

Ewa Zborowska, Adam Muszyński, Maria Łebkowska, Jolanta Podedworna, Monika Żubrowska-Sudol

Badania składu jakościowego bakterii występujących w osadzie czynnym akumulującym polifosforany

W osadzie czynnym, hodowanym naprzemiennie w warunkach beztlenowych i tlenowych, zostają wyselekcjonowane mikroorganizmy odpowiedzialne za usuwanie fosforu, które mają zdolność do akumulacji w swoich komórkach polifosforanów (polyphosphate-accumulating organisms – PAO). Organizmy te pobierają w warunkach beztlenowych lotne kwasy tłuszczowe (LKT), które są substratem do tworzenia wewnątrzkomórkowych polimerów – poli- β -hydroksykwasów (PHA). Energia potrzebna do tych biotransformacji pochodzi z ATP, który jest syntezowany poprzez przyłączenie ortofosforanu do ADP, przy czym ortofosforany pochodzą z hydrolizy bogatych w energię wewnątrzkomórkowych polifosforanów. Syntezie PHA towarzyszy więc uwalnianie ortofosforanów z komórek. Siła redukująca do tworzenia PHA uzyskiwana jest z wewnątrzkomórkowego materiału zapasowego – glikogenu. W warunkach beztlenowych glikogen katabolizowany jest do pirogronianu w szlaku Embdena-Meyerhofa-Parnasa (EMP) z wytworzeniem NADH, a z pirogronianu powstają acetylo-CoA i CO₂. Niektórzy autorzy wskazują, że tworzenie NADH może przebiegać w wyniku rozkładu wewnątrzkomórkowych węglowodanów w szlaku Entnera-Doudoroffa (ED), a także z wykorzystaniem pełnego lub częściowego cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA) [1–3]. Skuteczność procesu syntezy PHA warunkuje więc także dostępność glikogenu, a nie tylko obecność polifosforanów [2, 4]. W warunkach tlenowych, mikroorganizmy akumulujące polifosforany (PAO) wykorzystują nagromadzony polimer (PHA), jako źródło energii do wzrostu oraz uzupełniania zapasów glikogenu i polifosforanów, co wiąże się ze zwiększonym poborem ortofosforanów ze ścieków (ponad zapotrzebowanie komórek).

Wykazano, że skuteczne usuwanie fosforu ze ścieków można uzyskać nie tylko w warunkach beztlenowo-tlenowych, ale także beztlenowo-anoksydacyjnych [5, 6]. Niektóre mikroorganizmy akumulujące polifosforany, mające zdolność do denitryfikacji (DPAO), zamiast tlenu wykorzystują azotany lub azotyny (jako akceptory elektronów) i wobec tego umożliwiają jednocześnie usuwanie fosforu i denitryfikację. Usuwanie fosforu w warunkach anoksydacyjnych jest mniej kosztochłonne od procesu tlenowego, ponieważ zachodzi przy mniej intensywnym napowietrzaniu ścieków, bez dodatku zewnętrznego źródła węgla organicznego i charakteryzuje się mniejszą produkcją osadu nadmiernego.

Problemy w funkcjonowaniu układów biologicznych z usuwaniem fosforu może stwarzać współzawodnictwo mikroorganizmów akumulujących polifosforany z inną grupą organizmów – znaną jako akumulujące glikogen (glycogen-accumulating organisms – GAO) w warunkach tlenowych. Mogą one namnażać się w zmiennych warunkach beztlenowo-tlenowych, ale nie są zdolne do gromadzenia polifosforanów. Przy braku tlenu GAO zużywają glikogen, a także wykorzystują LKT, podobnie jak PAO, do syntezy PHA. W warunkach tlenowych utlenianie PHA umożliwia im wzrost biomasy i syntezę glikogenu, który stanowi podstawowe źródło energii. GAO są niepożądane w układach osadu czynnego z usuwaniem fosforu, ponieważ wykorzystują LKT, konkurując o nie z PAO.

Wydaje się więc bardzo istotne rozpoznanie bakterii zasiedlających osad czynny i taki dobór parametrów technologicznych tego procesu, aby zapewnić optymalne warunki do wzrostu PAO, przy ograniczonym namnażaniu GAO. Układy oczyszczania ścieków ze zwiększonym usuwaniem fosforu (enhanced biological phosphorus removal – EBPR) były dotychczas projektowane i eksploatowane bez dokładnej znajomości mikroorganizmów zasiedlających osad czynny. Konfiguracje kolejnych reaktorów opracowywano nie na podstawie wiedzy o procesach mikrobiologicznych, lecz na drodze doświadczeń inżynierskich [2]. Znajomość biocenozy zasiedlającej urządzenia do oczyszczania ścieków w skali technicznej, wykorzystana przy opracowywaniu kolejnych technologii, pozwoliłaby na uzyskanie konsorcjów PAO charakteryzujących się jak największą bioróżnorodnością. Jest to jeden z warunków zapewniających stabilność biologicznego oczyszczania ścieków i minimalizujących podatność układów oczyszczania na oddziaływanie czynników zewnętrznych [7].

Celem podjętych badań była izolacja i identyfikacja PAO zasiedlających sekwencyjny reaktor porcjowy (SBR) przeznaczony do usuwania ortofosforanów ze ścieków.

Materiały i metody

Osad czynny

Wykorzystany w badaniach osad czynny pochodził z laboratoryjnego modelu SBR o pojemności roboczej 28 dm³, pracującego w systemie trzech ośmiogodzinnych cykli w ciągu doby. Jeden cykl oczyszczania składał się z dwóch naprzemiennie występujących po sobie faz – bez napowietrzania i z napowietrzaniem, a także faz sedymentacji i dekantacji oraz fazy martwej. Podczas badań sukcesywnie zmniejszano zawartość tlenu rozpuszczonego w fazach

Dr E. Zborowska, dr inż. A. Muszyński, prof. dr hab. M. Łebkowska: Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Środowiska, Zakład Biologii, ul. Nowowiejska 20, 00–653 Warszawa, maria.lebkowska@is.pw.edu.pl, ewa.zborowska@is.pw.edu.pl, adam.muszynski@is.pw.edu.pl
Dr hab. inż. J. Podedworna, dr inż. M. Żubrowska-Sudol: Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Środowiska, Zakład Zaopatrzenia w Wodę i Odprowadzania Ścieków, ul. Nowowiejska 20, 00–653 Warszawa
jola.podedworna@is.pw.edu.pl, monika.sudol@is.pw.edu.pl

z napowietrzaniem – od $2,5 \text{ gO}_2/\text{m}^3$ do $1,0 \text{ gO}_2/\text{m}^3$. Do reaktora doprowadzano ścieki syntetyczne, dwukrotnie w każdym cyklu, w ilości 6 dm^3 na początku pierwszej i 3 dm^3 na początku drugiej fazy bez napowietrzania. Badania prowadzono przez 9 miesięcy, po 1,5-miesięcznym wpracowaniu układu. Szczegółowe dane dotyczące reaktora i charakterystyki ścieków przedstawiono w pracy [8].

Isolacja i identyfikacja mikroorganizmów

Próbki osadu czynnego pobrano w odstępach miesięcznych. W celu wyselekcjonowania bakterii o potencjalnych zdolnościach do akumulacji polifosforanów pobrane próbki poddano tzw. głodzeniu. W tym celu ciecz z nad osadu zdekantowano i zastąpiono wodą wodociągową pozbawioną chloru, a następnie próbki osadu inkubowano przez 7 d, stosując warunki wytrząsania i napowietrzania podane w pracy [9]. Po inkubacji osad czynny poddano dezintegracji ultradźwiękowej w ciągu 40 s (moc $0,4 \text{ kW}$, amplituda drgań $36 \mu\text{m}$) i posiano metodą powierzchniową na agarze z peptonem kazeinowym (GCYA) wg [10] z dodatkiem dicykloheksylokarbodiimidu (DCCD; $0,4 \text{ mmol}/\text{dm}^3$) jako inhibitora ATP-azy. Dodatek DCCD hamuje pobór ortofosforanów i zaburza funkcjonowanie pompy protonowej w komórce. W tych warunkach zdolne do przeżycia są jedynie te bakterie, które akumulują polifosforany i mogą wykorzystywać je jako źródło energii [9,11]. Równoległe wykonano posiewy zdeintegrowanych próbek osadu nie poddanych głodzeniu. Identyfikację bakterii wykonano zgodnie z rutynową techniką mikrobiologiczną [12], przy zastosowaniu standaryzowanych testów API 20 NE, API STAPH, API 50 CH i API CORYNE firmy Bio-Merieux. Barwienie osadu czynnego miało na celu wykazanie obecności bakterii akumulujących polifosforany i wytwarzających PHA. W tym celu zastosowano odpowiednio metodę Neissera oraz barwienie Sudanem czarnym [13]. Błękit metylenowy, zawarty w roztworze Neissera, barwi granulki polifosforanów na ciemnofioletowo, ponieważ jest selektywnie wiązany przez anionowe miejsca łańcucha polimerycznego. Pozostała część komórki przyjmuje zabarwienie żółtobrazowe. W wyniku barwienia Sudanem czarnym wewnątrzkomórkowe PHA widoczne są w postaci granatowoczarnych granulek, podczas gdy cytoplazma zabarwiona jest na różowo. Zabarwione preparaty osadu czynnego obserwowano w powiększeniu 1000-krotnym przy użyciu obiektywu immersyjnego.

Test hodowlany potwierdzający u wyizolowanych bakterii cechy PAO

Badania przeprowadzono w hodowlach płynnych, stosując naprzemienną inkubację w warunkach anaerobowych i aerobowych, zgodnie z metodyką podaną w pracach [9, 14]. Testowi poddano czyste szczepy bakterii, hodowle mieszane zawierające od kilku do kilkunastu szczepów oraz osad czynny pobrany bezpośrednio z komory SBR. Podłoże płynne do hodowli mikroorganizmów zawierało (w objętości 1 dm^3): $1,2 \text{ g}$ peptonu kazeinowego, $0,5 \text{ g}$ octanu sodu, $0,3 \text{ g}$ ekstraktu drożdżowego, 100 mg siarczanu magnezu ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 30 mg chlorku wapnia ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 200 mg dwuwodorofosforanu(V) potasu (KH_2PO_4) oraz 100 mg chlorku sodu ($\text{pH}=6,8 \div 6,9$). Hodowle namnażające przeprowadzono w warunkach wytrząsania przez 72 h, a następnie odwirowano (10 min , 10 tys. obr./min , 20°C). Biomasa zawieszono w podłożu płynnym jw. i inkubowano w warunkach beztlenowych w szczelnie zamkniętych

butelkach przez około 6 h ciągle wstrząsając (70 obr./min). Tlen usunięto nasycając hodowlę azotem gazowym. Następnie biomasa odwirowano i zawieszono w podłożu płynnym zawierającym sole mineralne jw., pozbawionym składników organicznych. Inkubację prowadzono przez około 17 h w warunkach tlenowych, wstrząsając z prędkością 120 obr./min .

W każdym teście występowały naprzemiennie trzy fazy beztlenowe i dwie tlenowe. Pierwsza faza beztlenowa była fazą adaptacyjną, w której nie prowadzono badań kontrolnych. Na początku i na końcu pozostałych faz oznaczono zawartość ortofosforanów oraz dodatkowo w fazach beztlenowych – rozpuszczonego węgla organicznego (RWO). Ponadto w hodowlach wielogatunkowych zastosowano test uproszczony wg metodyki opisanej w pracy [15]. Czas trwania faz anaerobowej i aerobowej wynosił odpowiednio 2 h i 5 h. Jako podłoże zastosowano sterylny płyn nadosadowy pobrany z reaktora SBR w fazie beztlenowej, uzupełniony odpowiednimi składnikami ścieków. Metoda ta nie uwzględnia zmiany składu podłoża na mineralne w warunkach aerobowych.

Oznaczenia chemiczne

Zawartość ortofosforanów i fosforu ogólnego oznaczono zgodnie z metodyką HACH z zastosowaniem molibdownadanu. Zawartość RWO oznaczono aparatem TOC 5000 Shimadzu, natomiast chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) określono metodą dwuchromianową zgodnie z normą ISO 6060 (1989).

Wyniki badań i dyskusja

W całym czasie badań układ SBR charakteryzował się wysoką skutecznością usuwania związków organicznych wyrażonych jako ChZT ($>90\%$). Skuteczność usuwania fosforu ogólnego w ciągu pierwszych czterech miesięcy mieściła się w zakresie $60 \div 90\%$ (zawartość fosforu w dopływie $10 \div 15 \text{ gP}/\text{m}^3$, w odpływie $1 \div 5 \text{ gP}/\text{m}^3$). W kolejnych miesiącach, po zmniejszeniu zawartości tlenu rozpuszczonego w fazie aerobowej do $1 \text{ gO}_2/\text{m}^3$, usuwanie związków fosforu uległo znacznej poprawie ($>90\%$), zapewniając utrzymanie zawartości fosforu ogólnego w ściekach oczyszczonych poniżej $1 \text{ gP}/\text{m}^3$.

Identyfikacja bakterii zasiedlających osad czynny (potencjalnych PAO) wykazała znaczną różnorodność form morfologicznych. Dominujące były bakterie cylindryczne gramujemne, ale licznie występowały także formy cylindryczne gramodatnie, szczególnie z rodzaju *Arthrobacter*. Wyzolowano także ziarniaki, głównie z rodzaju *Staphylococcus* (tab. 1). Siedmiodobowa inkubacja próbek osadu w warunkach tlenowych bez dostarczania związków organicznych (hodowla z głodzeniem) spowodowała selekcję szczepów – potencjalnych PAO. Stwierdzono [9], że energia wyzwolona z hydrolizy polifosforanów była wykorzystywana nie tylko w fazie anaerobowej do syntezy materiałów zapasowych, ale także pozwoliła utrzymać żywotność komórek podczas ich głodzenia w fazie aerobowej. U bakterii akumulujących polifosforany spadek zawartości ATP podczas głodzenia był znacznie mniejszy niż w komórkach niezawierających polifosforanów [9].

Przeprowadzone badania wykazały brak zdolności ziarniaków do przeżycia w warunkach głodzenia. Spośród gatunków dominujących w hodowlach głodzonych, około 50% występowało także w warunkach dostępu substratu

Tabela 1. Dominujące szczepy bakterii w osadzie czynnym w układzie SBR
Table 1. Bacterial strains dominating the activated sludge in the SBR

| Posiew bez głodzenia | Posiew z głodzeniem |
|---|--|
| bakterie cylindryczne gramujemne | |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>masoucida</i> (4 szczepy) <i>Acinetobacter baumannii</i> (2 szczepy) <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i> (2 szczepy) <i>Rhizobium radiobacter</i> (4 szczepy) <i>Rhizobium radiobacter</i> var. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (3 szczepy) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> var. | <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>masoucida</i> (3 szczepy) <i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas diminuta</i> var. <i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i> var. <i>Comamonas testosteroni</i> (3 szczepy) <i>Pseudomonas putida</i> <i>Rhizobium radiobacter</i> var. |
| bakterie cylindryczne gram dodatnie | |
| <i>Arthrobacter</i> spp. (4 szczepy) <i>Arthrobacter</i> spp. var. (2 szczepy) <i>Cornibacterium glucuronolyticum</i> <i>Corynebacterium group G</i> . | <i>Arthrobacter</i> spp. (4 szczepy) <i>Arthrobacter</i> spp. var. (2 szczepy) <i>Bacillus megatherium</i> <i>Bacillus</i> spp. (2 szczepy) <i>Corynebacterium group G</i> . |
| ziarniaki gram dodatnie | |
| <i>Micrococcus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp. var. <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> var. <i>Staphylococcus</i> spp. (2 szczepy) <i>Streptococcus faecalis</i> | - |

organicznego, przy czym najwięcej szczepów należało do rodzajów *Arthrobacter* i *Aeromonas*. Oprócz tego w hodowlach głodzonych wyselekcjonowały się gatunki (głównie z rodzaju *Brevundimonas*), które nie dominowały w hodowlach bez głodzenia. Obecność w hodowlach głodzonych bakterii z rodzaju *Bacillus* mogła być spowodowana wytwarzaniem przetrwalników, a nie gromadzeniem polifosforanów.

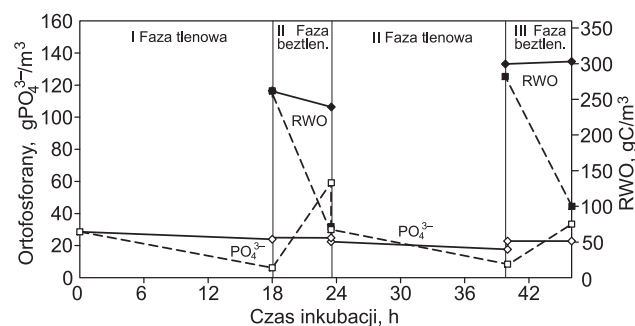
Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* zostały wyizolowane także z osadów czynnych oczyszczalni pracujących w warunkach beztlenowo-tlenowych [16], a gatunki *Pseudomonas putida* i *Rhizobium radiobacter* (dawniej *Agrobacterium radiobacter*) wyizolowano z osadu czynnego z oczyszczalni ścieków pracujących w cyklu tlenowo-beztlenowym [17]. Autorzy tych prac określili zdolność bakterii do poboru ortofosforanów ze ścieków w warunkach hodowli prowadzonych przy zmiennej ilości fosforu ($4\div 8 \text{ gP/m}^3$). Okresowe ograniczenie dostępu fosforu stymulowało zwiększony pobór ortofosforanów ze ścieków na drodze nadmiernej kompensacji (zjawisko overplus) [18].

Aeromonas hydrophila, wykryty w hodowlach bez i z głodzeniem, został wyizolowany także w badaniach [19] jako jeden z organizmów o zdolności do akumulacji polifosforanów. W pracy [15] udowodniono, że *Aeromonas hydrophila* jest organizmem skutecznie pobierającym ortofosforany ze ścieków ($1,65 \cdot 10^{-10} \text{ mgP/kom.}$). Autorzy wykazali podobną zdolność również u ziarniaków z rodzajów *Micrococcus*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*, które także należały do gatunków dominujących w niektórych hodowlach bez głodzenia. W badaniach [11] wykazano zdolność do akumulacji polifosforanów u dwóch gatunków bakterii z rodzajów *Acinetobacter* oraz *Brevundimonas vesicularis* (dawniej *Pseudomonas vesicularis*), które wyizolowano także w niniejszych badaniach z hodowli z głodzeniem. Autorzy ci udowodnili, że najbardziej intensywna synteza polifosforanów zachodziła w późnym etapie stacjonarnej fazy wzrostu bakterii. Selekcję bakterii gromadzących polifosforany uzyskano w hodowlach z zastosowaniem DCCD ($0,2 \text{ mmol/dm}^3$). Badania [9] wykazały, że pobór ortofosforanów przez komórki znajdujące się w stacjonarnej fazie wzrostu był znacznie

wyższy niż w fazie logarytmicznej. Dlatego w niniejszych badaniach zastosowano bakterie pochodzące z 72-godzinnych hodowli namnażających.

Czyste szczepy bakterii, zastosowane w teście hodowlanym mającym potwierdzić cechy PAO, nie wykazały jednak zdolności do poboru ortofosforanów ze ścieków w warunkach tlenowych i zużywania związków organicznych z jednoczesnym uwalnianiem ortofosforanów przy braku dostępu tlenu. Wydaje się prawdopodobne, że przyczyną braku wykazywania cech PAO była nieobecność innych mikroorganizmów, mogących synergistycznie oddziaływać z badanymi szczepami [1]. Autorzy pracy [20] podali hipotezę, że cechy fizjologiczne niektórych bakterii w czystych hodowlach mogą być inne niż wówczas, gdy mikroorganizmy występują w konsorcjach osadu czynnego.

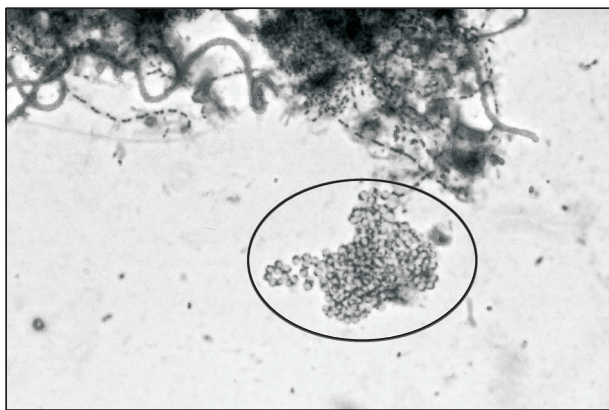
W kolejnym etapie badań testowi poddano hodowlę mieszaną, zawierającą od kilku do kilkunastu wyizolowanych szczepów bakterii, a także sam osad czynny, pobrany bezpośrednio z układu SBR. W przypadku hodowli mieszanych ponownie nie stwierdzono poboru i uwalniania ortofosforanów. Test z zastosowaniem osadu czynnego wykazał natomiast pozytywny rezultat, charakterystyczny w przypadku modelu PAO (rys. 1).



Rys. 1. Zmiana zawartości ortofosforanów i RWO w teście hodowlanym (linie ciągłe – wyizolowane szczepy, linie przerywane – osad czynny)
Fig. 1. Changes in the concentrations of orthophosphates and DOC during the test involving liquid media (solid lines: isolated strains, dashed lines: activated sludge)

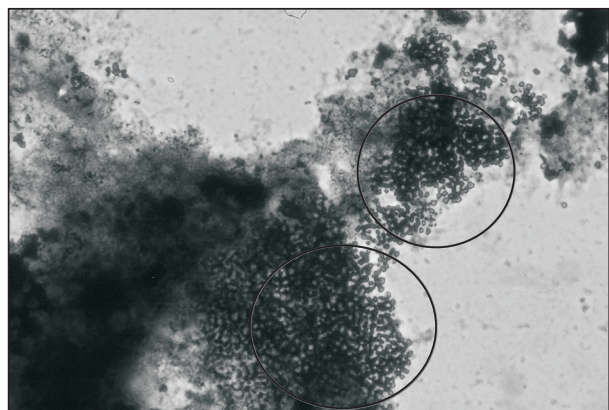
W warunkach beztlenowych mikroorganizmy wykorzystywały związki organiczne i jednocześnie uwalniały ortofosforany (zmniejszenie zawartości RWO z 260 gC/m^3 do 56 gC/m^3 i zwiększenie ilości ortofosforanów z $6 \text{ gPO}_4^{3-}/\text{m}^3$ do $59 \text{ gPO}_4^{3-}/\text{m}^3$ w drugiej fazie beztlenowej). W warunkach tlenowych stwierdzono wyraźny spadek ilości ortofosforanów – z $29 \text{ gPO}_4^{3-}/\text{m}^3$ do $6 \text{ gPO}_4^{3-}/\text{m}^3$ (pierwsza faza tlenowa). Wyniki te świadczą o obecności PAO w badanym osadzie czynnym.

Większość bakterii akumulujących polifosforany występuje w osadzie czynnym w postaci śluzowych konsorcjów, tzw. monokolonii (klastrow). Układy takie zaobserwowano także w niniejszych badaniach w barwionych preparatach osadu czynnego. Komórki zawierające PHA widoczne były w postaci krótkich pękających pałeczek z ciemnofioletowymi granulami (rys. 2).



Rys. 2. Barwienie PHA w komórkach bakterii osadu czynnego (zaznaczone monokolonie z komórkami zawierającymi granulki PHA)
Fig. 2. PHA staining in the bacterial cells of the activated sludge (ellipse shows clusters of cells containing PHA granules)

Barwienie metodą Neissera wykazało obecność licznych bakterii akumulujących polifosforany w układach zbliżonych do monokolonii (rys. 3). Istnieje pogląd [21], że bardzo niewiele komórek zawartych w monokolonii jest zdolnych do wzrostu na podłożach stałych. Izolacja PAO z osadu czynnego wiąże się z oddziaływaniem czynników fizycznych (np. ultradźwięków) koniecznych do uwolnienia bakterii z monokolonii, co może powodować uszkodzenie bardziej wrażliwych organizmów. Przyjmuje się [16,22], że metody hodowlane umożliwiają wzrost tylko niewielkiej części bakterii osadu czynnego – około $5\div 10\%$. Izolacja i identyfikacja bakterii odpowiedzialnych za usuwanie



Rys. 3. Barwienie polifosforanów w komórkach bakterii osadu czynnego (zaznaczone monokolonie z wybarwionymi komórkami)
Fig. 3. Polyphosphate staining in bacterial cells of the activated sludge (ellipses show clustered cells of cells stained with the Neisser stain for polyphosphates)

fosforu, przeprowadzane za pomocą metod hodowlanych, pozwalają na wykrycie tylko niektórych rodzajów mikroorganizmów. Na podstawie tych badań przez pewien czas uznawano rodzaj *Acinetobacter* za jedyny mający właściwości PAO [23]. Dopiero badania z zastosowaniem technik molekularnych (FISH, PCR, DGGE) wykazały dużą różnorodność grup filogenetycznych bakterii w osadzie czynnym w układach ze zwiększonym usuwaniem fosforu ze ścieków [1]. *Acinetobacter* sp. okazał się mieć niewielkie znaczenie w układach pracujących na skalę techniczną w stosunku do *Betaproteobacteria* i *Actinobacteria* [1,2]. Najliczniej wśród PAO reprezentowana jest grupa bakterii z klasy *Betaproteobacteria*, blisko powiązana z *Rhodocycylus*. Grupa ta ściśle odpowiada fenotypowi PAO i stanowi $4\div 22\%$ wszystkich bakterii obecnych w osadzie czynnym [1]. Mniejszy udział wśród PAO mają *Actinobacteria*, które nie wykazują jednak wszystkich cech fenotypowych PAO, ponieważ w warunkach anaerobowych pobierają aminokwasy, a nie LKT, zaś polimer, który wytwarzają, nie należy do PHA. Jak dotąd nie wiadomo, czy powyższe PAO można wyizolować za pomocą metod hodowlanych. Wydaje się prawdopodobne, że bakterie te wymagają synergistycznych interakcji z innymi organizmami osadu czynnego, z tego względu nie jest możliwe uzyskanie ich czystych hodowli [1,24].

Ziarniak *Micrococcus phosphovorans*, wyizolowany metodami hodowlanymi, wykazywał cechy PAO [9]. Jednak dalsze badania, m.in. z zastosowaniem techniki ^{31}P -NMR i ^{13}C -NMR udowodniły, że bakteria ta nie ma charakterystycznego dla PAO fenotypu [25]. PAO wyizolowane przez innych autorów, jak *Lampropedia* spp. [26] i *Tetrasphaera* spp. [27], również nie wykazywały tych cech fenotypowych [2]. Nie należy jednak całkowicie negować roli bakterii wyizolowanych metodami hodowlanymi. Badania [11] wykazały zdolność do akumulacji polifosforanów u *Acinetobacter lwoffii* i *A. calcoaceticus*. Metodą autoradiografii, z zastosowaniem izotopu ^{32}P , autorzy udowodnili pobieranie nieorganicznego fosforu w fazie aerobowej przez te bakterie i uwalnianie ^{32}P w ilości 25% po 15 min w fazie anaerobowej. W komórkach *A. lwoffii* stwierdzono zawartość polifosforanów w ilości 7,5% fosforu całkowitego. Wysoką zawartością polifosforanów charakteryzowały się także komórki *Pseudomonas vesicularis*. Gatunek ten stanowił jedynie 1% w konsorcjum mikroorganizmów osadu czynnego, ale wykazywał wysoką aktywność w poborze i usuwaniu ortofosforanów. Podobnie bakterie z rodzaju *Acinetobacter* sp., stanowiące często nieznaczną część (ok. 3% [28]) wszystkich mikroorganizmów osadu czynnego, mogą odgrywać istotną rolę w usuwaniu fosforu ze ścieków. Należy uwzględnić fakt, że 3% zawartości wszystkich komórek w osadzie czynnym stanowi nawet kilka milionów w jednym gramie. Jeżeli wszystkie one mają wysoką zdolność akumulacji polifosforanów, wówczas ich udział w całym procesie jest znaczący [29].

Podsumowanie

Mikroorganizmy, które mają zdolność do akumulacji polifosforanów, odgrywają istotną rolę w skutecznym usuwaniu fosforu ze ścieków. Badania wykazały, że dominujące w osadzie czynnym w laboratoryjnym układzie SBR były bakterie cylindryczne gramujemne, ale licznie występowały też formy cylindryczne gramododatnie, szczególnie z rodzaju *Arthrobacter*. Wyizolowano także ziarniaki, głównie z rodzaju *Staphylococcus*.

Spośród gatunków dominujących w hodowlach głodzonych najczęściej szczepów należało do rodzajów *Arthrobacter*, *Aeromonas*, a także *Brevundimonas*. Czyste szczepy bakterii, zastosowane w teście hodowlanym mającym potwierdzić cechy PAO, nie wykazały jednak zdolności do poboru ortofosforanów ze ścieków w warunkach tlenowych i zużywania związków organicznych, wraz z jednoczesnym uwalnianiem ortofosforanów przy braku dostępu tlenu. Przyczyną braku wykazywania cech PAO przez czyste szczepy bakterii mogła być nieobecność innych mikroorganizmów osadu czynnego, mogących synergistycznie oddziaływać z badanymi szczepami. W przypadku hodowli mieszanych również nie stwierdzono poboru i uwalniania ortofosforanów, natomiast test z osadem czynnym wykazał pozytywny rezultat, zgodny z modelem PAO. Wyniki te świadczą o obecności PAO w badanym osadzie czynnym, jednakże wydaje się prawdopodobne, że wyizolowane szczepy nie należały do PAO. Okazało się, że metody hodowlane nie zawsze umożliwiają izolację tych bakterii z osadu czynnego charakteryzującego się skutecznym usuwaniem związków fosforu ze ścieków. Badania wykazały, że wykonywanie specyficznych barwień na obecność polifosforanów i poli- β -hydroksykwasów w komórkach bakterii umożliwia jedynie stwierdzenie ich obecności i pozwala na orientacyjne określenie ich zawartości w osadzie czynnym.

Stosowane coraz szerzej techniki molekularne badań mikrobiologicznych dostarczają informacji o różnorodności grup PAO w osadzie czynnym. Ciągłe otwarte pozostaje zagadnienie uzyskania czystych hodowli tych bakterii, co umożliwiłoby dokładne rozpoznanie ich cech biochemicznych. Szczegółowe badania mikrobiologiczne, będące źródłem wiedzy na temat wzajemnych relacji między grupami bakterii w osadzie czynnym (np. konkurencji PAO i GAO), byłyby bardzo przydatne na etapie zarówno projektowania, jak i eksploatacji układów technologicznych oczyszczania ścieków.

LITERATURA

1. A. OEHMEN, P.C. LEMOS, G. CARVALHO, Z. YUAN, J. KELLER, L.L. BLACKALL, M.A.M. REIS: Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research* 2007, Vol. 41, pp. 2271–2300.
2. R.J. SEVIOUR, T. MINO, M. ONUKI: The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews* 2003, Vol. 27, pp. 99–127.
3. H. PEREIRA, P.C. LEMOS, M.A.M. REIS, J.P.S.G. CRESPO, M.J.T. CARRONDO, H. SANTOS: Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on in vivo ^{13}C -NMR labeling experiments. *Water Research* 1996, Vol. 30, pp. 2128–2138.
4. R.P.X. HESSELMANN, R. VON RUMMEL, S.M. RESNICK, R. HANY, A.J.B. ZEHNDER: Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal. *Water Research* 2000, Vol. 34, pp. 3487–3494.
5. J.P. KERN-JESPERSEN, M. HENZE: Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Research* 1993, Vol. 27, pp. 617–624.
6. T. KUBA, G. SMOLDERS, M.C.M. VAN LOOSDRECHT, J.J. HEIJNEN: Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology* 1993, Vol. 27, pp. 241–252.
7. A. LOY, H. DAIMS, M. WAGNER: Activated sludge – molecular techniques for determining community composition. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* [Ed. G. BITTON]. Wiley Scientific, New York 2002.
8. J. PODEDWORNA, M. ŻUBROWSKA-SUDOŁ, M. BANASZEWSKA, A. BISAK, A. CYGANIECKA: Ocena wydajności akumulacji ortofosforanów w warunkach anoksyicznych z wykorzystaniem testu poboru ortofosforanów. Mat. konf. „Oczyszczanie ścieków i przeróbka osadów”, Oficyna Wydawnicza Uniwersytetu Zielonogórskiego, Zielona Góra 2008, ss. 79–91.
9. Y. UBUKATA, S. TAKII: Some physiological characteristics of a phosphate-removing bacterium, *Micrococcus phosphovorans*, and a simplified isolation and identification method for phosphate-removing bacteria. *Water Science and Technology* 1998, Vol. 38, pp. 149–157.
10. E.B. PIKE, E.G. CARRINGTON, P.A. ASHBURNER: An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge. *Journal of Applied Bacteriology* 1972, Vol. 35, pp. 309–321.
11. N. SURESH, R. WARBURG, M. TIMMERMAN, J. WELLS, M. COCCIA, M.F. ROBERTS, H.O. HALVORSON: New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphate accumulation. *Water Science and Technology* 1985, Vol. 17, pp. 99–111.
12. J.G. HOLT, N.R. KRIEG: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Company, Baltimore–Hong-Kong–London–Sydney 1985–1989.
13. E. GURR: *The Rational Use of Dyes in Biology*. Leonard Hill, London 1965.
14. Y. UBUKATA, S. TAKII: Induction method of excess phosphate accumulation for phosphate removing bacteria isolated from anaerobic/aerobic activated sludge. *Water Science and Technology* 1994, Vol. 30, pp. 221–227.
15. M. SIDAT, F. BUX, H.C. KASAN: Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. *Water SA* 1999, Vol. 25, pp. 175–179.
16. G. AULING, F. PILZ, H.J. BUSSE, S. KARRASCH, M. STREICHAN, G. SCHÖN: Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diamino-propane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 1991, Vol. 57, pp. 3585–3592.
17. K.S. JØRGENSEN, A.S.L. PAULI: Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge. *Anaerobe* 1995, Vol. 1, pp. 161–168.
18. E. KLIMIUK, M. ŁEBKOWSKA: *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
19. L.H. LÖTTER: The role of bacterial phosphate metabolism in enhanced phosphorus removal from the activated sludge process. *Water Science and Technology* 1985, Vol. 17, pp. 127–138.
20. V. TANDOI, M. MAJONE, J. MAY, R. RAMADORI: The behaviour of polyphosphate accumulating *Acinetobacter* isolates in an anaerobic-aerobic chemostat. *Water Research* 1998, Vol. 32, pp. 2903–2912.
21. P.L. BOND, G.N. REES: Microbiological aspects of phosphorus removal in activated sludge systems. In: *Microbiology of Activated Sludge* [Eds. R.J. SEVIOUR and L.L. BLACKALL]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.
22. M. STREICHAN, J.R. GOLECKI, G. SCHÖN: Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal. *FEMS Microbiology Ecology* 1990, Vol. 73, pp. 113–124.
23. G.W. FUHS, M. CHEN: Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology* 1975, Vol. 2, pp. 119–138.
24. H. LU, A. OEHMEN, B. VIRDIS, J. KELLER, Z.G. YUAN: Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources. *Water Research* 2006, Vol. 40, pp. 3838–3848.

25. M.M.SANTOS, P.C.LEMOS, M.A.M.REIS, H.SANTOS: Glucose metabolism and kinetics of phosphorus removal by the fermentative bacterium *Microthrix phosphovorans*. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, Vol. 65, pp. 3920–3928.
26. L.STANTE, C.M.CELLAMARE, F.MALASPINA, G.BORTONE, A.TILCHE: Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamproedia* spp. *Water Research* 1997, Vol. 31, pp. 1317–1324.
27. A.M.MASZENAN, R.J.SEVIOR, B.K.C.PATEL, P.SCHUMANN, J.BURGHARDT, Y.TOKIWA, H.M.STRATTON: Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000, Vol. 50, pp. 593–603.
28. T.E.CLOETE, P.L.STEYN: Combined membrane filter-immunofluorescent technique for the in situ identification and enumeration of *Acinetobacter* in activated sludge. *Water Research* 1988, Vol. 22, pp. 961–969.
29. R.P.X.HESSELMANN, C.WERLEN, D.HAHN, J.R.VAN DER MEER, A.J.B.ZEHNDER: Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* 1999, Vol. 22, pp. 454–465.

Zborowska, E., Muszynski, A., Lebkowska, M., Podedworna, J., Zubrowska-Sudol, M. Qualitative Determination of Polyphosphate Accumulating Bacteria in Activated Sludge. *Ochrona Srodowiska* 2010, Vol. 32, No. 2, pp. 9–14.

Abstract: The aim of this work was to isolate and identify the polyphosphate accumulating organisms (PAOs) that populate a sequencing batch reactor (SBR) designed for the removal of orthophosphates from wastewater under laboratory conditions. In order to isolate bacteria with potential capacity for polyphosphate accumulation, the sludge samples were subjected to aerobic starvation, and the solid media used for cultivation were supplied with dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), an ATP synthesis inhibitor. The isolated bacterial strains, as well as the mixed cultures, were then tested in liquid media to confirm the typical PAO phenotype. Each test consisted of five alternate phases – three anaerobic and two aerobic. The nine-month experiment produced the following findings. Gram-negative rods dominated the activated sludge samples, but Gram-positive rods, mainly those of the genus *Arthrobacter* sp., were also in abundance. The micrococci isolated from the sludge

were predominantly of the genus *Staphylococcus* sp. Most of the strains that dominated the cultures subjected to aerobic starvation were of the genera *Arthrobacter* sp., *Aeromonas* sp. and *Brevundimonas* sp. The pure bacterial strains that were tested in the liquid media to confirm the typical PAO phenotype showed no capacity either for the uptake of orthophosphates from the wastewater under aerobic conditions, or for the utilization of organic compounds with simultaneous release of orthophosphates under conditions of oxygen deficiency. Seemingly, the absence of other microorganisms with the capacity for synergetic interactions was the underlying cause of the pure strains' failure to share the typical PAO phenotype. The lack of capacity for the uptake and release of orthophosphates was also observed in the mixed cultures. The test performed with activated sludge produced a positive result, typical of the PAO model, which substantiates the presence of PAO in the activated sludge being tested. However, it may as well be assumed that the isolated strains were not PAOs.

Keywords: Polyphosphate accumulating organisms (PAO), activated sludge, sequencing batch reactor (SBR), cultivation methods.