global, se presupune că activitatea anammox este responsabilă pentru 30-70% din cantitatea de N_2 produs la nivelul oceanelor (Devol, 2003).

Încadrate filogenetic în rândul filumului *Planctomycetes*, împărtășind caracteristici comune cu genurile cultivate, precum lipsa peptidoglicanului în peretele celular și compartimentalizare internă (Lindsay și colab., 2001), bacteriile anammox identificate până în prezent se grupează în patru genuri, toate cu titlul de „Candidatus”: *Brocadia* (Strous și colab., 1999), *Kuenenia* (Schmid și colab., 2000), *Anammoxoglobus* (Kartal și colab., 2007) și *Scalindua* (Schmid și colab., 2003). Deoarece diferitele genuri de microorganisme anammox rareori se întâlnesc în același sistem de tratare a apei reziduale sau cultură de îmbogățire, se pare că fiecare gen ocupă o nișă proprie, iar condițiile de mediu selectează doar unul dintre aceste genuri. De asemenea, distanțele filogenetice semnificative (sub 91%) dintre diferitele specii indică existența unor nișe ecologice distincte, dar încă necunoscute (Kartal și colab., 2007; Schmid și colab., 2003).

În studiul de față, prin folosirea unui bioreactor cu membrană, a fost obținută o cultură de îmbogățire cu un înalt nivel de puritate (97,6%), folosind un timp de retenție a solidelor de 12 zile (van der Star și colab., 2008). Scopul experimentului a fost identificarea microorganismelor din cultură prin utilizarea metodelor moleculare bazate pe gena pentru ARNr 16S (PCR, DGGE, FISH). Deoarece, până în prezent, nici una dintre speciile anammox identificate nu a fost obținută în cultură pură, este interesant de studiat membrii minoritari ai comunității din bioreactoarele în care se desfășoară procesul anammox și înțelegerea originii acestor populații (proveniența lor din inocul sau creșterea activă în condiții anammox).

Obiectivele tezei de doctorat

Obiectivul general: identificarea prin metode moleculare a membrilor comunității îmbogățite în bioreactorul cu membrană

Obiective specifice:

1. Identificarea membrilor anammox ai comunității și a gradului de puritate a culturii de îmbogățire
2. Obținerea unui profil al comunității non-anammox și stabilirea afilierii filogenetice a acestor microorganisme
3. Determinarea prezenței microorganismelor non-anammox în diferite tipuri de reactoare în care are sau nu are loc procesul anammox

Materiale și metode

Material biologic

Materialul biologic utilizat în cadrul acestui experiment a fost prelevat de la nivelul mai multor tipuri de reactoare, în care are loc procesul anammox sau în care activitatea anammox nu este prezentă (reprezentând controlul negativ). Detalii referitoare la reactoarele din care a fost prelevată biomasa sunt prezentate în tab. 1. De la nivelul bioreactorului cu membrană (BRM), biomasa a fost colectată de 2-3 ori/săptămână; pentru reactorul anammox la scară industrială, probele au fost prelevate de la nivelul compartimentului inferior al reactorului (punctul de colectare 2; van der Star și colab., 2007), săptămânal, pentru o perioadă de 10 săptămâni. Două probe adiționale au provenit din perioada de inițiere a reactorului (2005) iar pentru celelalte reactoare biomasa a fost prelevată o singură dată, într-un moment în care bioreactoarele erau în stare optimă de funcționare.

Metode moleculare

Extragerea ADN

Pentru extragerea ADN genomic din probele prelevate s-a folosit kitul UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA).

Tabel 1. Lista reactoarelor din care a fost prelevată biomasa pentru realizarea experimentelor

	Bioreactor/proces	Tip de reactor	Populația dominantă
	Bioreactor cu membrană	BRM	Brocadia/Kuenenia
Control pozitiv	Reactor anammox la scară industrială	UASB	Brocadia
	Reactor unic nitritare-anammox la scară industrială (CANON/OLAND/deamonificare)	BCB	Brocadia
	Reactor biologic cu funcționare discontinuă (la nivel de laborator)	SBR	Brocadia
Control negativ	Reactor biologic de nitrificare/denitrificare și îndepărtare a amestecului acetat/fosfat (la nivel de laborator)	SBR	Nd
	SHARON (la nivel de laborator)	Chemostat	AOB
	SHARON (la scară industrială)	-	AOB
	Reactor de nitrificare (la nivel de laborator)	SBR	AOB NOB

Amplificarea prin PCR

ADN extras a fost ulterior amplificat prin PCR folosind mai multe tipuri de amorse (tab. 2), specifice pentru planctomicete (în vederea identificării populației anammox) sau amorse generale/universale pentru bacterii (cu scopul de a identifica membrii non-anammox ai comunității). Pentru identificarea membrilor majoritari ai comunității din BRM, ADN extras din probele prelevate în zilele 1, 18, 52, 105, 262 și 331 a fost amplificat folosind perechile de amorse Pla-46F/907R(M) și Pla-46F/1392R.

Tabel 2. Amorse folosite pentru amplificarea parțială a genei pentru ARNr 16S

Nume	Specificitate	Secvență (5'-3')	Referințe bibliografice
Pla-46F	<i>Planctomycetes</i>	GGA TTA GGC ATG CAA GTC	Neef și colab. (1998)
907R(M)¹	<i>Bacteria</i>	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT1	Muyzer și colab. (1993)
1392R	Universal	ACG GGC GGT GTG TAC	Schaefer și Muyzer (2001)
341F (GC)²	<i>Bacteria</i>	CCT ACG GGA GGC ACG AG	Muyzer și colab. (1993)

¹M indică prezența în această poziție fie a unei adenine (A) fie a unei citozine (C)

²Clemă GC atașată la capătul 5' format din 40 de nucleotide (secvența: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3')

DGGE (Electroforeza în gel cu gradient de denaturanți)

Această metodă moleculară, bazată pe gena ce codifică ARNr 16S a fost utilizată pentru stabilirea structurii comunității non-anammox din BRM și reactoarele de control, precum și a dinamicii temporale a acestei comunități la nivelul BRM, pe toată durata experimentului. Pentru analiza prin DGGE a ampliconilor obținuți în urma PCR s-a folosit un gel de poliacrilamidă 6% (g/v). Inițial s-a folosit un gradient de denaturanți de 20%-60% (o soluție 100% denaturantă reprezintă un amestec de 7 M uree și 40% vol/vol formamidă) ce oferă o bună separare a fragmentelor obținute prin amplificarea cu această pereche de amorse (Muyzer și colab., 1993). Pentru amplificarea distanței ce separă fragmentele în gel, s-a folosit un gradient mai restrâns (35%-55% UF) ce facilitează, de asemenea, și excizarea benzilor în vederea secvențării. Electroforeza s-a realizat în tampon TAE (1x), la 60°C și un voltaj constant de 100V, timp de 16h. După electroforeză gelurile au fost incubate în soluție cu bromură de etidiu timp de 30 minute și apoi spălate în Milli-Q (30 min) și fotografiate folosind un sistem BioRad GelDoc.

După fotografiere, gelul a fost transferat pe transiluminator, iar benzile de interes au fost excizate și incubate peste noapte (la 4°C) în 50 μl apă ultrapură. ADN-ul a fost reamplificat folosind aceeași pereche de amorse și același protocol de „touchdown PCR”, după care s-a efectuat o nouă analiză DGGE. Condițiile de electroforeză au fost identice, iar ampliconii inițiali au fost migrați alături de produșii obținuți în urma re-amplificării pentru a verifica dacă într-adevăr banda excizată a fost „pură” (produșii excizați corespund unei singure benzi) și dacă banda de interes corespunde profilului inițial.

După re-amplificare, produșii PCR ce corespund benzii de interes sunt supuși electroforezei în gel de agaroză pentru a fi purificați pentru secvențare, folosind kitul QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germania).

Designul sondelor oligonucleotidice

Pe baza secvențelor obținute în urma amplificării prin PCR-DGGE au fost create sonde oligonucleotidice, folosind opțiunea PROBE DESIGN a programului ARB. Sondele (18 nucleotide, tab. 3) au fost sintetizate de o companie comercială (Thermo Fisher Scientific, Ulm, Germania) fiind etichetate fluorescent, la capătul 5', cu Cy3. Condițiile optime de hibridare au fost determinate prin testarea succesivă a diferite concentrații de formamidă în tamponul de hibridare. Hibridarea *in situ* s-a realizat simultan, folosind trei tipuri de sonde, etichetate cu

fluorocromi diferiți: sondele oligonucleotidice nou sintetizate (Cy3), AMX-820 (Fluos) și un amestec de sonde EUB (Cy5).

Hibridarea *in situ* cu fluorescență

În studiul de față, tehnica FISH a fost utilizată în principal pentru identificarea membrilor dominanți ai comunității din bioreactorul cu membrană și stabilirea gradului de puritate a culturii de îmbogățire. Pentru hibridarea *in situ* cu fluorescență probe prelevate din BRM (15 ml suspensie celulară) au fost fixate în paraformaldehidă, după care suspensia celulară este imobilizată pe lame microscopice, supusă hibridării cu sonde oligonucleotidice, spălării pentru îndepărtarea sondelor nehibridate și montării pentru vizualizare prin intermediul unui microscop cu epifluorescență (Zeiss Axioplan 2, Zeiss, Jena, Germany). Fixarea a avut loc în zilele 35, 64, 77, 149, 196 și 267. Sondele oligonucleotidice utilizate pentru hibridare sunt descrise în tab. 3.

În ziua 267, nivelul de îmbogățire a culturii anammox a fost estimat prin numărarea celulelor vizibile la microscop dar care nu au hibridat cu sonda AMX-820 (numărul celulelor non-anammox) iar acest număr a fost comparat cu numărul total al celulelor vizibile (anammox și non-anammox, ca. 10.000).

De asemenea, tehnica FISH a fost utilizată în acest studiu pentru a stabili dacă membri non-anammox ai comunității din BRM constituie o populație satelit pentru bacteriile anammox, pe baza sondelor oligonucleotidice create (sondele CHL) fiind confirmată/infirmată prezența microorganismelor non-anammox la nivelul bioreactoarelor de control.

Secvențarea și analiza comparativă a secvențelor

Prođușii PCR au fost purificați din gel folosind kitul QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germania). Prođușii purificați au fost secvențați de o companie comercială (BaseClear, Leiden, Olanda). Secvențele obținute au fost comparate cu secvențele din bazele de date publice folosind NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), după care au fost importate în programul ARB și aliniate folosind funcția de aliniere automată a programului (Ludwig și colab., 2004). Alinierea a fost corectată manual și a fost construit un arbore filogenetic folosind algoritmul Neighbor-Joining cu corectare Felsenstein (Saitou și Nei, 1987).

Tabel 3. Sonde oligonucleotidice folosite în hibridarea *in situ* cu fluorescență în cadrul acestui studiu.

Sonde oligonucleotidice	Organism țintă	Secvența (5'-3')	Referințe bibliografice
EUB I EUB II EUB III	<i>Bacteria</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Daims și colab. (1999)
AMX-820	<i>Kuenenia/Brocadia</i>	AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C	Schmid și colab. (2000)
KST-157	<i>Kuenenia</i>	GTT CCG ATT GCT CGA AAC	Schmid și colab. (2001)
PLA-46	<i>Planctomycetes</i>	GAC TTG CAT GCC TAA TCC	Neef și colab. (1998)
AMX-368	Bacterii anammox	CCT TTC GGG CAT TGC GAA	Schmid și colab. (2003)
CHL_408	Organisme necultivate înrudite cu membri filumului <i>Chlorobi</i>	GCT AAA AGC CCT TCG TCC	Miclea și colab., date nepublicate
CHL_485	Organisme necultivate înrudite cu membri filumului <i>Chlorobi</i>	GGG CTT CCT CTG AGC ATA	Miclea și colab., date nepublicate
CHL_730	Organisme necultivate înrudite cu membri filumului <i>Chlorobi</i>	TAT GGC CCA GAT GAC TGC	Miclea și colab., date nepublicate
CHL_834b	Organisme necultivate înrudite cu membri filumului <i>Chlorobi</i>	ACT GAC CCC TAT GGG ACC	Miclea și colab., date nepublicate

Rezultate

Identificarea microorganismelor anammox prin amplificarea parțială a genei pentru ARNr 16S urmată de secvențare

Amplificarea parțială a genei pentru ARNr 16S

Pentru primele 120 de zile de operare constantă a bioreactorului cu membrană, din probele de biomasă prelevate a fost extras ADN genomic, iar pentru a stabili identitatea și/sau diversitatea genetică a speciilor anammox prezente în BRM s-a amplificat parțial gena pentru ARNr 16S, folosind două perechi de amorse, Pla 46F-907R(M) și Pla46F-1392R. Din totalitatea probelor prelucrate, benzile corespunzătoare ampliconilor rezultați în urma amplificării ADN

genomic extras din biomasa prelevată în zilele 18 și 105 au fost extrase din gelul de agaroză 1%, iar produșii de amplificare au fost purificați pentru secvențare.

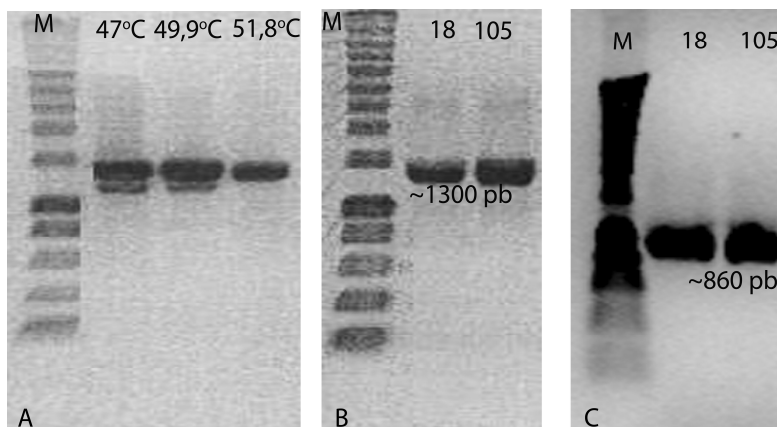


Figura 1. Amplificarea parțială a genei pentru ARNr 16S pentru identificarea bacteriilor anammox din BRM. (A) Stabilirea temperaturii optime de aliniere a amorșelor, prin PCR în gradient de temperatură. (B) Evidențierea prin electroforeză în gel de agaroză a ampliconilor obținuți prin PCR cu perechea de amorse Pla46F-1392. (C) Folosind perechea de amorse Pla46F-907(M) s-au amplificat fragmente de aproximativ 860 pb, pe baza ADN genomic extras în zilele 18 și 105.

Secvențarea și analiza comparativă a secvențelor

Secvența obținută pentru proba din ziua 18 prezintă similaritate mare (99%) cu specia *Candidatus „Brocadia” sp 40* (Kieling și colab., 2007), în timp ce secvența obținută pentru proba din ziua 105 prezintă similaritate mare (99%) cu o tulpină a speciei *Candidatus „Kuenenia stuttgartiensis”* (îmbogățită la Kolliken, Elveția, de către Egli și colab., 2001) și cu specia originală *Candidatus „Kuenenia stuttgartiensis”* (obținută în cultura de îmbogățire din Stuttgart, Germania, de către Schmid și colab., 2001; Strous și colab., 2001, Strous și colab., 2006).

Identificarea bacteriilor anammox prin FISH

Pentru biomasa fixată în ziua 35 (fig. 2), un număr mare de celule, dispuse în aglomerări dense, au fost marcate specific după hibridarea cu sonda AMX-820. În schimb, pentru sonda KST-157 nu a fost detectat semnal de hibridare. Hibridarea simultană a celulelor fixate cu sonda specifică pentru bacteriile anammox, AMX-820, și cu amestecul EUB338 este utilizată ca indicator al faptului că bacteriile implicate în oxidarea anaerobă a amoniului reprezintă populația

dominantă din bioreactorul cu membrană, acest fapt fiind evidențiat prin suprapunerea semnalelor de hibridare cu cele două sonde.

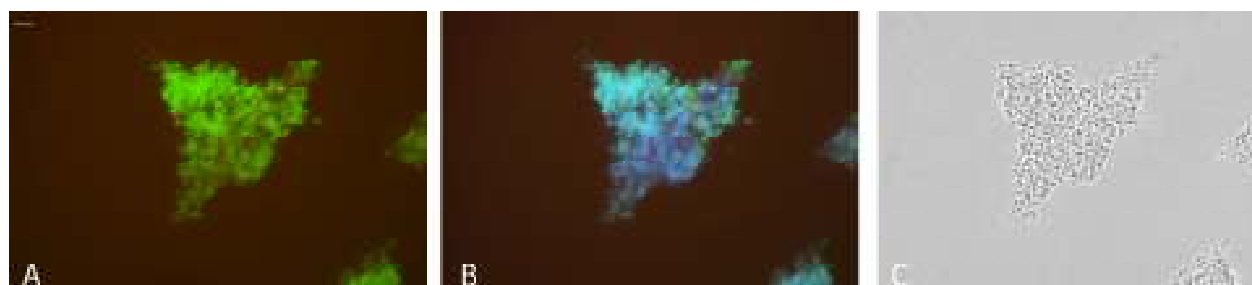


Figura 2. Populația anammox dominantă la patru săptămâni după inocularea bioreactorului cu membrană. (A) hibridarea *in situ* este pozitivă doar cu AMX-820 (verde) nu și cu KST-157 (roșu). (B) Imagine de suprapunere a sondelor oligonucleotidice KST-157, AMX-820 și EUB-338. (C) Vizualizarea prin microscopie în contrast de fază a biomasei anammox din BRM. Bara indică 10 μm . Mărire: x100

Hibridarea *in situ* pentru biomasa prelevată în ziua 64 (fig. 4) a confirmat rezultatele obținute prin amplificarea și secvențarea ADN extras din bioreactor, ARNr din celulele anammox hibridând specific atât cu proba AMX-820 cât și cu KST-157. Comparând imaginile de epifluorescență din zilele 35 (fig. 2) și 64 (fig. 4), se poate observa o diferență netă în abundență; inițial *Brocadia anammoxidans* a fost specia anammox dominantă, însă aceasta este ulterior înlocuită de *Kuenenia stuttgartiensis*. De asemenea, se poate observa morfologia cocoidă (cu diametru mediu de 1,5 μm) și un semnal de hibridare în formă de inel, caracteristic planctomicetelor (Neef și colab., 1998, Schmid și colab., 2000).

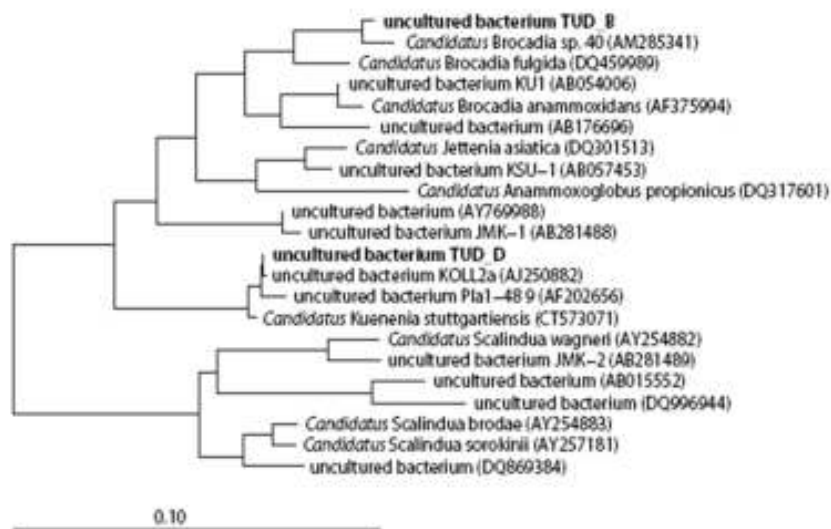


Figura 3. Arbore filogenetic construit pe baza pe secvențele aproape complete ale genei pentru ARNr 16S obținute de la organismele dominante din BRM. TUD_B este secvența obținută din biomasa prelevată în ziua 18, iar TUD_D în ziua 105. Secvența ADNr 16S a speciei *Thermotoga maritima* a fost folosită ca grup de comparație (outgroup). Bara indică 10% divergență.

S-a observat dispunerea diferită a celor două tipuri de bacterii anammox, în cultura de îmbogățire (fig. 4), astfel, semnal de hibridare cu AMX-820 vine de la celule dispuse sub formă de agregate celulare, în timp ce semnalul pozitiv de hibridare cu sonda KST-157 vine de la celule libere.

Astfel, la 64 de zile de funcționare în condiții stabile, la un TRS de 16 zile, a avut loc un schimb de populații, între două specii de bacterii anammox, iar hibridarea *in situ* cu fluorescență efectuată în ziua 77 (fig. 5), arată că specia *Kuenenia* devine dominantă, observându-se semnal de hibridare atât cu AMX-820 cât și cu KST-157 (semnal pozitiv de hibridare portocaliu, conferit de suprapunerea dintre cele două tipuri de fluorocromi).

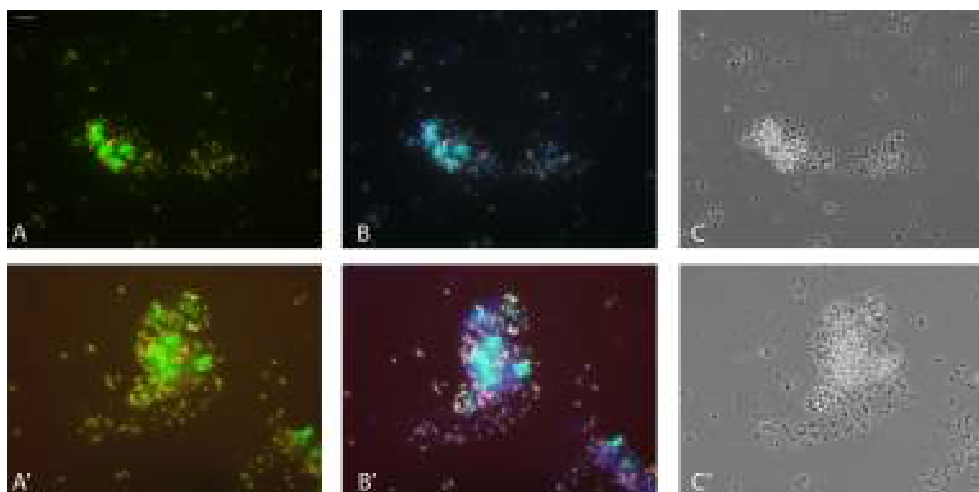


Figura 4. Evidențierea prin FISH a schimbului de populații anammox din BRM. Comunitatea anammox din bioreactorul cu membrană în ziua 64 a experimentului detectată prin FISH și microscopie în contrast de fază (C, C'). Imaginile A și A' prezintă schimbul de populații între *Brocadia* sp. (verde, hibridare doar cu AMX-820 etichetată cu Fluos) și *Kuenenia* sp. (portocaliu, hibridare și cu KST-157 etichetată cu Cy3). Imaginile B și B' prezintă suprapunerea dintre sondele utilizate (KST 157, AMX-820 și EUB 338 etichetată cu Cy5).

În ceea ce privește celelalte probe anammox-specifice utilizate, până în ziua 120 de operare stabilă a bioreactorului, nu au existat celule care să hibrideze cu AMX-820 fără să hibrideze cu Pla-46 și AMX-368, sugerând că, cel puțin în această perioadă, *Candidatus Brocadia* și *Candidatus Kuenenia* au fost singurele bacterii anammox din BRM.

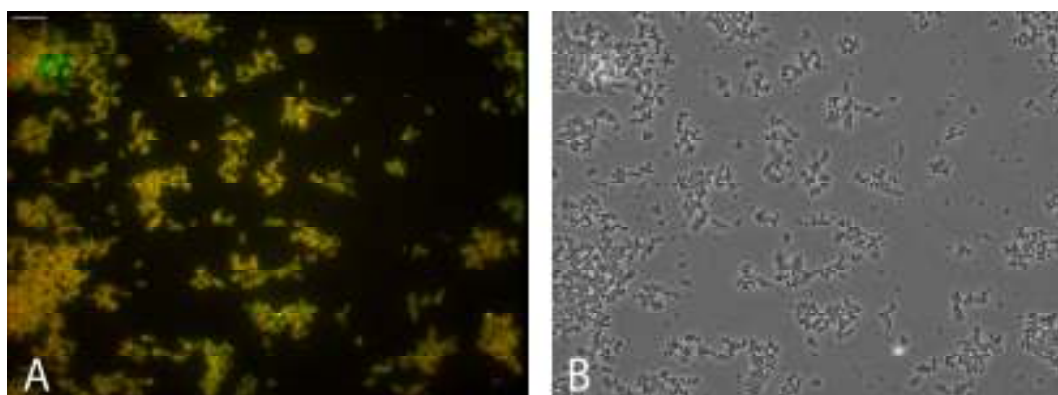


Figura 5. Hibridare *in situ* pentru evidențierea dinamicii temporale a comunității de bacterii anammox din bioreactorul cu membrană. (A) În ziua 77 s-a observat reducerea considerabilă a numărului de celule anammox ce hibridează cu AMX-820 (verde) și predominarea celulelor anammox libere din specia *Kuenenia*, ce hibridează specific cu AMX-820 și KST-157 (portocaliu). (B) Imagine de microscopie în contrast de fază arătând obținerea unei culturi în suspensie de *Kuenenia*. Bara indică 10 μm. Mărire: x100

Deoarece au fost obținute celule libere, în suspensie, prin numărarea celulelor care au hibridat cu proba oligonucleotidică AMX-820, specifică pentru „*Brocadia*” și „*Kuenenia*” a fost posibilă stabilirea nivelului de îmbogățire a culturii. În ziua 267, pe baza numărării a aproximativ 10,000 de celule, nivelul de îmbogățire a fost estimat la $97,6 \pm 0,2\%$ (van der Star și colab., 2008).

Identificarea membrilor non-anammox ai comunității microbiene din bioreactorul cu membrană

Amplificarea parțială a genei ARNr 16S, stabilirea profilului comunității non-anammox prin DGGE și analiza filogenetică

Prezența bacteriilor anammox în cultura de îmbogățire din BRM a putut fi detectată doar prin utilizarea unor amorse specifice, atât la nivel de gen cât și la nivel de specie; amplificarea parțială a genei ARNr 16S folosind perechea de amorse generale bacteriene 341F-GC/907RM (ce amplifică regiunea genei ARNr16S de la majoritatea bacteriilor, de la poziția 341 până la poziția 926, conform genomului *E. coli*) ar putea astfel permite identificarea microorganismelor non-anammox din cadrul comunității îmbogățite.

Evoluția comunității non-anammox în primele 120 de zile de funcționare a BRM a fost stabilită pe baza a zece probe colectate din bioreactor, în zilele 1, 10, 18, 28, 35, 52, 74, 83, 105, 114. În primele 75 de zile de operare în condiții stabile a bioreactorului cu membrană, timpul de retenție a solidelor (TRS) a fost menținut la 16 zile. Comunitatea non-anammox pare a fi formată din cel mult trei specii diferite, iar din această perioadă o singură bandă a fost excizată din gel (fig. 6, banda #1). În ziua 85, concentrația ionilor de Ca și Mg a fost scăzută cu 75%, iar compoziția mediului a fost modificată prin adăugarea de extract de drojdie (1mg/l, van der Star și colab., 2008).

Aceste modificări ale compoziției mediului culturii de îmbogățire pot fi detectate în profilul DGGE prin creșterea numărului de benzi, cel puțin 6 fiind vizibile (benzile #2, #3 și #4, #5, #6 au fost extrase pentru secvențare). Alte două benzi (#7, #8), provenind din proba de control, au fost excizate din gelul de poliacrilamidă, profilul electroforetic corespunzător acestor benzi fiind identic cu profilul din ziua 1 de operare a BRM.

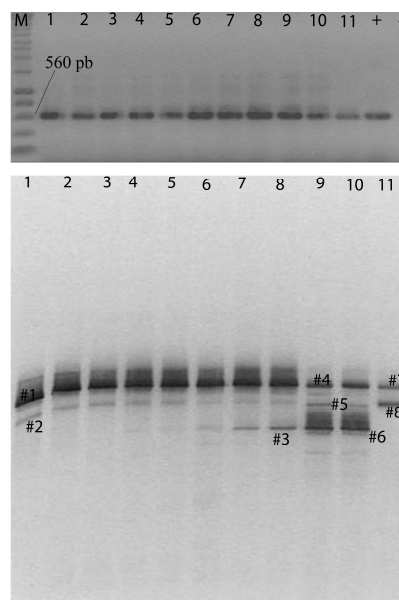


Figura 6. Structura comunității non-anammox din bioreactorul cu membrană în primele 120 de zile de operare. Rezultatul amplificării s-a evidențiat prin electroforeză în gel de agaroză și colorare în soluție cu bromură de etidiu (sus), iar structura comunității a fost analizată prin DGGE, pe gel de poliacrilamidă 6%, folosind un gradient de denaturanți de 20%-60% (jos). În primele 20 de zile (godeurile 1-3), nu se observă modificări în structura comunității, însă, începând cu ziua 28 (godeu 4) diversitatea comunității, caracterizată prin numărul de benzi se modifică, în ziua 114 (godeu 10) observându-se cel puțin 6 benzi pe gelul de poliacrilamidă. Proba 11 a fost prelevată ca și control pozitiv, dintr-un alt bioreactor anammox, în prezent ne-funcțional.

Analiza filogenetică a secvențelor benzilor DGGE din probele prelevate în primele 120 de zile de operare a bioreactorului cu membrană asociază microorganismele non-anammox din BRM unor microorganisme necultivate, aparținând genului *Chlorobium* (fig. 7), similaritatea de secvență fiind, însă, redusă (88%). După cum se observă și din profilul DGGE, benzile 1, 4 și 7 formează un cluster diferit de cel format de benzile 3, 6 și 8. Benzile ce corespund acestor secvențe au prezentat aceeași mobilitate electroforetică în gelul de poliacrilamidă, iar gruparea lor în clustere diferite în cadrul arborelui filogenetic sugerează că ar putea fi doi taxoni diferiți.

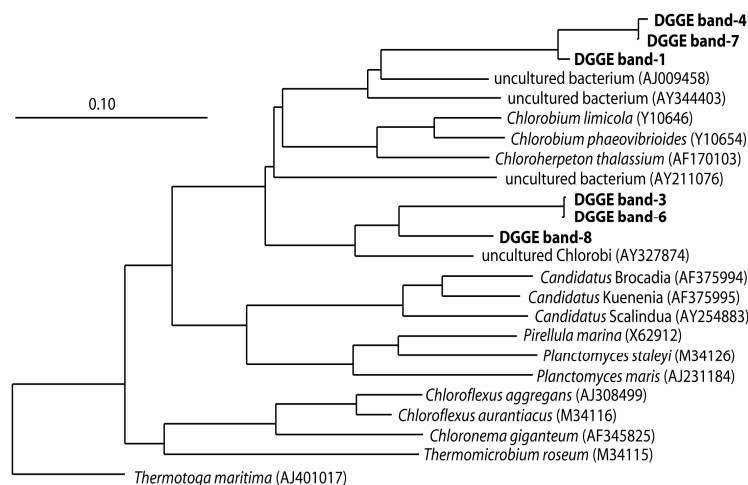


Figura 7. Poziția filogenetică a bacteriilor non-anammox din BRM pe baza analizei genei ARNr 16S. Arborele a fost construit folosind metoda Neighbor-Joining. Secvența ARNr 16S a speciei *Thermotoga maritima* a fost folosită ca outgroup. Bara indică 10% divergență.

Deoarece există posibilitatea ca aceste bacterii să provină din vasul în care este depozitat mediul nesterilizat, în ziua 140 de operare a bioreactorului, a fost colectată o probă din care a fost extras ADN genomic ce a fost amplificat cu aceeași pereche de amorse ca în cazul probelor din BRM. Lipsa similarității profilurilor DGGE ar putea sugera că prezența microorganismelor non-anammox din bioreactor nu se datorează creșterii acestora în vasul din care provine influentul. De asemenea, examinarea unei probe colectate din influent, prin microscopie optică, nu a evidențiat prezența unor specii aparținând filumului *Chlorobi*, deoarece nu au fost observate depuneri extracelulare de sulf, caracteristice acestor bacterii (Imhoff și colab., 2003).

Pentru a stabili dinamica temporală și modificările de structură ale comunității non-anammox din bioreactorul cu membrană, au fost analizate, prin PCR-DGGE, toate probele colectate pe parcursul funcționării BRM. Până în ziua 135, profilul obținut prin DGGE s-a menținut constant, evidențiindu-se trei fragmente dominante; în total, s-au observat cinci benzi cu intensitate variabilă, motiv pentru care unele nu au putut fi excizate pentru purificare și secvențare. Comparând patternul de migrare, se poate observa din fig. 8 modificarea drastică a compoziției comunității non-anammox la sfârșitul experimentului, cu dispariția a două dintre benzile inițiale principale, și apariția unui nou posibil taxon (#10).

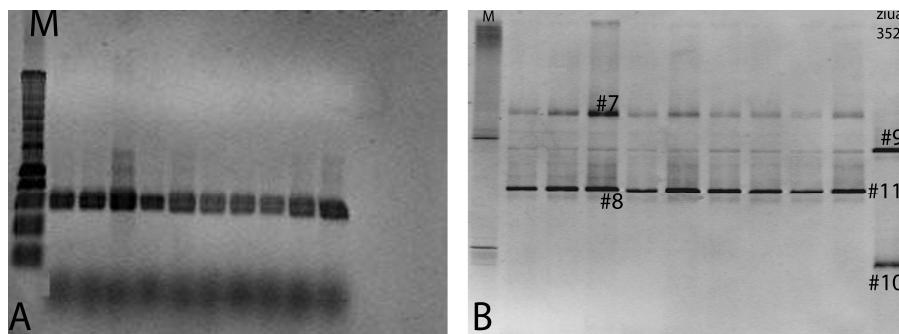


Figura 8. Amplificarea parțială a genei pentru ARNr 16S (A) și separarea electroforetică a fragmentelor prin DGGE (B) pentru probele prelevate din BRM (ziua 105- ziua 135). M reprezintă markerul de greutate moleculară iar numerele corespund benzilor excizate și purificate pentru secvențare.

În ziua 127, TRS (timpul de retenție a solidelor) a fost redus de la 16 zile la 12 zile. Profilul DGGE, după această modificare a condițiilor de cultivare, prezintă inițial reducerea numărului de benzi dominante ce corespund fragmentelor genei pentru ARNr 16S amplificate prin PCR. Menținerea TRS la 12 zile a părut să modifice structura comunității non-anammox, prin reducerea per ansamblu a numărului de benzi; însă, după 30 de zile de la aplicarea noului TRS, aceleași trei benzi dominante reapar pe gelul de poliacrilamidă (fig. 9).

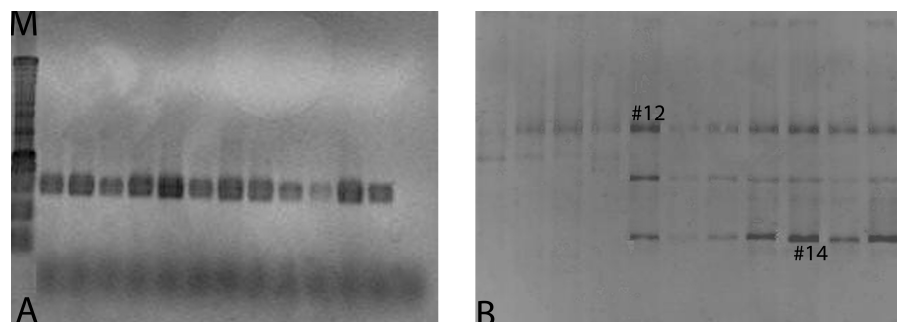


Figura 9. Producții de amplificare (A) și profilul DGGE corespunzător pentru probele prelevate din BRM (ziua 135- ziua 165) indicând evoluția comunității non-anammox după reducerea timpului de retenție a solidelor, de la 16 la 12 zile. #12, #14 reprezintă benzile excizate pentru purificare și secvențare.

În ziua 150, concentrația de azot amoniacal din influent a fost redusă de la 120 mM la 100 mM, iar această diminuare se manifestă prin dispariția unora dintre benzile dominante, și apariția de noi benzi, în partea inferioară a gradientului, cu cea mai mare concentrație de denaturanți (fig. 10). După ziua 150 au fost menținute aceleași condiții de cultivare, iar din ziua 220 și până la sfârșitul experimentului, compoziția comunității non-anammox se stabilizează.

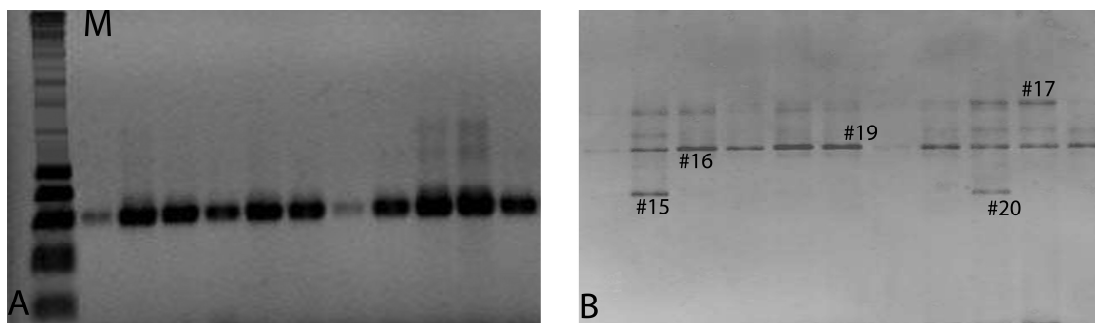


Figura 10. Evoluția comunității non-anammox din BRM după reducerea TRS și scăderea concentrației de N-NH_4^+ , din ziua 165 până în ziua 220. (A) Amplificarea parțială a ADN_r 16S; (B) Analiza DGGE a ampliconilor, indicând fragmentele ADN secvențate.

Analiza filogenetică a secvențelor indică o diversitate restrânsă a bacteriilor non-anammox din cultura de îmbogățire. Toate cele trei clusterse se grupează împreună cu secvențe ale unor bacterii necultivate, dar afiliate din punct de vedere filogenetic filumului *Chlorobi*. SB_MBR10 este înrudită cu acestea, însă nu se încadrează în nici unul dintre cele trei clusterse, similaritatea cu restul secvențelor din BRM fiind de maxim 87%.

Secvențele SB_MBR9, 15, 19, 22, 24 (cu 99% similaritate între ele) se grupează, de asemenea, cu secvențe ale unor microorganisme necultivate, afiliate filumului *Bacteroidetes*. SB_MBR 16 se grupează tot cu bacterii necultivate din acest filum, dar similaritatea cu secvențele din cluster este sub 85% (fig. 11B).

Hibridarea in situ cu fluorescență confirmă prezența bacteriilor non-anammox în cadrul comunității din bioreactor

Biomasa fixată pentru hibridarea *in situ* a fost colectată în ziua 63 de funcționare a bioreactorului; inițial, cu toate cele patru sonde a fost detectat semnal pozitiv în biomasa din bioreactor.

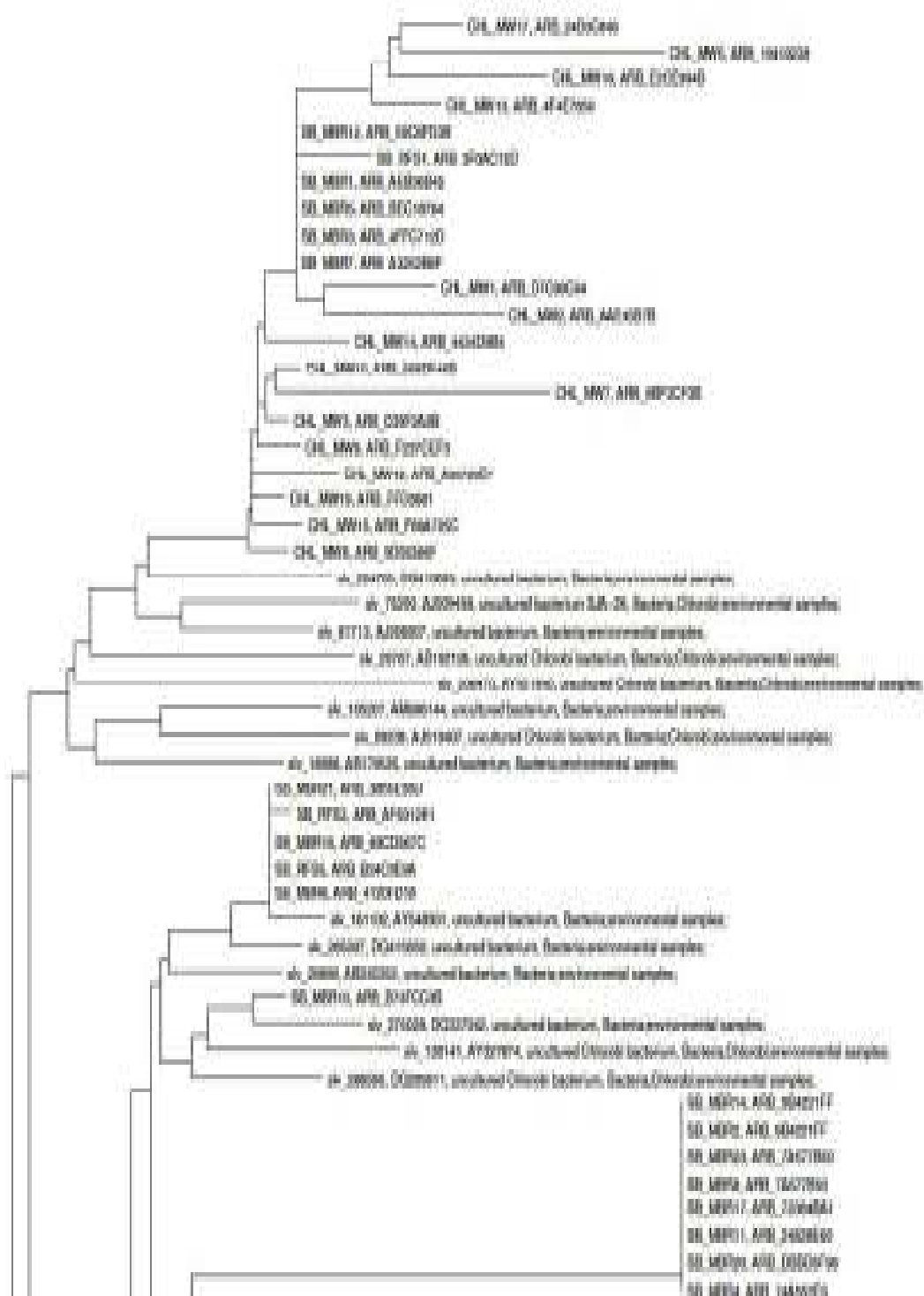


Figura 11A. Detaliu al arborelui filogenetic construit pe baza secvențelor parțiale ale ADNr 16S de la microorganismele non-anammox din BRM și reactorul anammox la scară industrială.

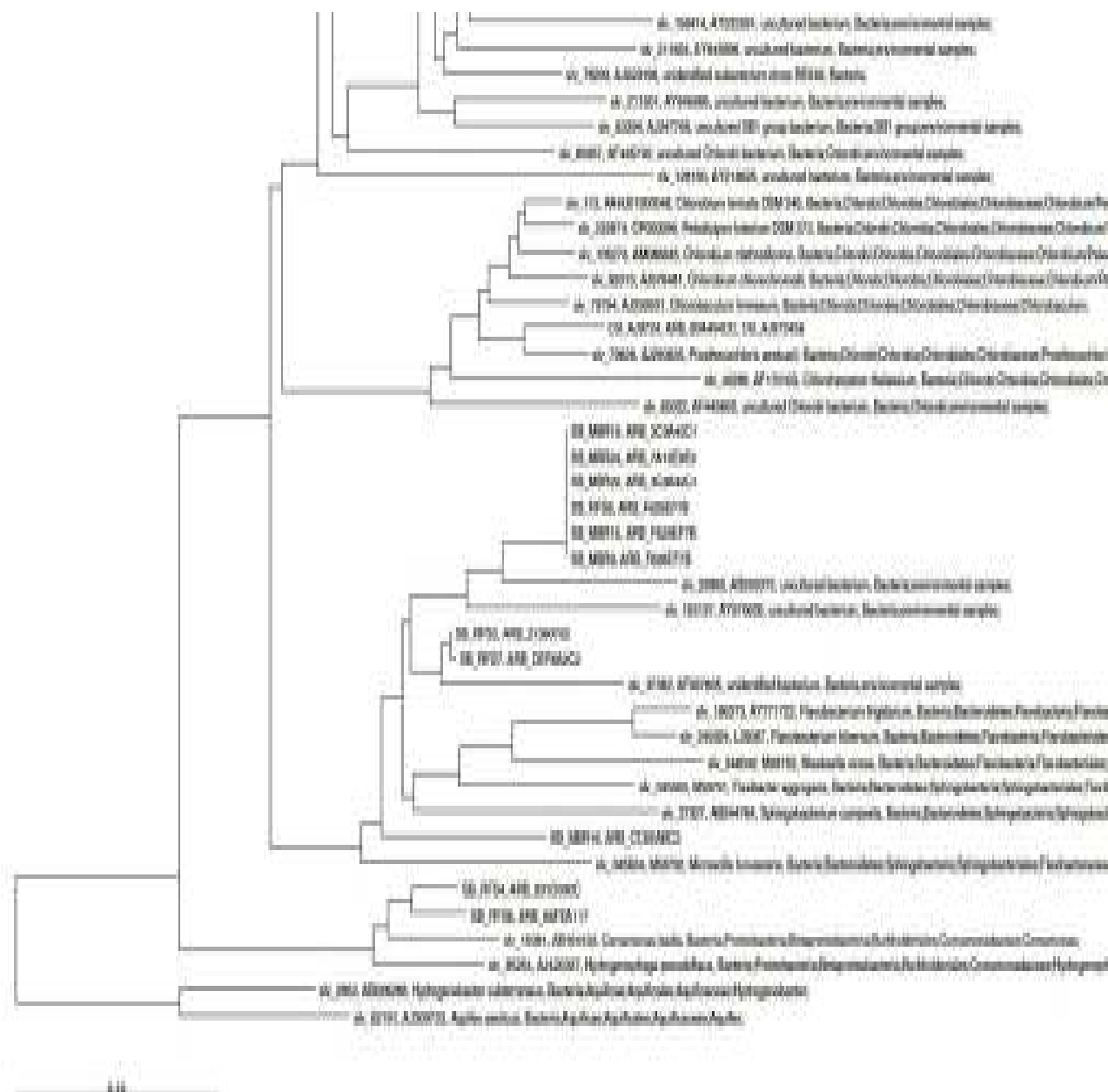


Figura 11B. Detaliu al arborelui filogenetic construit pe baza secvențelor parțiale ale ADNr 16S de la microorganismele non-anammox din BRM și reactorul anammox la scară industrială.



Figura 12. Proba CHL_408 hibridează cu bacteriile non-anammox din bioreactorul cu membrană. (A) Identificarea *in situ* a bacteriilor non-anammox, prin hibridare cu sonda CHL_408. (B) Hibridare *in situ* simultană, cu sondele CHL_408, etichetată cu Cy3 (semnal de hibridare roșu) și AMX-820 etichetată cu Fluos (semnal de hibridare verde). (C) Imagine de suprapunere a semnalelor de hibridare pentru sondele CHL_408, AMX-820, EUB-338 mix (etichetată cu Cy5). Bara indică 10 μ m. Mărire: x100.

Pentru toate sondele oligonucleotidice utilizate s-a obținut semnal de hibridare de intensitate maximă la o concentrație de 15% formamidă în tamponul de hibridare, demonstrând prezența în cultura de îmbogățire a unor microorganisme diferite de bacteriile anammox. Majoritatea celulelor etichetate specific după hibridarea cu sondele CHL se localizează în apropierea granulelor formate de celulele anammox, însă se pot observa și celule dispersate. Din punct de vedere morfologic, bacteriile non-anammox au formă de bastonaș, de dimensiuni reduse (maxim 0,5 μ m), comparativ cu dimensiunea celulelor anammox (aproximativ 1,5 μ m).

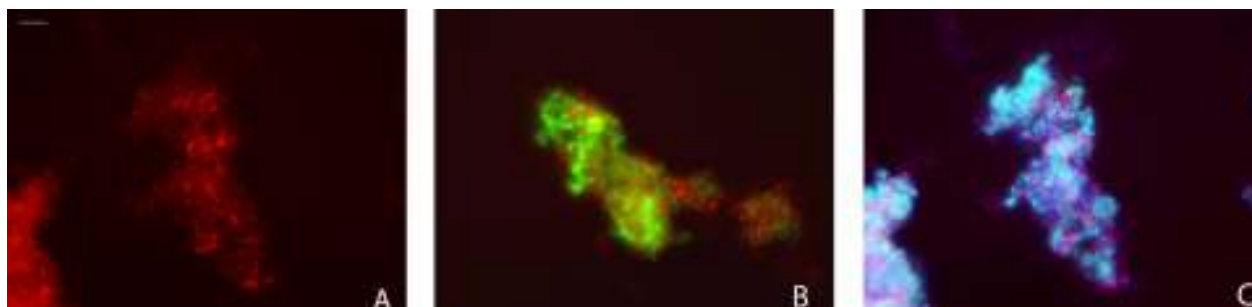


Figura 13. Identificarea *in situ* a bacteriilor non-anammox prin hibridare cu sonda CHL_485 (A). Hibridarea simultană a biomasei din bioreactorul cu membrană cu sonda CHL_485 etichetată cu Cy3 și sonda AMX-820 etichetată cu Fluos (B). Hibridare simultană cu sondele CHL_485, AMX-820, EUB 338 (Cy5-albastru) ce arată că majoritatea celulelor non-anammox se localizează în apropierea granulelor formate de bacteriile anammox (C). Bara indică 10 μ m. Mărire: x100.

După ziua 150 de operare a BRM, prezența acestor bacterii nu mai este semnalată prin hibridare *in situ*. Rezultatele obținute prin hibridare *in situ* cu fluorescență corespund cu analiza DGGE, și demonstrează modificarea compoziției comunității non-anammox, prin eliminarea din bioreactor a speciilor inițial identificate și apariția unor noi specii.

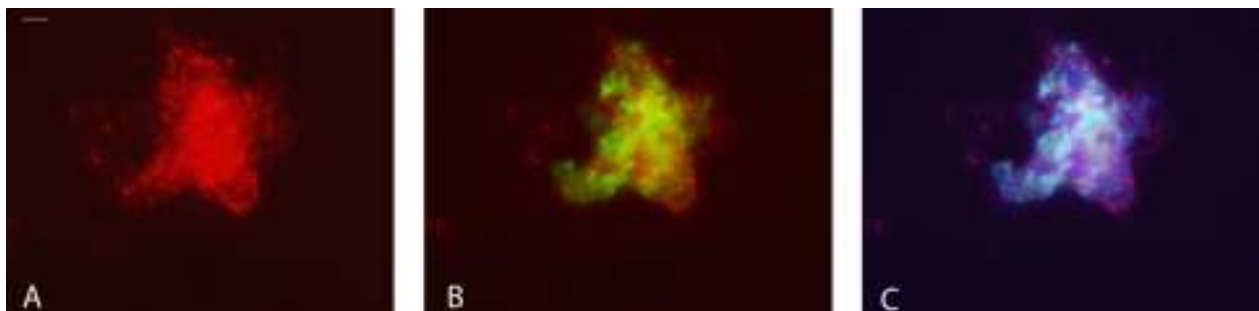


Figura 14. (A) Sonda oligonucleotidică CHL_730 prezintă semnal pozitiv de hibridare cu biomasa din BRM. (B) Hibridare simultană cu sondele CHL_730 (Cy3) și AMX-820 etichetată cu Fluos. (C) Comunitatea de bacterii din bioreactorul cu membrană, evidențiată prin hibridare *in situ* cu sondele CHL_730, AMX-820, EUB 338 (Cy5-albastru). Bara indică 10 μm . Mărire: x100.

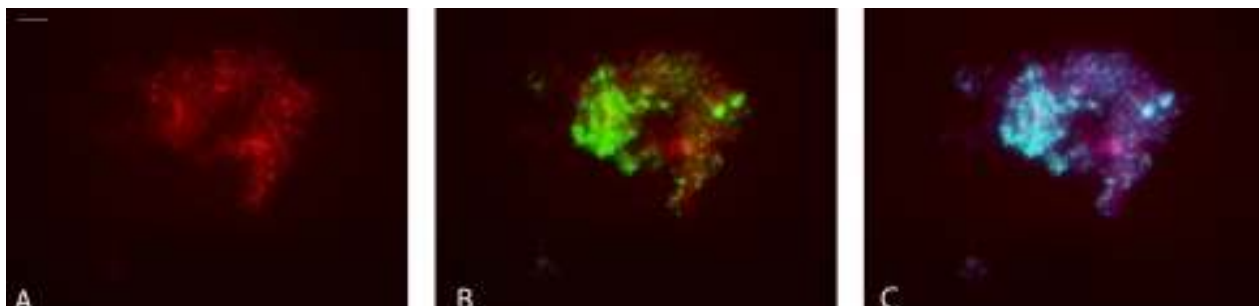


Figura 15. Hibridarea *in situ* a biomasei din BRM cu sonda CHL_834b etichetată cu Cy3 (A), sonda nou creată și AMX-820 etichetată cu Fluos (B) și suprapunerea semnalelor în hibridarea simultană cu sonda specifică pentru microorganismele non-anammox (semnal roșu), cu sonda specifică pentru bacteriile anammox (semnal verde) și amestecul de sonde EUB (semnal albastru) specifice pentru totalitatea bacteriilor (C). Bara indică 10 μm . Mărire: x100.

Evaluarea prezenței bacteriilor non-anammox în bioreactoarele de control

Reactorul anamox la scară industrială

Profilul DGGE bazat pe gena ce codifică ARNr 16S relevă o complexitate mult mai mare a comunității non-anammox din reactorul la scară industrială, fiind vizibile peste zece benzi; comunitatea non-anammox din reactor se caracterizează prin similaritatea patternurilor de migrare, atât în perioada inițială, cât și pe parcursul celor zece săptămâni din anul 2007. Analizând comparativ, prin gel electroforeză în gradient de denaturanți, compoziția comunităților non-anammox din probele din reactorul la scară industrială și bioreactorul cu membrană se poate observa prezența a cel puțin două fragmente cu aceeași mobilitate electroforetică (fig. 16, B). Secvențele obținute au fost incluse în analiza filogenetică (denumite SB_RFS), alături de cele

obținute prin amplificarea ADNr 16S din BRM (fig. 11A și B). Conform arborelui filogenetic, trei dintre secvențe se grupează cu secvențe din bioreactorul cu membrană, formând două clustere afiliate unor specii bacteriene necultivate, înrudite cu specii cultivate de *Chlorobium* sp.; alte trei secvențe se grupează cu secvențele din BRM afiliate grupului *Bacteroidetes* iar două secvențe sunt afiliate filumului *Proteobacteria*.

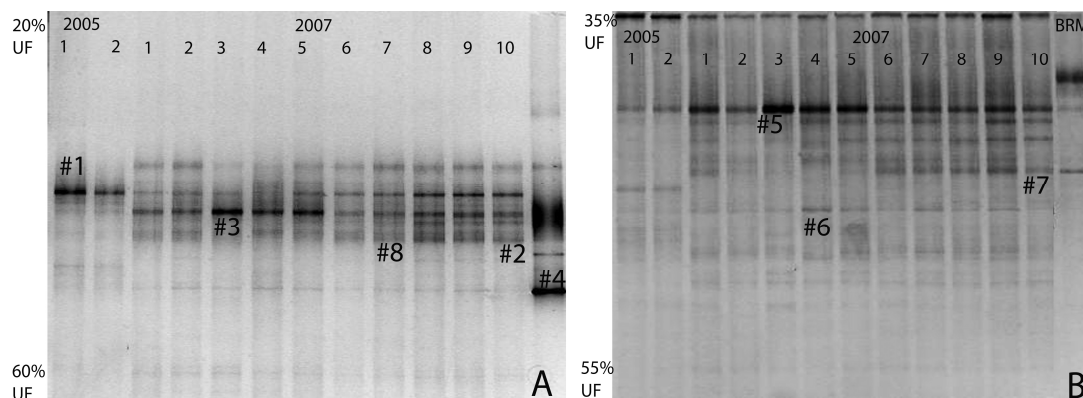


Figura 16. Diversitatea bacteriilor non-anammox din reactorul la scară industrială evidențiată prin DGGE. (A) Profilul comunității non-anammox în perioada de start up și la doi ani de funcționare a bioreactorului, folosind un gradient de denaturanți de 20%-60% uree și formamidă. (B) Structura comunității non-anammox din reactorul la scară industrială, în două perioade diferite, în comparație cu o probă de biomasă colectată din BRM (gradient de denaturanți de 35%-55%).

Pe baza probelor colectate, compoziția comunității de microorganisme din reactorul anammox la scară industrială a fost analizată și prin hibridare *in situ* cu fluorescență (fig 17). Dintre cele patru sonde oligonucleotidice, doar pentru CHL_485 nu s-a obținut semnal pozitiv de hibridare.

Structura comunității de microorganisme din celelalte reactoare de control

Profilul DGGE obținut a relevat prezența unor benzi comune, cu aceeași mobilitate electroforetică (fig. 18). Nici o secvență nu a fost, însă, obținută pe baza acestui profil.

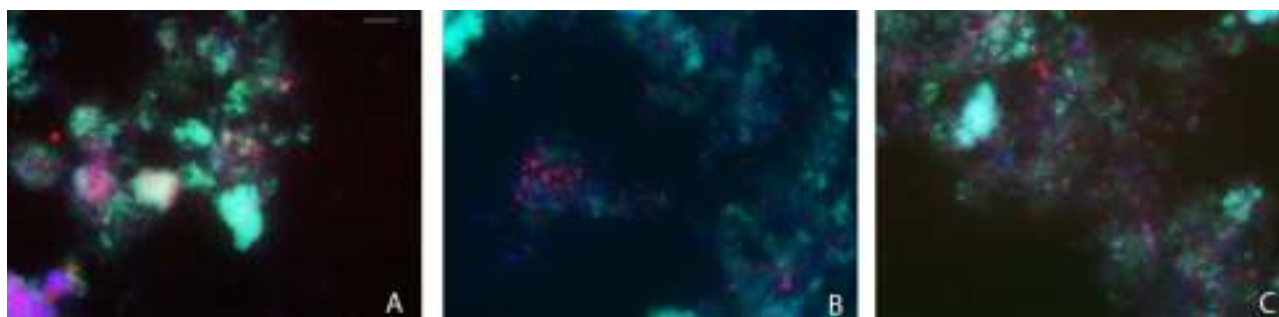


Figura 17. Populația non-anammox din bioreactorul cu membrană există și în reactorul anammox la scară industrială. Sondele CHL_408 (A), CHL_730 (B), CHL_834b (C) hibridează specific cu microorganisme din reactorul anammox la scară industrială; FISH s-a realizat prin hibridare simultană cu sondele CHL, AMX-820 (Fluos) și EUB mix (Cy5). Bara indică 10 μm; mărire: x100.

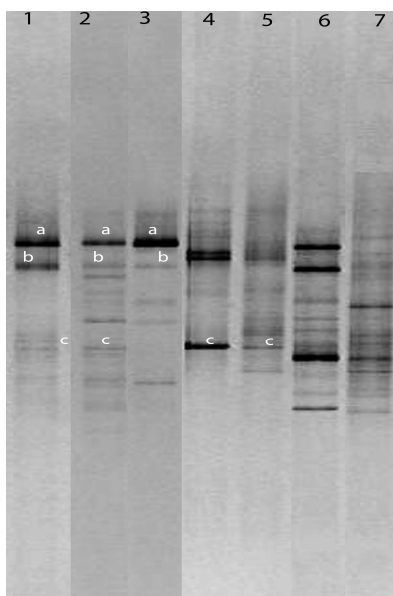


Figura 40. Profilul DGGE al probelor din reactoarele de control: reactorul anammox la scară industrială (godeu 1), reactorul unic nitritare-anammox la scară industrială (godeu 2), reactorul biologic cu funcționare discontinuă (godeu 3), reactorul biologic de nitrificare/denitrificare și îndepărtare acetat/fosfat (godeu 4), reactorul de nitrificare (godeu 5), reactoarele de tip SHARON, la scară industrială (godeu 6) și la nivel de laborator (godeu 7). a, b, c reprezintă patternuri de migrare comune.

Prezența bacteriilor non-anammox din bioreactorul cu membrană a fost semnalată și la nivelul reactoarelor de control, prin hibridare *in situ* (tab. 4).

Tabel 4. Rezultatul hibridării *in situ* cu fluorescență cu sondele CHL pentru toate reactoarele din care a fost colectată biomasa.

Bioreactor	Proces	Populația dominantă	Rezultatul hibridării			
			CHL_408	CHL_730	CHL_834b	CHL_485
Bioreactor cu membrană (MBR)	Anammox	<i>Brocadia</i> , <i>Kuenenia</i>	+	+	+	+
Reactor anammox (la scară industrială)	Anammox	<i>Brocadia</i>	+	+	+	–
Reactor unic nitrificare-anammox (la scară industrială)	CANON/ OLAND/ deamonificare	<i>Brocadia</i>	+	+	-	+
Reactor biologic cu funcționare discontinuă (la nivel de laborator)	Anammox	<i>Brocadia</i>	+	+	+	+
Reactor biologic cu funcționare discontinuă (la nivel de laborator)	Nitrificare/denitrificare și îndepărtare a amestecului acetat/fosfat		-	+	+	+
SHARON (la nivel de laborator)	Nitritare	AOB	-	-	-	-
SHARON (la scară industrială)	Nitritare	AOB	-	-	+	+
Reactor biologic cu funcționare discontinuă (la nivel de laborator)	Nitrificare	AOB	-	-	-	-

Discuții

Obținerea unei culturi în suspensie

Cu toate că bioreactorul cu membrană nu este un sistem de îmbogățire bazat pe sedimentare (van der Star și colab., 2008), agregate celulare anammox au fost prezente în primele 70 de zile ale experimentului. Folosirea unui inocul cu capacitate mare de sedimentare, precum nămolul activ granular (provenit de la reactorul anammox la scară industrială) poate îmbunătăți retenția biomasei deoarece granulele oferă un habitat specific pentru bacteriile anammox, favorizând atașarea bacteriilor, rezistența acestora la presiunea hidraulică din sistem și astfel, creșterea microorganismelor (Gaul și colab., 2006). Prezența agregatelor bacteriene a fost

semnalată și în alte sisteme BRM în care a avut loc procesul anammox (Wyffels și colab., 2004; Trigo și colab., 2006) sau nitrificarea (Wyffels și colab., 2003).

Cu toate acestea, date experimentale susțin că în sisteme cu membrane submersate, biomasa tinde să crească în suspensie, deoarece substratul este mult mai accesibil biomasei active și apar mai puține probleme legate de difuzie decât în cazul granulelor (Cicek și colab., 1999). Într-adevăr, în cazul BRM folosit în acest experiment, a fost obținută o cultură în suspensie, însă rămâne un motiv de discuție cauza dispariției granulelor. Este posibil ca, creșterea bacteriilor anammox sub formă de celule libere să fie cauzată de reducerea concentrației de ioni bivalenți (Ca^{2+} și Mg^{2+}), ce s-a realizat concomitent cu adăugarea de extract de drojdie. Ionii bivalenți determină formarea flocoanelor (Mahoney și colab., 1987; Sobeck și Higgins, 2002; Pevere și colab., 2007).

Dacă prezența flocoanelor a fost determinată de EPS (substanțe polimerice extracelulare), produse ca urmare a stresului cauzat de lipsa unui micronutrient, atunci adaosul de extract de drojdie a redus producerea de EPS și astfel a favorizat creșterea în suspensie.

Cu toate acestea, reducerea concentrației ionilor bivalenți nu poate fi singurul motiv de formare a unei culturi în suspensie, deoarece și la concentrații mai scăzute decât cele din BRM, biomasa s-a menținut sub formă de granule (Trigo și colab., 2006).

O diferență majoră față de bioreactoarele cu membrană utilizate în celelalte experimente citate, a fost menținerea unui TRS de 16 sau 12 zile, în timp ce, în celelalte cazuri, TRS a fost practic infinit (biomasa nefiind îndepărtată). Competiția în sisteme cu TRS mare este mult mai redusă iar rata de creștere este de asemenea mică, favorizând formarea de granule (de Kreuk și van Loosdrecht, 2004). În acest context, un TRS relativ mic pare a fi necesar pentru obținerea unei suspensii celulare.

Creșterea în suspensie poate fi cauzată și de stresul redus de forfecare și viteza mică a rotorului (160 rpm) (van der Star și colab., 2008).

Schimbul de populații anammox

Biodiversitatea bacteriilor anammox este atestată prin numeroasele experimente efectuate la nivel de laborator, în sisteme de tratare a apelor reziduale și în ecosistemele acvatice (van de Graaf și colab., 1996; Strous și colab., 1999; Kartal și colab., 2007; Kuypers și colab., 2003).

Genuri diferite au fost identificate în condiții diferite de mediu. În culturi de îmbogățire la nivel de laborator, în care N-NH_4^- este donor de electroni și NO_2^- acceptor, fie *Brocadia*, fie *Kuenenia* devin specii dominante. Există diferențe clare între acestea și alte genuri precum *Scalindua* (identificată în ecosistem marin, Kuypers și colab., 2003), sau *Anammoxoglobus propionicus* (îmbogățit în cultură cu adaos de propionat, Kartal și colab., 2007).

Deoarece diferitele genuri de microorganisme anammox rareori se întâlnesc în același sistem de tratare a apei reziduale sau cultură de îmbogățire, se pare că fiecare gen ocupă o nișă proprie, iar condițiile de mediu selectează doar unul dintre aceste genuri. De asemenea, distanțele filogenetice semnificative dintre diferitele specii indică existența unor nișe ecologice distincte, dar încă necunoscute (Kartal și colab., 2007; Schmid și colab., 2003). Între *Brocadia* și *Kuenenia* există 90,5% similaritate de secvență la nivelul ADNr 16S și 87,8% la nivelul ADNr 23S, iar între grupul *Brocadia-Kuenenia* și restul planctomicetelor 78% și respectiv 72% (Schmid și colab., 2001).

Un factor important pentru diferențierea strategiilor ecologice ale speciilor *Kuenenia* și *Brocadia* poate fi reprezentat de afinitatea pentru substrat și sensibilitatea diferită față de factorii de inhibiție (Gaul și colab., 2006). Specia *Kuenenia* pare să aibă o capacitate mai mare de tolerare a concentrațiilor ridicate de nitrit și fosfat decât *Brocadia* (Strous și colab., 1999; Egli și colab., 2001). Cu toate acestea, date recente menționează îmbogățirea în reactoare la scară industrială (operate la nivele ridicate de NO_2^-) a speciei *Brocadia* (van der Star și colab., 2007).

În bioreactorul cu membrană utilizat pentru acest studiu s-a observat un schimb de populații anammox. Cultura *Brocadia* dominantă a fost îmbogățită pornind de la un inocul granular prelevat dintr-un bioreactor la scară industrială ce conține *Brocadia*. Inoculul reactorului la scară industrială a provenit de la un reactor de îmbogățire, alimentat cu mediu sintetic ce conține, pe lângă nutrienți similari mediul folosit de van de Graaf (1996), $1,8 \text{ kg-N/m}^3$ NH_4Cl și $1,6 \text{ kg-N/m}^3$ NaNO_2 , iar specia îmbogățită este *Kuenenia* (van der Star și colab., 2007). După inoculare, biomasa existentă în inocul, fie se aclimatizează, adaptându-se la noi condiții, fie comunitatea microbiană suferă o schimbare semnificativă, cauzată de concentrațiile ionilor, pH, temperatură (Kartal și colab., 2006).

La un TRS de 16 zile, specia *Kuenenia* a devenit dominantă. Rata de creștere specifică minimă necesară pentru cultivarea la acest TRS ($0,0026/\text{h}$) este aproximativ egală sau chiar sub valoarea ratei maxime specifice de creștere atât pentru *Brocadia* cât și pentru *Kuenenia*. De

aceea, deoarece schimbul de populații s-a realizat într-o perioadă scurtă (max. 40 de zile de la utilizarea TRS=16), competiția probabil nu s-a bazat pe rata de creștere. Selecția în BRM se bazează pe aparenta afinitate pentru substratul limitat (nitrit în acest caz).

Pe baza acestor observații se poate presupune că strategia speciei *Brocadia* se bazează pe rata de creștere, iar a speciei *Kuenenia* pe afinitate (van der Star și colab., 2008).

Diversitatea bacteriilor non-anammox din BRM

În studiul de față, prin folosirea unui bioreactor cu membrană, a fost obținută o cultură de îmbogățire cu un înalt nivel de puritate (97,6%), folosind un timp de retenție a solidelor, relativ scurt, de 12 zile (van der Star și colab., 2008). Strategia aplicată pentru caracterizarea comunității de microorganisme din cultura de îmbogățire obținută în bioreactorul cu membrană a implicat utilizarea tehnicilor moleculare bazate pe gena ARNr 16S, și anume PCR-DGGE și FISH. Pe baza acestor tehnici au fost identificați membrii dominanți ai comunității precum și populația non-anammox minoritară. Deoarece ADNr 16S provenit de la bacteriile anammox din cultură a putut fi amplificat doar cu amorsa Pla-46 F (Neef și colab., 1998) specifică pentru planctomicete, s-a considerat că perechea de amorse generale 341FGC/907RM (Muyzer și colab., 1993) va putea fi folosită pentru amplificarea ADNr 16S de la membri minoritari ai comunității din cultura de îmbogățire. Într-adevăr, nici una din secvențele obținute prin amplificarea genei ARNr 16S cu aceasta pereche de amorse nu prezintă similaritate cu speciile anammox din cultura de îmbogățire și nici cu alt membru al filumului *Planctomycetes*.

Structura comunității non-anammox de-a lungul perioadei experimentale are un caracter relativ stabil, numărul de specii din care este formată fiind redus. În primele 120 de zile de funcționare profilul DGGE indică prezența a trei specii dominante, care pe baza analizei filogenetice se grupează în trei clustere diferite, prezentând similaritate de secvență cu bacterii necultivate aparținând filumului *Chlorobi*. Prin hibridare *in situ* cu fluorescență s-a observat că aceste microorganisme sunt localizate și distribuite în marea lor majoritate în jurul agregatelor de celule anammox și chiar în interiorul acestora. Trebuie menționat faptul că această localizare specifică a microorganismelor non-anammox s-a observat numai în situația în care agregatele erau formate din specia anammox *Brocadia anammoxidans*, inițial dominantă în bioreactorul cu membrană. Modificarea compoziției mediului, efectuată în ziua 85, și anume reducerea cu 75% a concentrației ionilor de calciu și magneziu și adăugarea de extract de drojdie (1mg/L) nu

influențează compoziția populației non-anammox. Reducerea concentrației de ioni bivalenți și adaosul extractului de drojdie au contribuit însă la creșterea bacteriilor anammox în suspensie; de asemenea, în primele 100 de zile de operare s-a observat instalarea *Kuenenii stuttgartiensis* ca specie anammox dominantă.

În schimb, modificarea operațională din ziua 127, și anume reducerea TRS de la 16 la 12 zile, determină o oscilare clară a structurii comunității non-anammox, manifestată prin reducerea provizorie a numărului de benzi în profilul DGGE; o reducere a TRS implică o creștere a competiției pentru elementele esențiale (de Kreuk și van Loosdrecht, 2004), explicând astfel scăderea diversității; însă după 30 de zile patternul de benzi indică revenirea în sistem a aceluiași trei specii dominante. Astfel, această modificare operațională nu a influențat dinamica comunității non-anammox decât în perioada de adaptare a populației la noile condiții. Două specii afiliate filumului *Chlorobi* se mențin până la finalul experimentului (secvențele SB_MBR20, 23). Prezența acestor specii non-anammox încă de la începutul experimentului, și menținerea lor în bioreactor chiar și după modificarea TRS sugerează că microorganismele respective cresc și formează o populație stabilă în condiții anammox.

Încrângătura *Chlorobi* (bacterii verzi sulfuroase) este formată dintr-un grup relativ restrâns de microorganisme, limitate din punct de vedere metabolic, bine definite fiziologic și apropiate genetic, înrudite cu filumul *Bacteroidetes*. Toate tulpinile cunoscute de bacterii verzi sulfuroase cresc exclusiv fotolitoautotrof, folosind compuși ai sulfului, oxizi de fier sau hidrogen ca donori de electroni pentru realizarea fotosintezei și dețin un aparat fotosintetic foarte specializat; una dintre tulpinile existente, *Chlorobium phaeobacteroides* MN1 deține cea mai pronunțată adaptare la condiții reduse de lumină, fiind izolată de la o adâncime de 100 m, din Marea Neagră (Overmann și colab., 1992). Intensitatea luminii în zona Mării Negre de unde a fost descoperită această tulpină corespunde cu lumina oferită de o lumânare, aflată la o distanță de 50 m, în întuneric total (Manske și colab., 2005). După cum am mai menționat, bioreactorul cu membrană a fost acoperit cu un strat de PVC, astfel încât cultura de îmbogățire nu a fost expusă la lumină iar îndepărtarea stratului de PVC, în timpul operațiilor de întreținere a BRM, s-a făcut pe perioade scurte de timp, insuficiente pentru creșterea și proliferarea microorganismelor fototrofe. Iar în ceea ce privește reactoarele la scară industrială, comunitatea bacteriană nu a fost în nici un moment în contact cu lumina.

Într-o cultură de îmbogățire folosită pentru creșterea speciei *Kuenenia stuttgartiensis* și secvențarea ulterioară a genomului acestei bacterii, au fost identificate secvențe afiliate filumului *Chlorobi*, și care se grupează de asemenea cu secvențele noastre (Strous și colab., 2006). La fel ca și în bioreactorul cu membrană, nu s-a adăugat sulf redus în mediu. Un alt experiment, efectuat pentru detectarea genei *dsrAB*, implicată în reducerea disimilatorie a sulfidului, prezentă în multe genomuri ale bacteriilor ce oxidează sulfurul, nu a detectat prezența acestei gene în cadrul secvențelor din cultura de îmbogățire a *Kueneniei stuttgartiensis*, afiliate cu filumul *Chlorobi* (Loy și colab., 2009). Într-un experiment efectuat de Li și colab. (2009), pentru determinarea diversității comunității bacteriene dintr-un reactor anammox, s-a observat că specii afiliate filumului *Chlorobi* reprezintă 54% din totalitatea clonelor secvențate (aceste secvențe au mai puțin de 50% similaritate cu secvențele din BRM), alți membri ai comunității fiind afiliați încrengăturilor *Bacteroidetes* (11%), *Proteobacteria*, *Chloroflexi*.

Următoarea modificare în condițiile de cultivare, reducerea concentrației de amoniu de la 120 Mm la 100 Mm, determină apariția unor noi specii în bioreactorul cu membrană ce se grupează separat de bacteriile non-anammox deja existente, fiind afiliate filumului *Bacteroidetes* (clusterul format de secvențele SB_MBR9, 15, 19, 22, 24, secvența SB_MBR16). Aceste microorganisme sunt întâlnite în numeroase habitate precum ape dulci, sol, apele marine reci, sistemele de tratare a apelor reziduale (Manz și colab., 1996). La nivelul unui biofilm format din bacterii nitrificatoare și anammox, rolul microorganismelor aparținând acestui filum este de a asigura suportul structural pentru biofilm sau pentru anumite bacterii din biofilm. În acest caz, ele pot folosi cantități reduse de carbon rămase după nitrificare-anammox sau carbon eliberat de bacteriile moarte (Egli și colab., 2003).

Prin hibridare *in situ* cu fluorescență bacteriile non-anammox specifice bioreactorului cu membrană (ce sunt prezente în primele 150 de zile) au fost identificate și în reactorul anammox la scară industrială în care populația anammox este formată tot din *Brocadia anammoxidans* (van der Star și colab, 2007). Prezența lor atât la nivel de laborator cât și la scară industrială, alături de *Brocadia anammoxidans*, ar putea sugera că aceste bacterii formează o populație satelit pentru această specie anammox. Faptul că, după schimbul de populații anammox din bioreactor, aceste bacterii au fost eliminate, încurajează această ipoteză.

În reactorul unic nitritare-anammox la scară industrială, comunitatea de microorganisme este formată în principal din bacterii anammox (*Brocadia anammoxidans*), bacterii ce oxidează amoniul și bacterii ce oxidează nitritul; din această comunitate fac parte și microorganismele detectate în BRM, fiind identificate prin hibridare *in situ* cu sondele CHL. De asemenea, ADNr 16S provenit din biomasa fixată din reactorul biologic cu funcționare discontinuă, în care procesul anammox este catalizat tot de *Brocadia* sp., hibridează cu toate sondele oligonucleotidice CHL. Cu toate acestea, secvențele din BRM și reactorul la scară industrială se grupează cu secvențe obținute din bioreactorul în care a fost îmbogățită *Kuenenia* sp, în cadrul proiectului de secvențare a genomului acestei specii (Strous și colab, 2006).

Sondele CHL au hibridat și cu celule din biomasa a două dintre reactoarele folosite drept control negativ, în reactorul biologic cu funcționare discontinuă în care se desfășoară procesele de nitrificare/denitrificare și îndepărtare acetat/fosfat și în reactorul de nitritare tip SHARON la scară industrială. Interesant este că influentul reactorului de nitrificare/denitrificare și îndepărtare acetat/fosfat conține 50 mg/L amoniu (de Kreuk și colab., nepublicat). Din punct de vedere morfologic s-a observat că celulele etichetate fluorescent sunt bastonașe sau coci, acestea din urmă nefiind întâlnite în restul reactoarelor. De asemenea, celulele din reactorul de nitritare de tip SHARON sunt dispuse sub formă de clustere compacte.

Având în vedere că efluentul reactorului de nitritare de tip SHARON la scară industrială reprezintă influentul reactorului anammox la scară industrială, iar bioreactorul cu membrană a fost inoculat cu biomasă provenită de la cel din urmă, este posibil ca bacteriile non-anammox să provină din reactorul SHARON. Cu toate acestea, biomasa din reactorul de tip SHARON la nivel de laborator nu este etichetată specific prin hibridare *in situ* cu fluorescență cu sondele CHL.

Datele moleculare obținute în cadrul acestor experimente au permis identificarea unor posibili noi taxoni asociați sistemelor de tratare a apelor reziduale însă nu sunt suficiente pentru a oferi o explicație a prezenței și rolului microorganismelor respective în aceste sisteme. Faptul că microorganismele aparținând filumului *Chlorobi* se grupează în marea lor majoritate cu membri necultivați și sunt înrudite de la distanță cu speciile cultivate ar putea sugera apartenența acestora la o linie străveche a bacteriilor sulfuroase verzi, diferită din punct de vedere metabolic, de aceste bacterii fotoatotrofe.

Concluzii generale

Cultivarea bacteriilor anammox în suspensie necesită câteva condiții: absența unei presiuni selective pentru sedimentare, rată de creștere mare obținută prin utilizarea unui TRS scurt, concentrații reduse de ioni bivalenți. În plus, adaosul de extract de drojdie și forța de forfecare mică pot influența obținerea unei culturi în suspensie.

Utilizarea unui sistem de tipul BRM permite obținerea unei culturi de îmbogățire cu un nivel înalt de puritate (ca. 97,6%), membrii non-anammox ai comunității fiind asociați grupului *Bacteoidetes-Chlorobi*.

Datele moleculare indică o creștere activă, în condiții anammox, a speciilor bacteriene non-anammox.

Microorganismele non-anammox nu formează o comunitate satelit pentru bacteriile anammox, prezența lor fiind detectată și în reactoare în care procesul anammox nu are loc.

Datele moleculare obținute în cadrul acestor experimente au permis identificarea unor posibili noi taxoni asociați sistemelor de tratare a apelor reziduale însă nu sunt suficiente pentru a oferi o explicație a prezenței și rolului microorganismelor respective în aceste sisteme.

Bibliografie selectivă

- Cicek N., Macomber J., Davel J., Suidan M. T., Audic J., Genestet P. **2001**. Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bioreactor. *Water Sci Technol* **43**(11):43-50.
- Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K. H., Wagner M. **1999**. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**(3):434-444.
- Dalsgaard T., Canfield D. E., Petersen J., Thamdrup B., Acuna-Gonzalez J. **2003**. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* **422**(6932):606-608.
- De Kreuk M. K., van Loosdrecht M. C. M. **2004**. Selection of slow growing organisms as means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci Technol* **49** (11-12):9-17.
- Devol A. H. **2003**. Nitrogen cycle: Solution to a marine mystery. *Nature* **422**(6932):575-576.
- Egli K., Fanger U., Alvarez P. J. J., Siegrist H., Van der Meer J. R., Zehnder A. J. B. **2001**. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol* **175**(3):198-207.
- Galloway, J. N., Aber J. D., Erisman J. W., Seitzinger S. P., Howarth R. W., Cowling E. B., Cosby B. J. **2003**. The nitrogen cascade. *Bioscience* **53**:341-356.
- Gaul T., Wesoly I., Weinobst N., Kunst S. **2006**. Pilot engineering from an anammox SBR: From *de novo* enrichment to online process control. *Water and Environmental Management Series, No. 12, IWA Publishing* pp. 409–418.
- Imhoff J. F. **2003**. Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and *fmo* (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**:941-951
- Jetten M. S. M., Schmid M., Schmidt I., Wubben M., van Dongen U., Abma W. R., Sliekers O., Revsbech N. P., Beaumont H. J. E., Ottosen L. et al. **2002**. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Rev Environ Sci Biotech* **1**(1):51-63.
- Kartal B., Rattray J., van Niftrik L., van de Vossenberg J. L., Schmid M. C., Fuerst J. A., Sinninghe Damsté J., Jetten M. S. M., Strous M. **2007**. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* gen.nov., sp.nov., a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* **30**(1):39-49.
- Kieling D. D., Reginatto V., Schmidell W., Travers D., Menes R. J., Soares H. M. **2007**. Sludge wash-out as strategy for anammox process start-up. *Proc Biochem* **42**(12):1579-1585.
- Kuypers M. M. M., Sliekers A. O., Lavik G., Schmid M., Jorgensen B. B., Kuenen J. G., Sinninghe Damsté J. S., Strous M., Jetten M. S. M. **2003**. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**(6932):608-611.
- Li H. R., Du B., Fu H. X., Wang R. F., Shi J. H., Wang Y., Jetten M. S. M., Quan Z. X. **2009**. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium oxidizing (anammox) reactor community. *Syst Appl Microbiol* **32**:278-289.
- Lindsay M. R., Webb R. I., Strous M., Jetten M. S. M., Butler M. K., Forde R. J., Fuerst J. A. **2001**. Cell compartmentalization in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch Microbiol* **175**(6):413-429.
- Loy A., Duller S., Baranyi C., Mußmann M., Ott J., Sharon I., Beja O., Le Paslier D., Dahl C., Wagner M. **2009**. Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. *Environ Microbiol.* **11**(2):289-299

- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Forster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lussmann R., May M., Nonhoff B., Riechel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckman N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer K. H. **2004**. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**:1363-1371.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K. H. **1996**. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiol.* **142**:1097-1106.
- Manske K. A., Glaeser J., Kuypers M. M., Overmann J. **2005**. Physiology and phylogeny of green sulphur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea. *Appl Environ Microbiol.* **71**(12):8049-8060.
- Mulder A., van de Graaf A. A., Robertson L. A., Kuenen J. G. **1995**. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol* **16**(3):177-184.
- Muyzer G., De Waal E. C., Uitterlinden A. G. **1993**. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-70.
- Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K.-H. **1998**. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* **144**(12):3257-3266.
- Overmann J., Cypionka H., Pfennig N. **1992**. An extremely low-light-adapted green sulphur bacterium from the Black Sea. *Limnol Oceanogr.* **37**:150-155.
- Pevere A., Guibaud G., van Hullebusch E. D., Boghzala W., Lens P. N. L. **2007**. Effect of Na⁺ and Ca²⁺ on the aggregation properties of sieved anaerobic granular sludge. *Colloids Surf, A* **306**(1-3):142-149.
- Saitou N., Nei M. **1987**. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**(4):406-425.
- Schäfer H., Muyzer G. **2001**. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in marine microbial ecology. *Meth Microbiol* **30**:425-468.
- Schmid M., Schmitz-Esser S., Jetten M., Wagner M. **2001**. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environ Microbiol* **3**(7):450-459.
- Schmid M., Twachtman U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J. W., Schleifer K.-H., Wagner M. **2000**. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol* **23**(1):93-106.
- Schmid M., Walsh K., Webb R., Irene W., Rijpstra C., van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M. J., Hill T., Moffett B., Fuerst J. et al. **2003**. Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* **26**(4):529-538.
- Sobeck D. C., Higgins M. J. **2002**. Examination of three theories for mechanism of cation-induced biofloculation. *Water Res* **36**(3):527-538.
- Strous M., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. **1999**. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol* **65**(7):3248-3250.

- Strous M., Pelletier E., Mangenot S., Rattei T., Lehner A., Taylor M. W., Horn M., Daims H., Bartol-Mavel D., Wincker P. et al. **2006**. Deciphering the evolution and metabolism of an Anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**(7085):790-794.
- Trigo C., Campos J. L., Garrido J. M., Mendez R. **2006**. Start-up of the anammox process in a membrane bioreactor. *J Biotechnol* **126**(4):475-487.
- Van de Graaf A. A., de Bruijn P., Robertson L. A., Jetten M. S. M., Kuenen J. G. **1996**. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **142**(8):2187-2196.
- Van der Star W. R. L., Abma W. R., Blommers D., Mulder J. W., Tokutomi T., Strous M., Picioreanu C., Van Loosdrecht M. C. M. **2007**. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res* **41**(18):4149-4163.
- Van der Star W. R., Miclea A. I., van Dongen U. G., Muyzer G., Picioreanu C., van Loosdrecht M. C. **2008**. The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnol Bioeng* **101**(2):286-294.
- Van Dongen U., Jetten M. S. M., Van Loosdrecht M. C. M. **2001**. The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci Technol* **44**(1):153-160.
- Wyffels S., Boeckx P., Pynaert K., Verstraete W., Van Cleemput O. **2003**. Sustained nitrite accumulation in a membrane-assisted bioreactor (MBR) for the treatment of ammonium-rich wastewater. *J Chem Technol Biotechnol* **78**(4):412-419.
- Wyffels S., Boeckx P., Pynaert K., Zhang D., Van Cleemput O., Chen G., Verstraete W. **2004**. Nitrogen removal from sludge reject water by a two-stage oxygen-limited autotrophic nitrification denitrification process. *Water Sci Technol* **49**(5-6):57-64.