

# Akumulacja fosforu w komórkach szczepów bakteryjnych mieszanej populacji mikroorganizmów typu osadu czynnego

Bernadetta Czerska<sup>1</sup>, Korneliusz Miksch<sup>1</sup>,  
Gerhard J. J. Kortstee<sup>2</sup>, Joanna Surmacz-Górska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii Środowiskowej  
Politechnika Śląska  
Gliwice

<sup>2</sup>Department of Microbiology  
Wageningen Agricultural University  
The Netherlands

## 1. Wprowadzenie

Występujące w ściekach pierwiastki biogenne, w szczególności nadmiar azotu i fosforu, wywołują eutrofizację odbiornika wodnego jeśli w procesie oczyszczania nie są usunięte w wystarczającym stopniu. Dla ochrony istniejących zasobów wodnych przed tymi niepożądanymi skutkami wykorzystuje się zmodyfikowane sposoby biologicznego oczyszczania ścieków. W większości przypadków stosowane jest zintegrowane usuwanie ze ścieków związków organicznych oraz azotu i fosforu metodą osadu czynnego (1,20). W mieszanej populacji typu osadu czynnego przemiany poszczególnych form azotu odbywają się na drodze nitryfikacji i denitryfikacji. Utlenianie azotu amonowego, poprzez azotyny do azotanów prowadzą odpowiednio bakterie z rodzaju *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*. Azotany do azotu gazowego redukują denitryfikujące bakterie heterotroficzne. Grupa ta obejmuje stosunkowo dużą liczbę gatunków. W osadzie czynnym najczęściej występują *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* i inne. Natomiast mechanizm biologicznego usuwania fosforu ze ścieków wiąże się ze zjawiskiem nadmiernego pobierania fosforu przez mikroorganizmy, w wyniku sekwencji warunków beztlenowych i tlenowych (2,5,11,12). Występujące w biocenozie osadu czynnego bakterie rodzaju *Acinetobacter* w sposób szczególnie wyraźny wykazują te właściwości, akumulując w komórkach nadmiar fosforu w formie polifosforanów (4,6,18). Różnorodność mikroorganizmów osadu czynnego stwarza możliwość wykształcenia populacji osadu czynnego pozwalającej na zintensyfikowane oczyszczanie ścieków, natomiast pełne poznanie i wykorzystanie właściwości biocenozy może prowadzić do uproszczenia dotychczas stosowanych metod i systemów (3,12,16).

## 2. Cel eksperymentów

Przyjmuje się zazwyczaj, że odpowiedzialne za biologiczną defosfatację są głównie bakterie *Acinetobacter*, będące bezwzględnie tlenowcami. Ostatnio dowiedziono, że są inne grupy bakterii zdolne do tego procesu, należące jednak do względnych tlenowców (10,19). Niektóre z tych grup mogą realizować zarówno proces denitryfikacji, jak i nadmiernego pobierania fosforu. Dokładniejsze poznanie cech takich mikroorganizmów poszerzyłoby możliwości kontroli i sterowania procesem oczyszczania ścieków. W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę oceny wybranych właściwości takich bakterii, wyizolowanych z mieszanej populacji mikroorganizmów osadu czynnego.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Metody badawcze

Osad czynny do badań nad akumulacją fosforu w warunkach tlenowych i anoksydacyjnych pobrano jednorazowo z modelowego reaktora z systemem naprzemiennego napowietrzania, nazywanego powszechnie w literaturze fachowej skrótem SBR (*Sequencing Batch Reactor*). Reaktor został zaszczerpiony wcześniej osadem czynnym z miejskiej oczyszczalni ścieków w Delft (Holandia), usuwającej w zintegrowany sposób węgiel, azot i fosfor. Bakterie do doświadczeń nad pobieraniem i wydzielaniem fosforu wyizolowane zostały z populacji znajdującej się w reaktorze SBR (10). Zdolność wyizolowanych szczepów bakterii do wzrostu w warunkach tlenowych, anoksydacyjnych i beztlenowych testowano w płynnych pożywkach. Skład płynnych pożywek dla tych eksperymentów przedstawiono w tabelach 1 i 2.

TABELA 1  
ZESTAWIENIE SKŁADNIKÓW PŁYNEJ POŻYWKI

Składnik	Stężenie mg/l		
	hodowla aerobowa	hodowla anaerobowa	hodowla anoksydyczna
CH <sub>3</sub> COONa · 6H <sub>2</sub> O	4000	4000	4000
NH <sub>4</sub> Cl	1500	1500	1500
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	600	600	600
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	60	60	60
EDTA	100	100	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	440	440	440
Tris - HCl	6000	6000	6000
KNO <sub>3</sub>	-	-	3000
mieszanka mikroelementów (tab. 2)	2 ml	2 ml	2 ml
pH	7,0	7,0	7,0

TABELA 2  
ZESTAWIENIE MIKROELEMENTÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD PŁYNNYJ POŻYWKI

Składnik	Stężenie
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1500
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	30
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	120
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	120
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50
KJ	30
$\text{H}_3\text{BO}_3$	150
pH	1,3

Wykonywane oznaczenia analityczne obejmowały pomiary stężenia ortofosforanów (23), azotanów (23), octanu metodą HPLC (8) oraz ilości biomasy poprzez pomiar gęstości optycznej ( $\lambda = 623 \text{ nm}$ ). W celu stwierdzenia obecności polifosforanów w komórkach bakterii zastosowano barwienie NEISSERA (7).

### 3.2. Opis eksperymentów

#### 3.2.2. Pobieranie fosforanów przez wyselekcjonowane szczepy bakterii

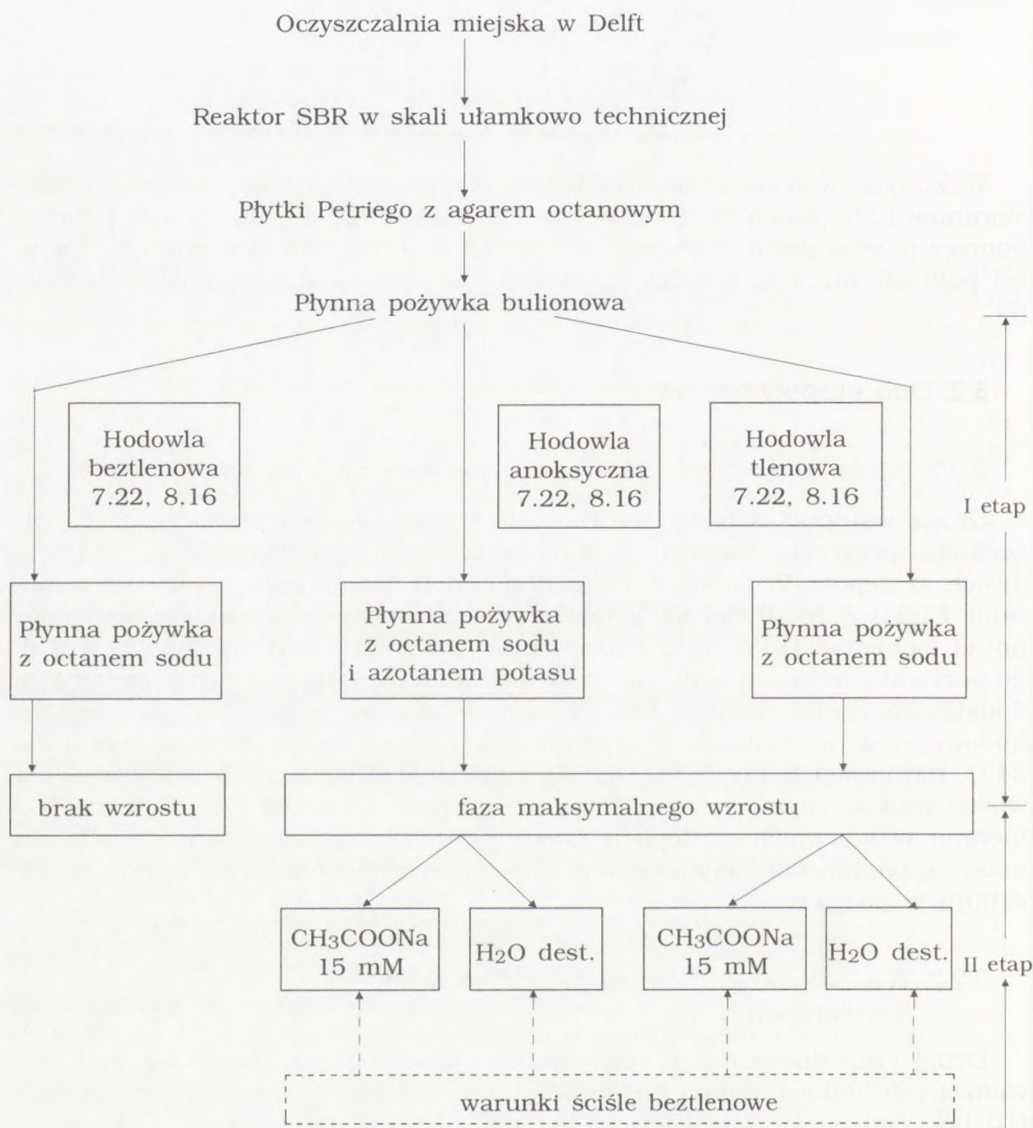
Drogą wstępnej selekcji wybrano do badań pięć szczepów bakterii. Obserwacje przyrostu biomasy i pobierania fosforu ograniczyły tę liczbę do dwóch szczepów. W dalszych eksperymentach oznaczono je umownie numerami 7.22 i 8.16. Wstępną hodowlę prowadzono w płynnej pożywce bulionowej (schemat 1). W fazie maksymalnego wzrostu, kultury przeszczepiono do pożywki z octanem sodu i równolegle do takiej samej pożywki zawierającej dodatkowo azotan potasu (tab. 1 i 2). Populacje w medium bez azotanu hodowano w warunkach tlenowych i ściśle beztlenowych w temperaturze  $24^\circ\text{C}$ , natomiast bakterie w pożywce zawierającej azotan wzrastały w środowisku anoksydacyjnym, w tej samej temperaturze. W trakcie eksperymentu pobierano w kolejnych odstępach czasu próby dla oznaczenia przyrostu biomasy, gromadzenia polifosforanów, stężenia ortofosforanów, azotanów oraz octanu w pożywce.

#### 3.2.3. Wydzielanie fosforanów z komórek bakterii w warunkach ściśle beztlenowych

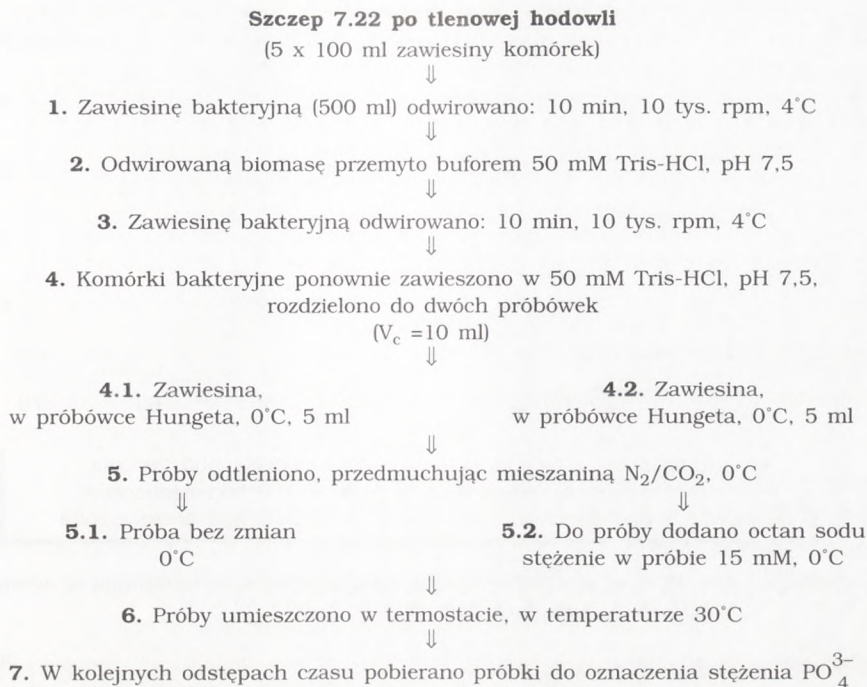
Drugi etap doświadczeń rozpoczęto w fazie maksymalnego wzrostu prowadzonych hodowli bakteryjnych. Materiał komórkowy zebrano i odwirowano (10 tys. rpm,  $4^\circ\text{C}$ ). Uzyskany w ten sposób osad komórkowy, z tlenowego lub anoksydacyjnego środowiska wzrostu (w warunkach ściśle beztlenowych nie

następował rozwój bakterii), przygotowywano według schematu 2., przedstawionego na przykładzie populacji 7.22 z tlenowej hodowli. Po zawieszeniu materiału komórkowego w 15 mM roztworze octanu sodu lub w wodzie destylowanej, próby umieszczono w temperaturze 30°C. W określonych odstępach czasu oznaczano stężenie ortofosforanów wydzielonych do medium z komórek bakteryjnych.

SCHEMAT 1  
UPROSZCZONY OPIS TRYBU POSTĘPOWANIA PODCZAS IZOLACJI BAKTERII  
I EKSPERYMENTÓW DOTYCZĄCYCH POBIERANIA I WYDZIELANIA FOSFORU

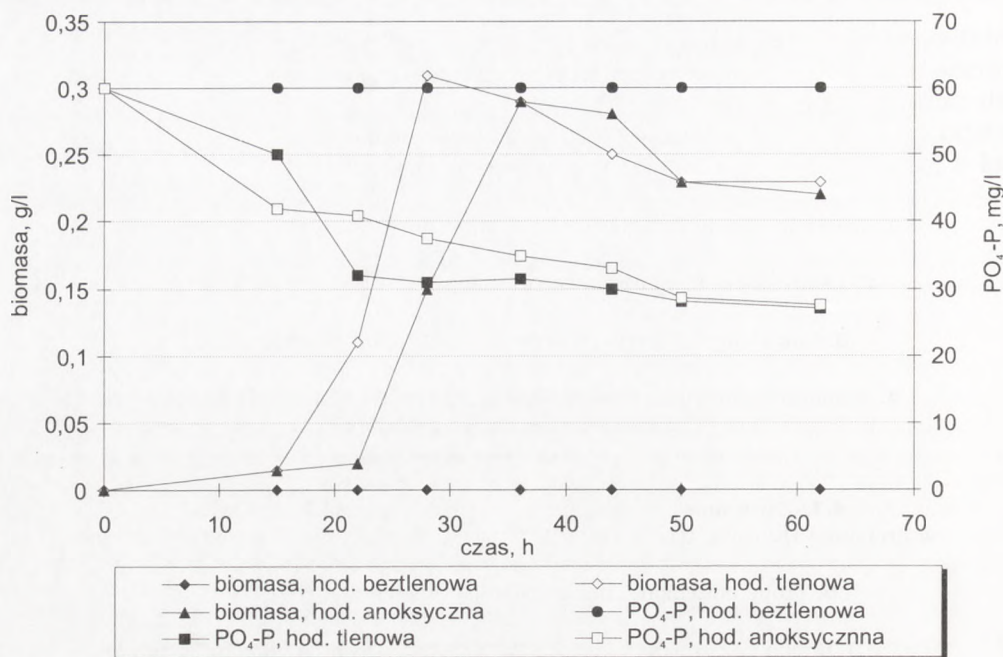


SCHEMAT 2  
 PRZYGOTOWANIE PRÓB DO DRUGIEGO ETAPU EKSPERYMENTU  
 NA PRZYKŁADZIE SZCZEPU 7.22 Z TLENOWEJ HODOWLI

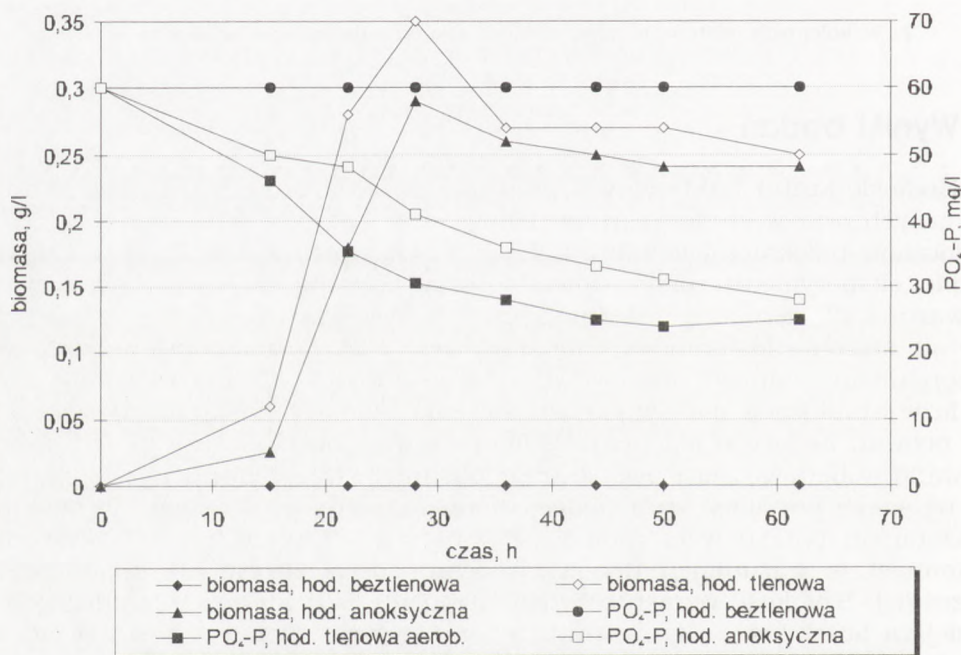


## 4. Wyniki badań

Hodowlę kultur bakteryjnych prowadzono w warunkach tlenowych i anoksydacyjnych oraz w środowisku beztlenowym, w pożywce zawierającej stężenie fosforanów przekraczające naturalne potrzeby wzrostu komórek. W pierwszym etapie eksperymentu przyrostowi biomasy obydwu szczepów hodowanych w warunkach aerobowych i anoksydacyjnych towarzyszyło wyraźne zmniejszenie się stężenia fosforanów w medium (ryc. 1,2). Fosfor pobrany przez mikroorganizmy stanowił dla obydwu szczepów średnio 8% przyrostu biomasy. W fazie stabilizacji maksymalnego stężenia biomasy nastąpiło wyczerpanie się octanu, będącego jedynym źródłem węgla w pożywce. Proces ten obserwowano w hodowli aerobowej z kilkugodzinnym wyprzedzeniem w stosunku do tej samej populacji wzrastającej w warunkach anoksydacyjnych. W medium z azotanem potasu wyczerpanie się substratu nastąpiło po 36 godzinach, natomiast w warunkach tlenowych octan został zużyty już kilka godzin wcześniej. Szybkość wzrostu obydwu populacji była zbliżona, natomiast ich mniejsza liczebność, a tym samym niższe stężenia biomasy zaobserwowano dla hodowli w medium zawierającym azotan. Całkowite zużycie łatwo przyswajalnego octanu i faza maksymalnego wzrostu zbiegały się w czasie, na-

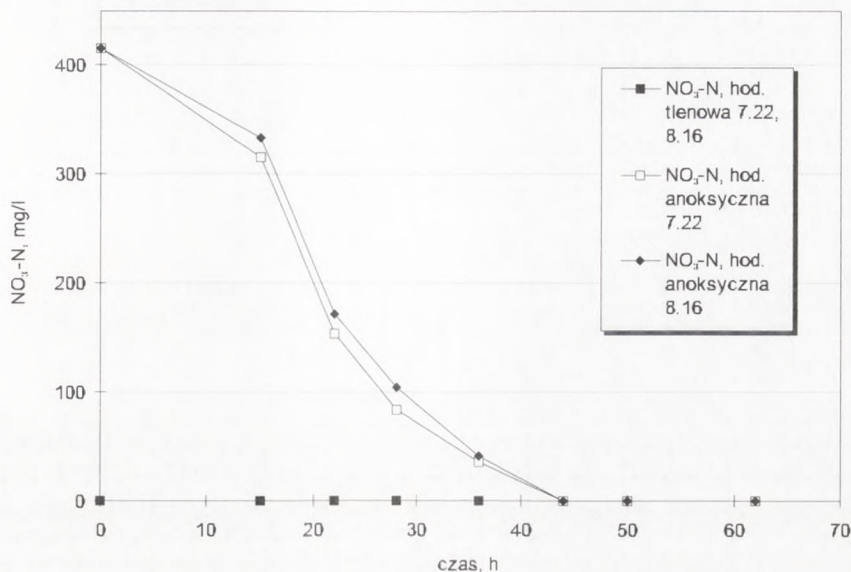


Ryc. 1. Krzywe wzrostu populacji bakteryjnej 8.16 oraz pobierania fosforanów w aerobowych, anaerobowych i anoksydacyjnych warunkach hodowli.

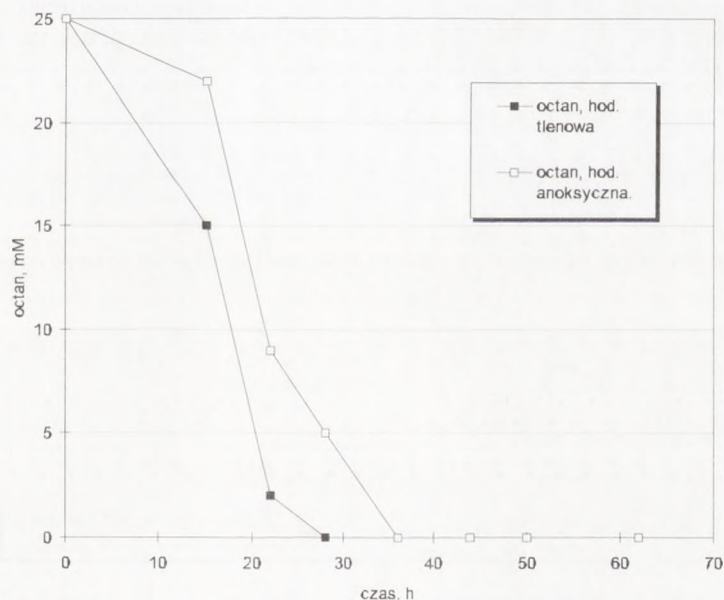


Ryc. 2. Krzywe wzrostu populacji bakteryjnej 7.22 oraz pobierania fosforanów w aerobowych, anaerobowych, anoksydacyjnych warunkach hodowli.

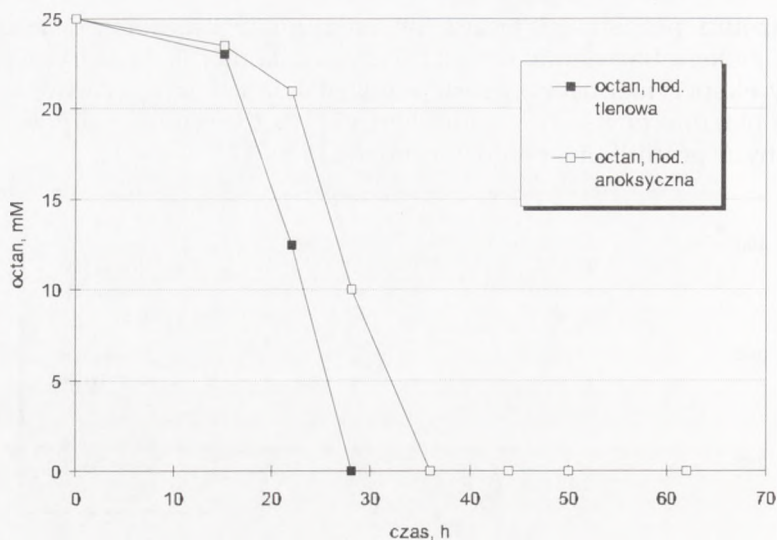
tomiast azotan pozostawał jeszcze w medium w niewielkim stężeniu (ryc. 3,4,5). W efekcie barwienia metodą Neissera komórek bakteryjnych z pierwszej fazy eksperymentu, obserwacje mikroskopowe wykazywały występowanie w cytoplazmie miejsc o ciemnoniebieskim zabarwieniu, odpowiadających wybarwionym granulkom polifosforanowym.



Ryc. 3. Zmiany stężenia azotanów w medium podczas hodowli szczepów 7.22 i 8.16.

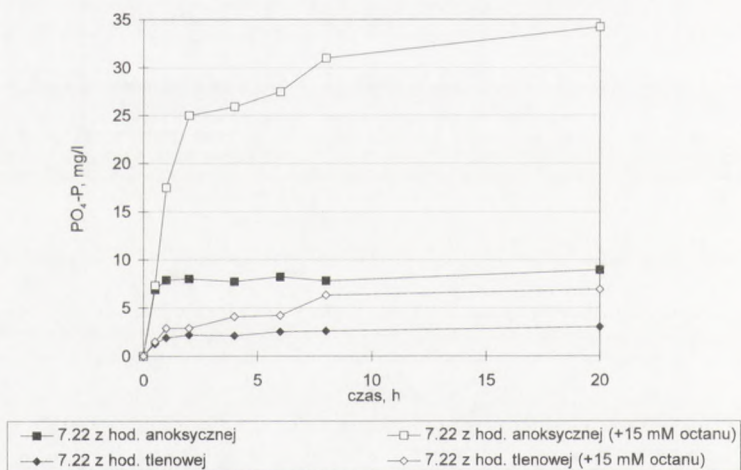


Ryc. 4. Zmiany stężenia octanu w medium podczas wzrostu szczepu 7.22.



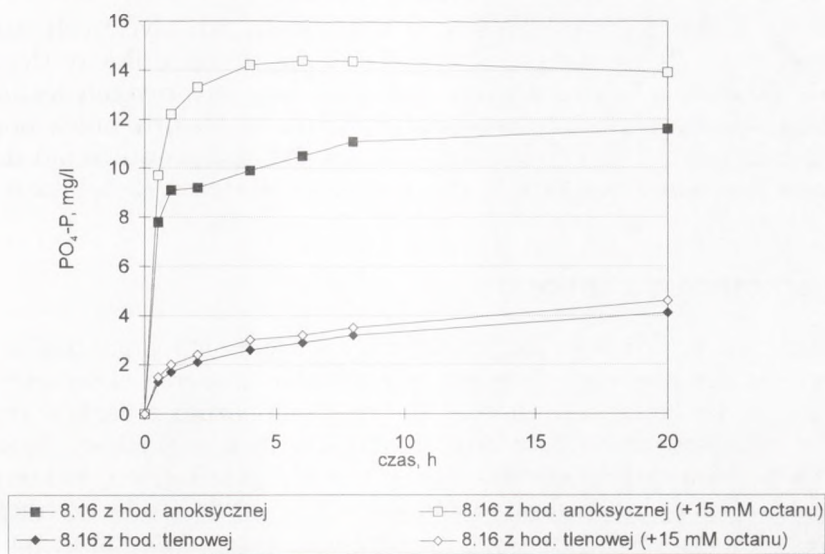
Ryc. 5. Zmiany stężenia octanu w medium podczas wzrostu szczepu 8.16.

W drugim etapie eksperymentu, w konsekwencji zmiany warunków środowiska egzystencji bakterii na ściśle beztlenowe, dla obydwu badanych populacji obserwowano wzrost stężenia fosforanów w medium (ryc. 6,7). Ilość fosforu wydzielona z komórek w warunkach ściśle beztlenowych była każdorazowo wyższa dla prób zawierających dodatkowo źródło węgla organicznego w postaci octanu sodowego. Jedynie dla szczepu 8.16 przeniesionego z hodowli tlenowej do środowiska beztlenowego nie obserwowano wyraźnych różnic w ilości fosforanów wydzielanych do medium w próbach z octanem i bez niego. Uwalnianie fosforu z komórek tej populacji nie stabilizowało się w pełni po dwudziestu



Ryc. 6. Wydzielanie fosforu w warunkach beztlenowych przez bakterie szczepu 7.22 z tlenowej i anoksydacyjnej hodowli.





Ryc. 7. Wydzielanie fosforu w warunkach beztlenowych przez bakterie szczepu 8.16 z tlenowej i anoksycznej hodowli.

godzinach eksperymentu, natomiast szczep 7.22 z tlenowej hodowli nie wykazywał dalszych możliwości uwalniania fosforu po takim samym czasie.

## 5. Dyskusja wyników

Obserwacje populacji 7.22 i 8.16 w czasie hodowli jednoznacznie wskazują, że w warunkach ściśle beztlenowych nie namnażał się żaden z obserwowanych szczepów. Obecność tlenu lub azotanów jako akceptora elektronów w łańcuchu oddechowym jest elementem niezbędnym w procesie oddychania wyizolowanych mikroorganizmów, nie są one zatem ścisłymi beztlenowcami. Jednocześnie obecność rozpuszczonego tlenu nie stanowi warunku koniecznego dla ich rozwoju.

Ubytek fosforanów z medium w etapie hodowli wraz z wynikami barwienia Neissera wskazują na zdolność badanych szczepów do pobierania fosforu nie tylko dla potrzeb syntezy biomasy, ale również do akumulacji fosforu w komórkach bakterii w postaci wielkocząsteczkowych polimerów — polifosforanów. Ta właściwość była dotychczas przypisywana głównie bezwzględnie tlenowcom (4,5,13). Informacje o podobnych obserwacjach dotyczących akumulacji polifosforanów w warunkach anoksycznych znajdują się również w niektórych publikacjach na temat biologicznej defosfatacji (17,19). Obecność octanu, jako źródła węgla stymulowała wydzielanie fosforanów z komórek bakteryjnych w środowisku ściśle beztlenowym. Procentowo, ilość wydzielonego fosforu była niższa, niż wcześniej pobrana podczas wzrostu populacji. Jednocześnie stężenie fosforanów w medium było kilkakrotnie wyższe

dla bakterii po uprzednim wzroście w warunkach anoksydacyjnych, niż ilość wydzielona przez tę samą populację hodowaną w warunkach tlenowych. W świetle doniesień literaturowych o wpływie innych prostych kwasów organicznych i ich soli na intensywność wydzielania fosforu przez populację mikroorganizmów osadu czynnego zasadnym jest przeprowadzenie dalszych testów z zastosowaniem różnych substratów i ich stężeń (3,5,11,20).

## 6. Podsumowanie i wnioski

Populacja osadu czynnego jest mieszanym zespołem mikroorganizmów, w którym zdecydowaną przewagę ilościową mają bakterie. Szereg obserwacji i eksperymentów mikrobiologicznych dotyczących metabolizmu związków organicznych oraz związków azotu i fosforu, znajdujących się w ściekach bytowo-gospodarczych, koncentruje się na specyficznych populacjach bakteryjnych. Dzięki dużej różnorodności drobnoustrojów w biocenozie osadu czynnego, rozkład zanieczyszczeń występujących w ściekach może następować na drodze różnych przemian metabolicznych w jednym reaktorze. Jednakże zapewnienie wówczas optymalnych warunków dla uzyskania maksymalnej efektywności całego procesu stwarza duże trudności. Niejednokrotnie konsekwencją dążenia do poprawy skuteczności procesu oczyszczania ścieków, w już istniejących lub projektowanych systemach, było zwiększenie liczby bioreaktorów lub powiększenie objętości i wydzielenie odpowiednich stref w jednym reaktorze. W tak rozbudowanym ciągu technologicznym zachodzą sekwencyjnie procesy rozkładu związków organicznych, nityfikacji, denityfikacji oraz defosfatacji, w kolejności wynikającej ze specyfiki stosowanego systemu. Usuwanie fosforu na drodze biologicznej łączy się ściśle z sekwencją beztlenowych i tlenowych warunków środowiska. W tych też warunkach odpowiednio zachodzą procesy denityfikacji i nityfikacji. Dotychczas przeważa pogląd, że mikroorganizmy denityfikujące i akumulujące polifosforany stanowią odrębne grupy. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują na obecność w osadzie czynnym bakterii posiadających zdolność prowadzenia zarówno denityfikacji, jak i nadmiernej akumulacji fosforu. Niezależnie od charakteru obserwowanych przemian fosforu, badane populacje wykorzystywały dla potrzeb przyrostu biomasy oraz innych przemian metabolicznych zewnątrzkomórkowe źródło węgla w postaci łatwo przyswajalnego octanu. Możliwość równoczesnej denityfikacji i nadmiernej pobierania fosforu w warunkach anoksydacyjnych zmniejsza zapotrzebowanie na dużą ilość łatwo rozkładalnych związków organicznych, dla uzyskania intensywności przemian, porównywalnej z prowadzonymi przez odrębne gatunki mikroorganizmów. Jednocześnie prostszym i ekonomicznie korzystniejszym zabiegiem może być zastosowanie jednego reaktora i stworzenie w nim optymalnych warunków dla denityfikacji i biologicznej defosfatacji. Dalsze poznanie właściwości i specyfiki grup drobnoustrojów o cechach zaobserwowanych w przeprowadzonych doświadczeniach stwarza możliwość opracowania nowych zintegrowanych i zintensyfikowanych systemów biologicznego usuwania ze ścieków pierwiastków biogennych — azotu i fosforu.

## Literatura

1. Bever K., (1993), *Weitergehende Abwasserreinigung*, R. Oldenburg Verl., 2 Aufl., München-Wien, 101-187.
2. Buchan L., (1983), *Wat. Sci. Tech.*, 15, 87-93.
3. Comeau L., (1987), *Biological Phosphate Removal from Wastewater*, Ed. R. Ramadori, Pergamon Press, Oxford, 39-55.
4. Deinema M., (1980), *FEMS Microbiol. Lett.*, 9, 275-279.
5. Fuchs G., Chen M., (1975), *Microb. Ecol.*, 2, 119-138.
6. Groenestijn J. W., Zuidema M., van de Worp J. J. M., Deinema M., Zehnder A. J. H., (1989b), *Antonie van Leeuwenhoek*, 55, 67-82.
7. Gurr E., (1965), *The rational use of dyes in biology*, Ed. Leonard Hill, London, 216.
8. Houven F. P., Rebers M., Folkerss G. E., Stamss A. J. M., Zehnder A. J. B., (1991), *J. Microbiol. Methods*, 13, 233-230.
9. Kulaev I. S., (1983), *Adv. Microb. Physiol.*, 24, 87-171.
10. Kuba T., Loosdrecht M., (1992), *Netherlands Biotech. Cong.*, Ed. Neth. Biotech. Society, 15.
11. Levin G. V., Shapiro J., (1965), *J. Wat. Poll. Cont. Fed.*, 37, 800-821.
12. Nichols H. A., Osborn D. W., (1979), *J. Wat. Poll. Contr. Fed.*, 51, 557-569.
13. Nolting B., Schmidt K., (1989), *Abwassertechnik*, 5, 28-33.
14. Schön G., (1987), *Biologische Stickstoff- und Phosphorelimination in Abwasserreinigungsanlagen*, Ed. R. Kayser, Veröff. Inst. f. Stadtbauwesen, Braunschweig, 42, 343-348.
15. Sengewein H., (1989), *Das Sauerstoff-Belebungsverfahren: Abwasserreinigung mit reinem Sauerstoff*, Ac. Verl. Richarz, St. Augustin.
16. Somiya J., Tsuno H., (1988), *Wat. Res.*, 22(1), 49-58.
17. Steenbergen K., Vertrachtert H., (1991), *Int. Symp. Env. Biotech.*, Belgium, p. I, 225-230.
18. Streichan M., Golecki J. R., Schön G., (1990), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73, 113-124.
19. Schön G., Streichan M., (1989), *gwf Wasser-Abwasser*, 130(2), 67-73.
20. Tam N. F. Y., Wong Y. S., Leung G., (1992), *Wat. Res.*, 26(9), 1229-1236.
21. Toerien D. F., Gerber A., Lötter L. H., Cloete T. E., (1990), *Adv. in Microbiol. Ecol.*, Ed. K. C. Marschall, 11, 174-230.
22. Tracy K. D., Flamingo A., (1978), *Biological Phosphate Removed from Wastewater*, Ed. R. Ramadori, Pergamon Press, Oxford, 15-26.
23. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, (1976), 14<sup>th</sup> ed., American Public Health Association, Washington D.C.

### Intracellular phosphorus accumulation by bacteria from the population of activated sludge

#### Summary

Two strains of bacteria isolated from activated sludge were tested for their ability to grow under aerobic, anaerobic and denitrifying condition. The microorganisms stored phosphorus intracellularly as polyphosphates in aerobic and anoxic milieu. Both strains appeared to be able to release phosphates anaerobically, which was stimulated by acetate. Particularly high P-release effect was observed in the case of bacteria which grew under anoxic conditions.

#### Key words:

activated sludge, nutrient removal, P-release, polyphosphates, anoxic condition.

#### Adres do korespondencji:

Bernadetta Czernska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki,  
Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, Zakład Biotechnologii Środowiskowej,  
Politechnika Śląska w Gliwicach, ul. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice.