

Ph.D. thesis abstract - Streszczenie

Dynamics of occurrence and metabolic activity of microorganisms involved in the removal of nutrients in urban sequential sedimentation-biofiltration systems

(Dynamika występowania oraz aktywność metaboliczna mikroorganizmów zaangażowanych w usuwanie biogenów w miejskich sekwencyjnych systemach sedymentacyjno-biofiltracyjnych)

Ph.D. candidate: M.Sc. Arnoldo Font Nájera

Supervisor: Prof. dr hab. Joanna Mankiewicz-Boczek

Abstract

Microorganisms have been identified as a key biotic element in nutrient transformations in both natural freshwater and constructed ecosystems. Considering microbial metabolic activity, the nitrogen cycle is accomplished by a series of biochemical reactions where nitrification and denitrification are known to be one of the most important in the environment, and both are performed by different bacterial communities. In turn, phosphorus removal has been attributed to a different communities known as the polyphosphate accumulating bacteria, which belong to a more variable group known as the polyphosphate accumulating organisms (PAOs). In the present study, three sequential sedimentation biofiltrations systems (SSBSs) were periodically monitored to describe the dynamics of occurrence, diversity, and activity of microbial communities associated to nutrient transformations. SSBSs are directly constructed in urban freshwater ecosystems (rivers connected with recreational lake/ponds) for the treatment of pollutants carried from storm water runoff and snowmelts, among others. These systems are constructed with different zones for the sequential treatment of contaminated water from inflow to outflow direction: i) the sedimentation zone (SEDz) for the removal of coarse and particulate organic matter, ii) the geochemical zone (GEOz) for the removal of phosphorus, iii) the denitrification zone (DENz) to improve microbial activity in the reduction of nitrogen compounds, and iv) the biofiltration zone (BIOz) dedicated to phytoremediation. The rivers are connected with downstream lakes and ponds, and therefore they play an essential role for the removal of nutrients in order to control cyanobacterial harmful algal blooms (CyanoHABs) in recreational areas of cities. Moreover, they are considered as ecohydrological and nature-based

solutions (NBS), since they help to increase the resilience of urban ecosystems by mimicking ecological processes for the treatment of water.

Microbial communities involved in nutrient transformations have not been previously studied in SSBSs. These communities have been investigated in natural ecosystems, however, the major focus is dedicated to constructed wetlands (CWs) and waste water treatment plants (WWTPs). Moreover, bacteria capable of polyphosphate accumulation have been scarcely studied in natural environments, and in the case of SSBSs, this work represents the first attempt of investigation. Therefore, the present study proposed the following two hypotheses: 1. *Dynamics of microbial metabolic activity and the abundance of nutrient-transforming bacteria in SSBSs are subject to change according to specific environmental conditions observed through the seasons and the different designs in the SSBSs multi-complex structure*, and 2. *Culturable heterotrophic bacteria isolated from SSBSs have biotechnological potential to improve the efficiency in nutrient removal*.

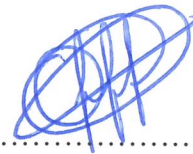
Sampling was performed in five periods (representing spring, summer, and autumn) of the years 2017 (August and October) and 2018 (April, August, and November), for three different SSBSs: i) the Sokołówka SSBS (Sok-SSBS, constructed in 2011) and the i) Bzura SSBS (Bzr-SSBS, constructed in 2013) located in the city of Lodz, and iii) the Struga Gnieźnińska SSBS (Str-SSBS, constructed in 2016) in the city of Gniezno. Each SSBS contains the SEDz, GEOz (containing limestone barrier in Sok-SSBS and Str-SSBS, and dolomite barrier at Bzr-SSBS), and BIOz. Only the Str-SSBS contains the DENz, between the GEOz and BIOz, with the addition of brown coal. Water, sediment, rock (limestone or dolomite), and brown coal samples were collected through the horizontal profile from each SSBS. Physico-chemical parameters (temperature, oxygen concentration, and pH) were measured for surface water, and chemical analysis was performed to estimate concentrations of nutrients (N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃, TN, P-PO₄, and TP) in surface water and interstitial water extracted from the sediments. Spatial and temporal differences by microbial diversity, community and metabolic activity was analysed using the Community Level Physiological Profile approach (CLPP) through the Biolog Ecoplate™. Quantitative PCR (qPCR) was performed to estimate the abundance of nitrifying and denitrifying bacterial communities in SSBSs with the use of functional genes involved in such nitrogen cycling processes (*amoA* and *nosZ*, respectively). The gene 16S rRNA was used to estimate their relative abundance from the total community of bacteria. Microbial community analysis – with high-through put sequencing of the gene 16S rRNA – was performed in biofilm formations in limestone barriers (GEOz) and brown coal (DENz) from

Sok-SSBS and Str-SSBS, since higher quantities of nutrient transforming bacteria were observed during qPCR analysis. Moreover, culturable heterotrophic bacteria were isolated from SEDz and were tested for their ability to transform nitrogen compounds in controlled experiments with selective media, and their genetic characteristics were investigated to corroborate the metabolic pathways involved in nitrogen transformation.

Results indicated that the temperature was one of the most important factors modifying microbial metabolic activity, diversity and abundance in SSBS's sediments. According to the CLPP analysis, microbial metabolic activity was higher in warmer periods during spring and summer. In the case of bacterial communities, the nitrifying bacteria were more abundant in temperate spring season (14.2 ± 2.5 °C), and positive significant correlation between the N-NH₄ and the gene copy numbers of *amoA* suggested that they were more active during this season of collection. In contrast, denitrifying bacteria were more abundant in warm summer season (21.9 ± 1.9 °C), and a positive significant correlation between the N-NO₃ and the gene copy numbers of the *nosZ* suggested that they were more active during this season of collection. The design of the system was another important factor modifying microbial communities in SSBSs, and the biofilm formations in GEOz and DENz were the most outstanding in comparison to the other zones. Microbial communities in GEO zones were less metabolically active when compared to the other zones. In turn, considering the rock substrate, the metabolic activity in dolomite (in Bzr-SSBS) was significantly lower than barriers constructed with limestone (in Sok-SSBS and Str-SSBS). Moreover, nitrifying communities were significantly higher in GEOz containing limestone, when compared to dolomite barriers or other zones containing sediments. Bacterial community analysis – using 16S rRNA – suggested that nitrogen transforming bacteria in GEOz with limestone were represented by: *Commamonadaceae*, *Rhodobacter*, and *Crenothrix*. In the case of *Rhodocyclaceae* (*Dechloromonas*), the results indicated that they could be involved in the removal of phosphorus. In turn, the denitrifying bacteria were observed with the highest abundances in biofilm formations over brown coal in DENz, when compared to any other SSBS zone. Moreover, bacterial community analysis – using 16S rRNA – suggested that nitrogen transforming bacteria in DENz were represented by: *Commamonadaceae*, *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium*), *Crenotrichaceae* (*Crenothrix*) and *Rhodobacter*. In conclusion, the above results not only allowed to confirm the first hypothesis, but also helped to identify preferable conditions that increased abundance and metabolic activity of microbial communities in

SSBSs. The results were used to suggest better planning in the construction of SSBSs, that could aid to increase their removal efficiency of nutrients.

From a total of 150 bacterial strains isolated from SSBSs, two (*Citrobacter freundii* Bzr02, and *Pseudomonas mandelii* Str21) were observed to perform effective removal of nitrogen compounds in controlled experiments with selective media. The strain Bzr02 contained the genes *napA/narG* which are involved in the reduction of nitrate to nitrite, and therefore it was identified as a nitrate reducer. Moreover, the Bzr02 was also able to remove hydroxylamine from the medium - confirmed by the presence of the *hao* gene. In the case of Str21, the strain was found to contain all genes involved in the dissimilatory nitrate reduction (*narG*, *nirS*, *norB*, and *nosZ*), and therefore indicating that it was a denitrifying bacterium. Both strains demonstrated that assimilation of nitrogen compounds (N-NH₄ and N-NO₃) is also an important process occurring simultaneously with dissimilatory nitrate reduction. In conclusion, the above results not only allowed to confirm the second hypothesis, but also suggested that both strains are potential candidates with biotechnological applications to increase the removal efficiency of nutrients in SSBSs.



.....
M.Sc. Arnoldo Font Nájera

UNESCO Chair on Ecohydrology and Applied Ecology

Streszczenie

Mikroorganizmy jako kluczowy element biotyczny są odpowiedzialne za przemiany biogenów – związków azotu i fosforu, zarówno w naturalnych ekosystemach słodkowodnych, jak i tych zmodyfikowanych przez człowieka. Cykl azotowy powiązany jest z aktywnością metaboliczną bakterii, a reakcje nitryfikacji i denitryfikacji są jednymi z najważniejszych procesów, za które odpowiedzialne są różne społeczności bakteryjne. Z kolei usuwanie fosforu jest związane z aktywnością bakterii akumulujących polifosforany, które należą do szeroko pojętej grupy, znanej jako organizmy akumulujące polifosforany (*ang.* Polyphosphate accumulating organisms, PAOs). W niniejszych badaniach, trzy sekwencyjne systemy sedymentacyjno biofiltracyjne (*ang.* sequential sedimentation biofiltration systems, SSBSs) były okresowo monitorowane w celu opisanie dynamiki występowania, różnorodności i aktywności społeczności mikroorganizmów związanych z przemianami biogenów. SSBSs są budowane w miejskich ekosystemach słodkowodnych (rzeki połączone ze zbiornikami/stawami rekreacyjnymi) w celu oczyszczania wód powierzchniowych z zanieczyszczeń niesionych m.in. ze spływów burzowych i roztopów. W systemach tych funkcjonują różne strefy dla intensyfikacji procesu oczyszczania wody, wśród których można wymienić następujące: i) strefa sedymentacji (*ang.* sedimentation zone, SEDz) do usuwania gruboziarnistej i cząsteczkowej materii organicznej, ii) strefa geochemiczna (*ang.* geochemical zone, GEOz) do usuwania fosforu, iii) strefa denitryfikacji (*ang.* denitrification zone, DENz) w celu intensyfikacji aktywności mikroorganizmów w redukcji związków azotu, oraz iv) strefa biofiltracji (*ang.* biofiltration zone, BIOz) dedykowana fitoremediacji.

Rzeki miejskie są połączone ze zbiornikami i stawami, dlatego istotne jest usuwanie nadmiaru substancji biogenych, poprzez konstrukcje SSBSs powyżej w/w zbiorników, w celu m.in. kontroli szkodliwych sinicowych zakwitów wód (*ang.* cyanobacterial harmful algal blooms, CyanoHABs). Ponadto, SSBSs reprezentują rozwiązania bliskie naturze (*ang.* nature-based solution, NBS), z wykorzystaniem koncepcji ekohydrologii, pomagając zwiększyć odporność ekosystemów miejskich poprzez naśladowanie procesów ekologicznych w oczyszczaniu wody.

Zespoły mikroorganizmów biorące udział w przemianach biogenów – związków azotu i fosforu nie były wcześniej badane w SSBSs. Takie społeczności są analizowane w naturalnych ekosystemach, jednakże większość badań koncentruje się na sztucznych mokradłach (*ang.* constructed wetlands, CW) i oczyszczalniach ścieków (*ang.* wastewater treatment plants, WWTP). Ponadto, bakterie zdolne do akumulacji polifosforanów są rzadko

badane w środowisku naturalnym, a w przypadku SSBSs, niniejsza praca stanowi pierwszą próbę ich identyfikacji.

W związku z tym, postawiono dwie hipotezy: 1. *Dynamika metabolicznej aktywności mikroorganizmów i liczebność bakterii uczestniczących w transformacji biogenów w SSBSs jest zależna od warunków środowiskowych obserwowanych w różnych porach roku oraz od różnych typów konstrukcji SSBSs*; i 2. *Heterotroficzne bakterie wyizolowane z SSBSs mają potencjał biotechnologiczny dla poprawy efektywności usuwania biogenów*.


Materiał do badań został pobrany w pięciu różnych okresach, w sezonie wiosennym, letnim i jesiennym, w roku 2017 (sierpień i październik) oraz 2018 (kwiecień, sierpień i listopad), z trzech różnych SSBSs: i) SSBS Sokołówka (Sok-SSBS, wybudowany w 2011 r.), ii) i SSBS Bzura (Bzr-SSBS, wybudowany w 2013 r.) zlokalizowanych na terenie miasta Łodzi oraz iii) SSBS Struga Gnieźnieńska (Str-SSBS, wybudowany w 2016 r.) na terenie miasta Gniezno. W skład każdego z SSBSs wchodzi kolejno strefy: SEDz, GEOz (zawierająca barierę wapienną w Sok-SSBS i Str-SSBS oraz barierę dolomitową w Bzr-SSBS) i BIOz. Jedynie Str-SSBS zawiera DENz, pomiędzy GEOz i BIOz, z dodatkiem węgla brunatnego. Próbkę wody, osadów, wapienia lub dolomitu oraz węgla brunatnego pobierano w profilu poziomym z każdego SSBS. W wodzie powierzchniowej mierzono parametry fizyko-chemiczne (temperaturę, stężenie tlenu i pH), a stężenie substancji biogenych (N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃, TN, P-PO₄ i TP) analizowano w wodzie powierzchniowej i wodzie pobranej z osadów. Przestrzenne i czasowe różnice w różnorodności mikroorganizmów, ich społeczności i aktywności metabolicznej były analizowane przy użyciu metody CLPP (*ang.* Community Level Physiological Profile approach) za pomocą Biolog Ecoplate™. Ilościowe analizy genetyczne (qPCR) zostały przeprowadzone w celu oszacowania liczebności bakterii nityfikacyjnych i denityfikacyjnych, z wykorzystaniem kluczowych genów funkcyjnych zaangażowanych w procesy obiegu azotu, odpowiednio *amoA* i *nosZ*. Względna liczebność całej populacji bakterii została oszacowana na podstawie ilości kopii genu 16S rRNA. Analizę zbiorowisk bakteryjnych - z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania genu 16S rRNA – wykonano dla próbek pobranych z biofilmów utworzonych na wapieniu w GEOz i węgla brunatnym w DENz, z Sok-SSBS i Str-SSBS. Ponadto, z osadów w SEDz wyizolowano hodowalne bakterie heterotroficzne, które scharakteryzowano pod kątem zdolności do transformacji związków azotu w warunkach laboratoryjnych na zdefiniowanych podłożach mikrobiologicznych. Ponadto, dla w/w bakterii wykonano analizę genetyczną pod kątem obecności genów kluczowych dla transformacji związków azotu.

Wyniki badań wykazały, że temperatura jest jednym z najważniejszych czynników modyfikujących aktywność metaboliczną, różnorodność i liczebność mikroorganizmów w osadach, w SSBSs. Jak wynika z analizy CLPP, aktywność metaboliczna mikroorganizmów była wyższa w cieplejszych okresach - sezon wiosenny i letni. W przypadku analizy zróżnicowania czasowego zbiorowisk bakteryjnych, bakterie nityfikacyjne były liczniejsze w okresie wiosennym, przy umiarkowanej temperaturze ($14,2 \pm 2,5$ °C). Dodatnia korelacja między N-NH₄, a liczbą kopii genu *amoA* sugeruje, że były one również bardziej aktywne w w/w sezonie. Z kolei bakterie denityfikacyjne występowały liczniej w okresie cieplejszym – sezon letni ($21,9 \pm 1,9$ °C), a dodatnia korelacja między N-NO₃, a liczbą kopii genu *nosZ* sugeruje, że były one również bardziej aktywne w w/w sezonie. Kolejnym ważnym czynnikiem modyfikującym zbiorowiska mikroorganizmów w SSBSs była ich konstrukcja, przy czym biofilm w GEOz i DENz charakteryzował się największą liczebnością bakterii uczestniczących w transformacji azotu. Zbiorowiska mikroorganizmów w GEOz były mniej aktywne metabolicznie w porównaniu z pozostałymi strefami. Z kolei, biorąc pod uwagę materiał skalny użyty w GEOz, aktywność metaboliczna w dolomicie (Bzr-SSBS) była istotnie niższa niż barier zbudowanych z wapienia (Sok-SSBS i Str-SSBS). Ponadto, statystycznie istotna była większa liczebność bakterii nityfikacyjnych w GEOz zbudowanej z użyciem wapienia, w porównaniu do barier dolomitowych i pozostałych stref SSBSs. Analiza zbiorowisk bakteryjnych - z wykorzystaniem 16S rRNA - wykazała, że bakterie transformujące azot w GEOz z wapieniem reprezentowane były przez: *Commamonadaceae*, *Rhodobacter* i *Crenothrix*. W przypadku *Rhodocyclaceae* (*Dechloromonas*) wyniki wskazały, że mogą one brać udział w usuwaniu fosforu. Z kolei bakterie denityfikacyjne zaobserwowano w największej liczebności w biofilmie utworzonym na węglu brunatnym w DENz. Ponadto analiza zbiorowisk bakteryjnych - z wykorzystaniem 16S rRNA - wykazała, że bakterie transformujące azot w DENz reprezentowane były przez: *Commamonadaceae*, *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium*), *Crenotrichaceae* (*Crenothrix*) i *Rhodobacter*.

Podsumowując, powyższe wyniki pozwoliły nie tylko na potwierdzenie pierwszej hipotezy, ale również na określenie preferowanych warunków zwiększających liczebność i aktywność metaboliczną zbiorowisk mikroorganizmów w badanych SSBSs. Uzyskane wyniki przyczynią się do optymalizacji konstrukcji SSBSs, w celu zwiększenia efektywności usuwania biogenów.

W prezentowanej pracy, badania skupiły się nad charakterystyką dwóch szczepów wyizolowanych z SSBSs, które to izolaty spośród 150 ogółem wyizolowanych i badanych, wykazywały największą, aktywność metaboliczną względem związków azotu, w warunkach

laboratoryjnych. Były to szczepy *Citrobacter freundii* Bzr02 i *Pseudomonas mandelii* Str21. Szczep Bzr02 posiadał w swoim genomie geny *napA/narG*, które biorą udział w redukcji azotanów do azotynów, dlatego został zidentyfikowany jako reduktor azotanów. Ponadto, Bzr02 był również zdolny do usuwania z podłoża hydroksyloaminy, co zostało potwierdzone obecnością genu *hao*. W przypadku szczepu Str21 stwierdzono obecność wszystkich genów zaangażowanych w dysymilacyjną redukcję azotanów (*narG*, *nirS*, *norB* i *nosZ*), co wskazuje na to, iż jest to bakteria zdolna do denitryfikacji. Oba szczepy wykazały, że asymilacja związków azotu (N-NH₄ i N-NO₃) jest ważnym procesem zachodzącym równocześnie z dysymilacyjną redukcją azotanów. Podsumowując, powyższe wyniki pozwoliły nie tylko na potwierdzenie drugiej hipotezy, ale również zasugerowały, że oba szczepy są potencjalnymi kandydatami do zastosowań biotechnologicznych w celu zwiększenia efektywności usuwania biogenów w SSBSs.



.....
mgr Arnoldo Font Nájera

Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej