

HODNOCENÍ
AKUMULACE FOSFORU
V BAKTERIÍCH
AKTIVOVANÉHO KALU
POMOCÍ
FLUORESCENČNÍ
MIKROSKOPIE

Dominik Matýsek,
Adéla Puškáčová, Iveta Růžičková,
Jiří Wanner



FOSFOR — BENEFITY A PROBLÉMY

- Důležitý biogenní prvek
- Součást průmyslových hnojiv = převážná část těženého fosforu
- Některé sloučeniny působí jako antikoroziční přísada

- Nadbytky fosforu v recipientu působí eutrofizaci
- Koncentrace na odtoku z ČOV jsou limitovány zákonem
- Způsobuje ucpávání potrubí (srážení struvitu a jiných nerozpustných solí)



ALTERNATIVNÍ ZDROJE FOSFORU

- Těžený fosfor je stále levnější než jakýkoliv jiný zdroj
- Alternativně lze využít čistírenský kal
- Odtok z ČOV = po zakoncentrování pomocí membránových modulů
- Říční nebo rybniční sediment

FORMY FOSFORU V AKTIVOVANÉM KALU

- Velmi závisí na individuálním provozu ČOV
- Dominantní v kalu dvě formy = anorganický nerozpustný fosfor a biologicky vázaný
- V ČR se fosfor nejčastěji sráží (Fe, Al)
- Biologicky vázaný (systémy EBPR)
- Kombinace srážení + biologické odstraňování fosforu

- Na mnoha ČOV, které fosfor pouze srážejí, se v aktivovaném kalu vyskytují bakterie, které jsou schopny fosfor biologicky odstraňovat, pouze nejsou využity

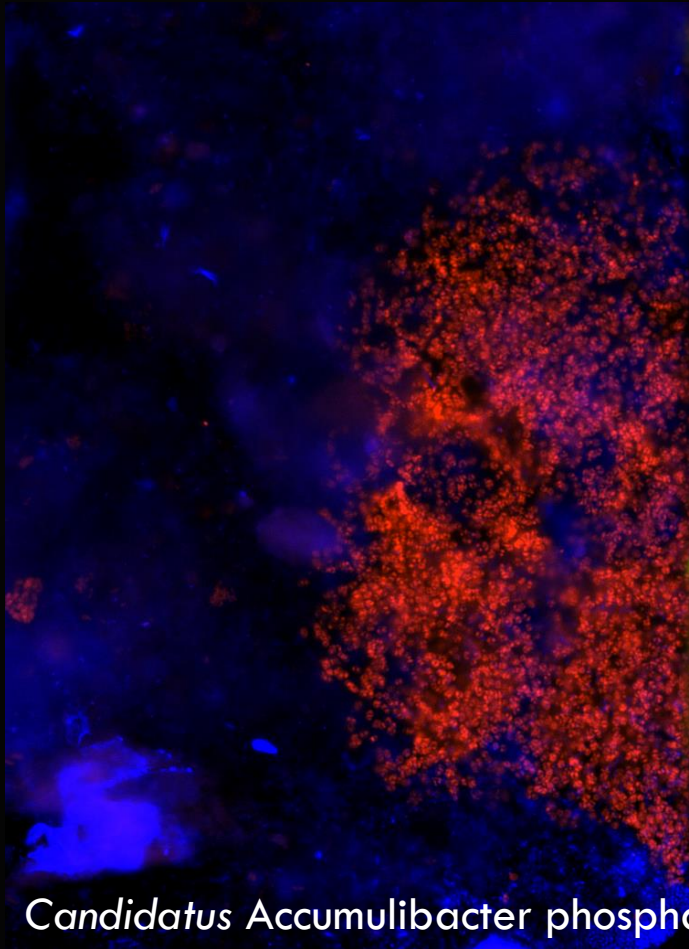
PROČ BIOLOGICKY VÁZANÝ FOSFOR?

- Využívá se metabolismu specifických bakterií
- Separace fosforu spočívá ve střídání kultivačních podmínek
- Rozsáhlá skupina bakterií, které fosfor v daných podmínkách akumulují

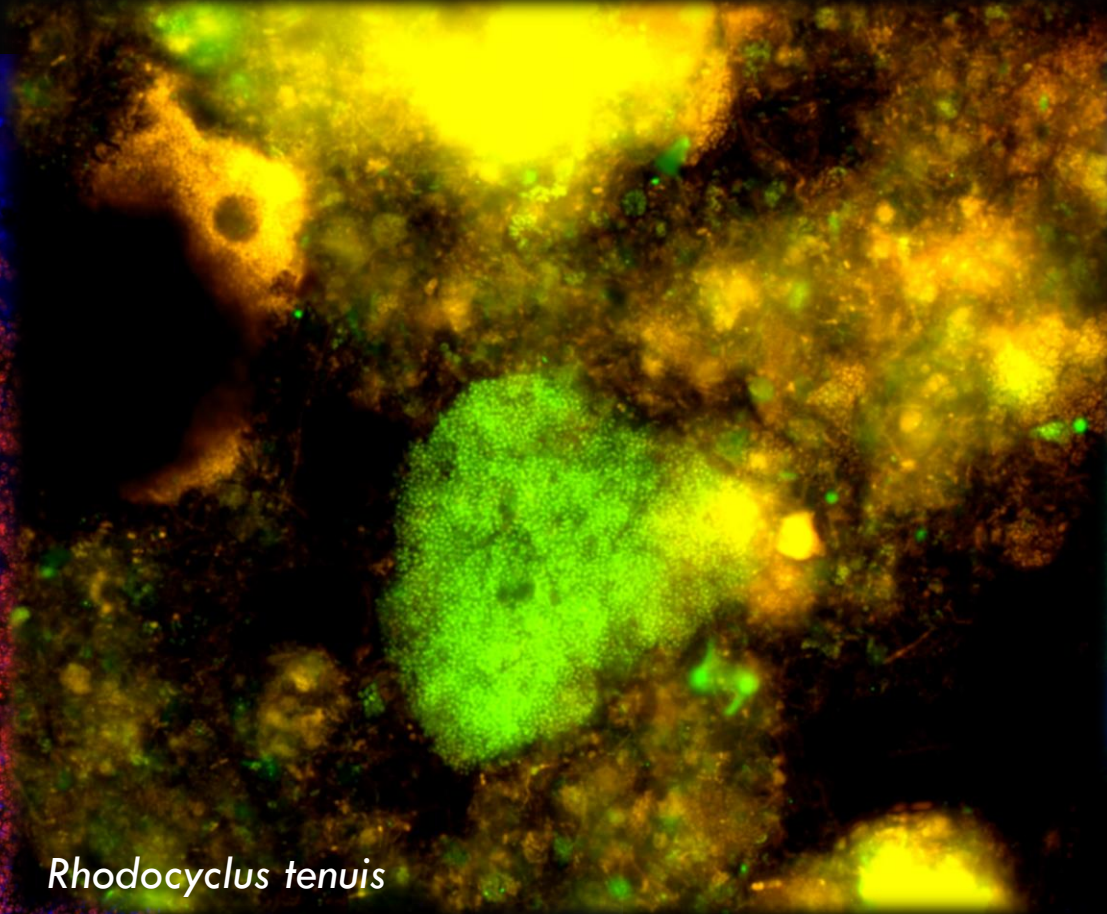
- PAO = polyfosfát akumulující organismy
- DPAO = denitrifikační polyfosfát akumulující organismy
- Domnělé PAO = *Tetrasphaera* spp., *Dechloromonas* spp., *Halomonas* spp., aktinobakteriální PAO

- Není potřeba nadměrné množství srážecích činidel

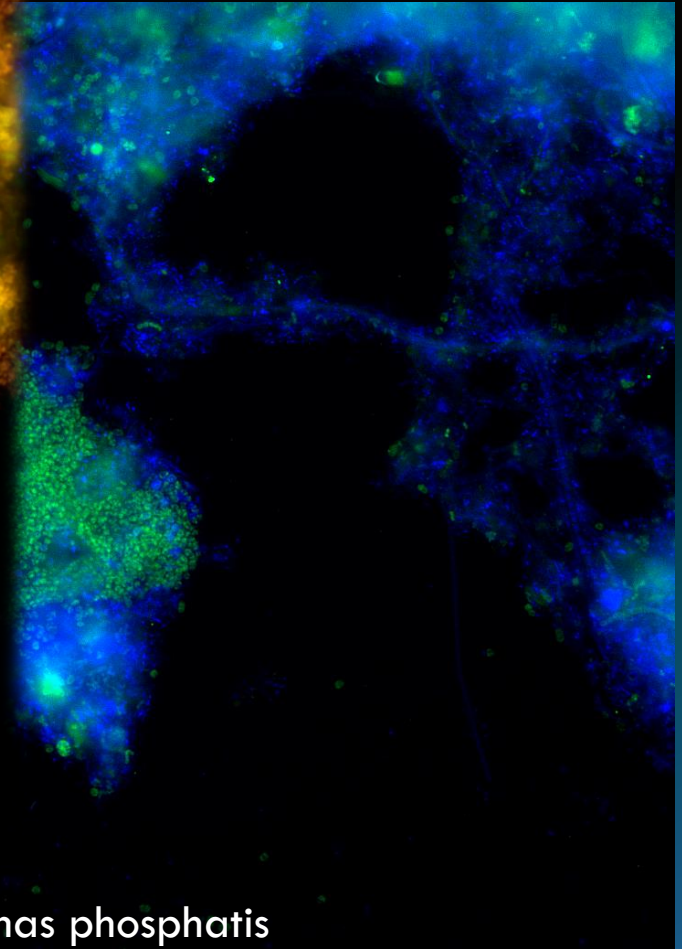
NEJČASTĚJŠÍ ZÁSTUPCI PAO V KALU



Candidatus Accumulibacter phosphatis clade IA



Rhodocyclus tenuis



Candidatus Dechloromonas phosphatis

JAK HODNOTIT OBSAH FOSFORU V KALU

○ Spektrofotometrie

Dostatečné množství vzorku je potřeba zfiltrovat

Řádně vzorek promýt vodou, aby byl odstraněn rozpuštěný fosfor

Sušení, mletí, mineralizace, vybarvení vzorku

○ Mikroskopická analýza

Fixace aktivovaného kalu

Barvení, mikroskopická analýza

Obrazová analýza



FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

- Specifická molekulární metoda
- Její využití není příliš běžné (především v oblasti čištění odpadních vod)

- Umožňuje identifikaci bakterií (metoda FISH)
- Umožňuje identifikaci bakteriálních metabolitů (polyfosfáty, polysacharidy, PHB)
- Je možno identifikovat také vitalitu buněk (Live/Dead kity, respirační aktivita)

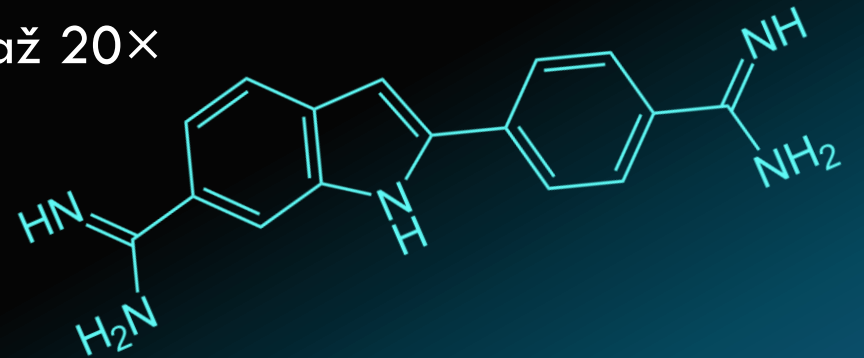
ZNAČENÍ VNITROBUNĚČNÝCH POLYFOSFÁTŮ

- Využívá se látka DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid)
- Běžně se tato látka využívá pro barvení DNA (interkalační barvivo)
- Silná vazba především v místech DNA s obsahem adeninu a thyminu
- Po navázání DAPI na DNA se intenzita fluorescence zvýší až 20×

- Excitační maximum = 358 nm

- **Emisní maximum = 461 nm (po reakci s DNA)**

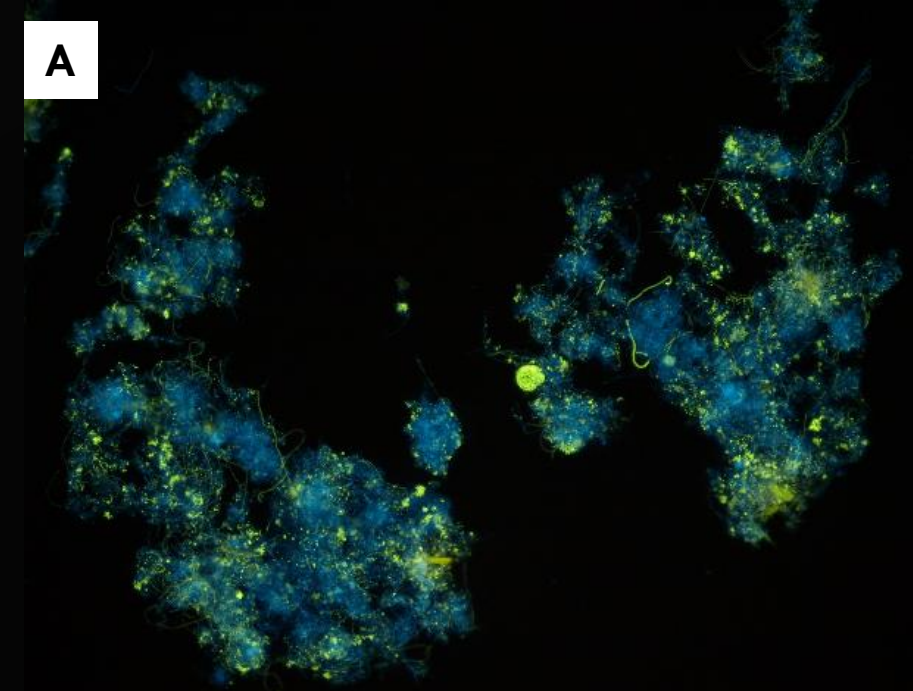
- **Emisní maximum = 526 nm (po reakci s polyfosfátovým řetězcem uvnitř buňky)**



BARVENÍ VNITROBUNĚČNÝCH POLYFOSFÁTŮ

- Byly vybrány dvě metody barvení (PBS, McIlvainův pufr + Triton-X-100)
- Rovněž byly vybrány dvě metody imobilizace (zaschnutí, agarosová destička)
- Pro barvení byl využit roztok DAPI (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; inkubace 30 minut; teplota 4 $^{\circ}\text{C}$)

A



B



FIXACE PREPARÁTŮ

- Požadavky: nedestruktivní, zachování obsahu buněk, neovlivňuje fluorescenci, eliminuje autofluorescenci pozadí
- Byla testována 3 fixační činidla = paraformaldehyd (PFA), ethanol (EtOH), glycerol (GL)

Fixační postup	Použité fixační činidlo	Koncentrace fixačního činidla ve směsi [%]	Doba inkubace [h]	Teplota inkubace [°C]
P1	PFA	1	18	4
P2	GL	10	-	-
P3	PFA	4	4	4
P4	PFA	4	2	4
P5	EtOH	48	-	-
P6	EtOH	50	-	-

FIXACE PREPARÁTŮ

- Všechny fixované preparáty byly barveny v duplikátech
- Následně byla stanovena plocha fosfátových granulí vůči celkové biomase (OA)
- Nejlepší výsledky poskytoval postup P5 (směs vzorek : EtOH = 1:1)

Vybraný fixační postup	Procentuální zastoupení polyfosfátů vůči celkové biomase vzorku [%]
P1	7,2
P2	5,2
P3	6,4
P4	6,5
P5	12,4
P6	0,8

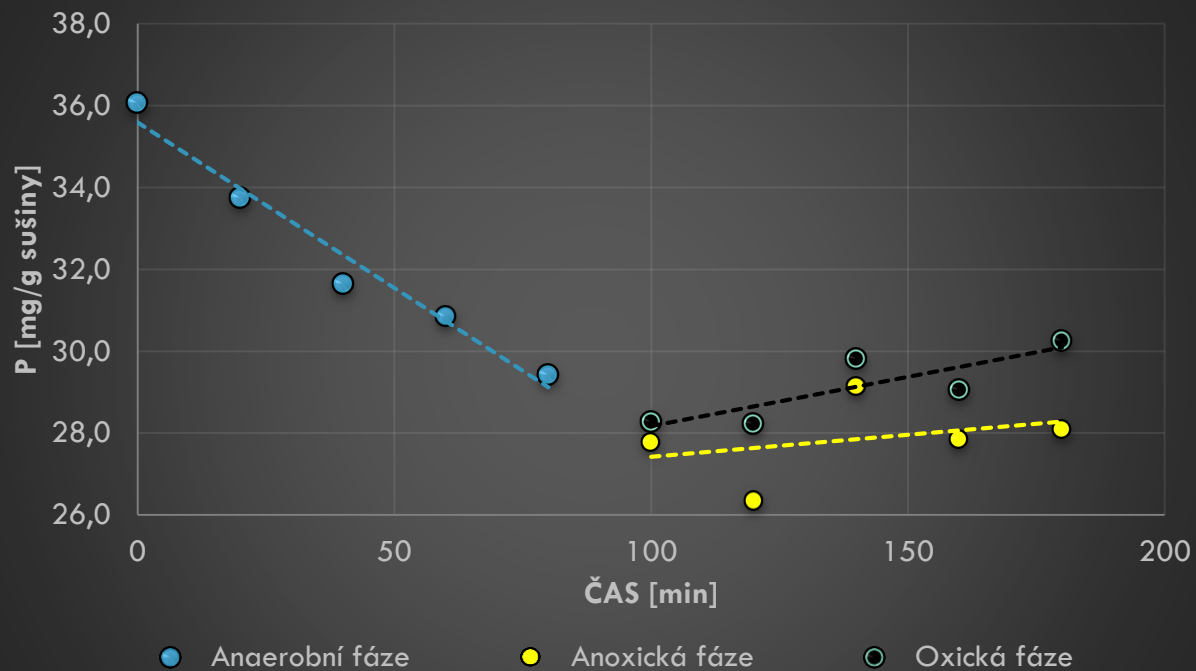
KINETICKÉ EXPERIMENTY

- Prováděny ve dvouplášťových temperovaných nádobách
- Experiment v kinetických celách lze provést za přesně definovaných podmínek
- Střídání anaerobní, anoxické a oxické fáze
- Následně byl stanoven fosfor v pevném podílu spektrofotometricky a mikroskopicky

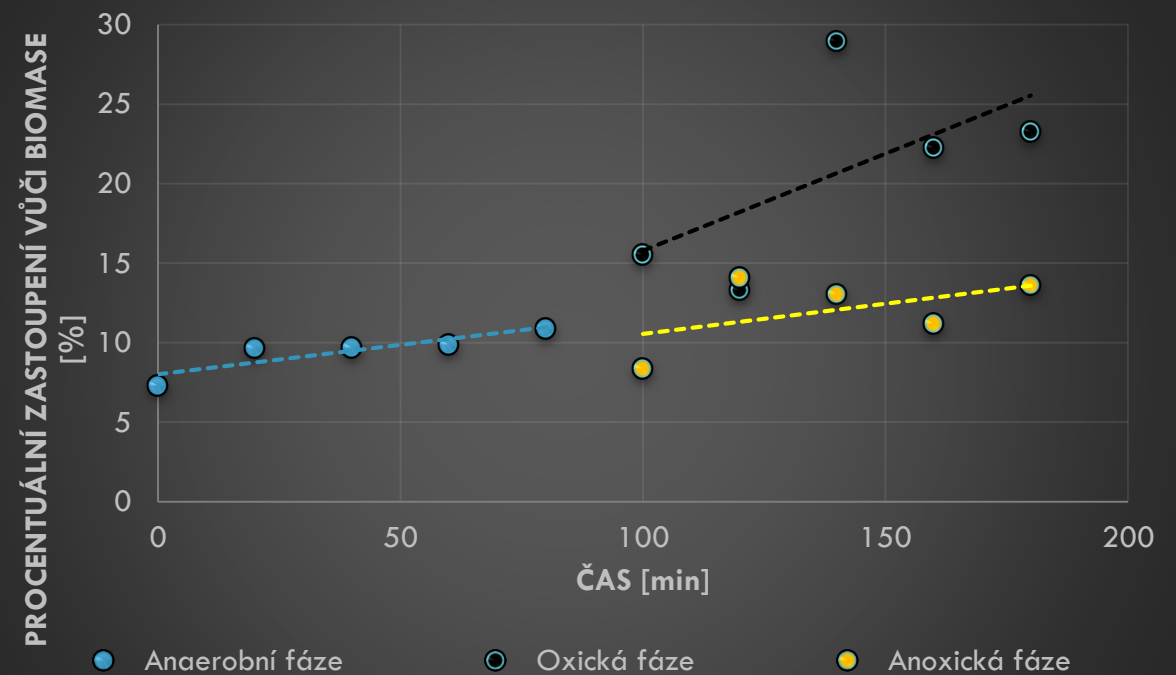


KINETICKÝ EXPERIMENT – S ACETÁTEM

Spektrofotometrie

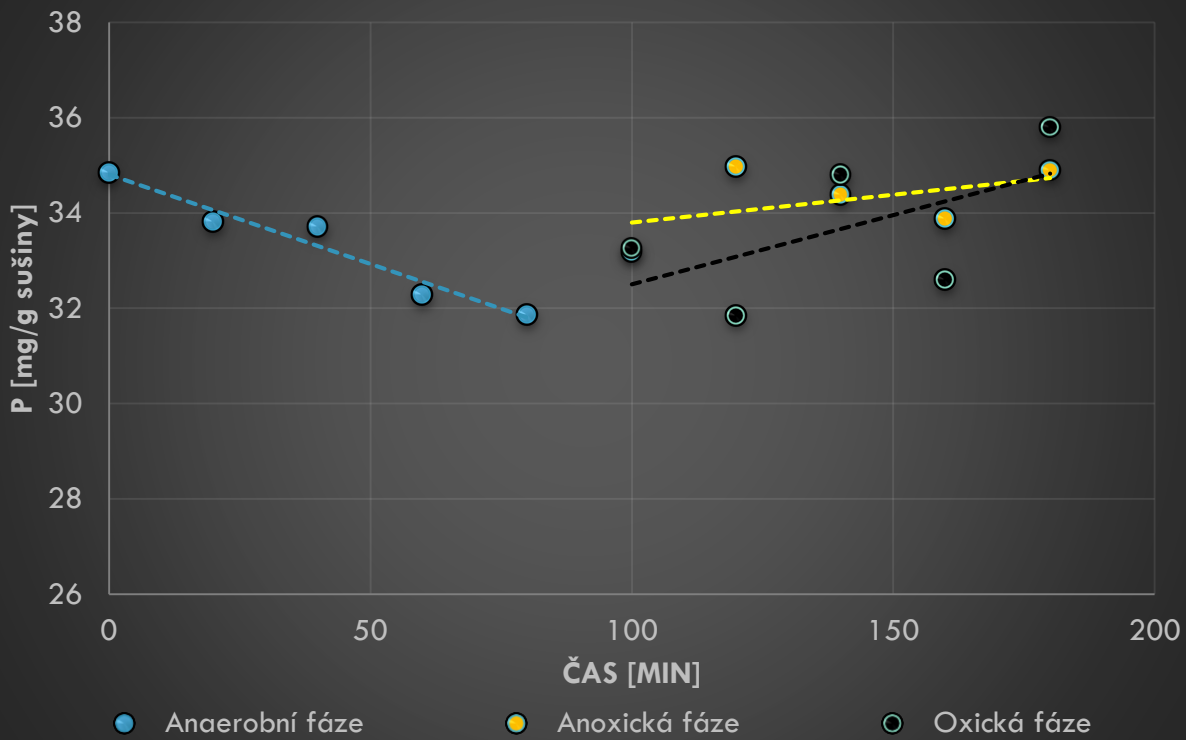


Mikroskopie

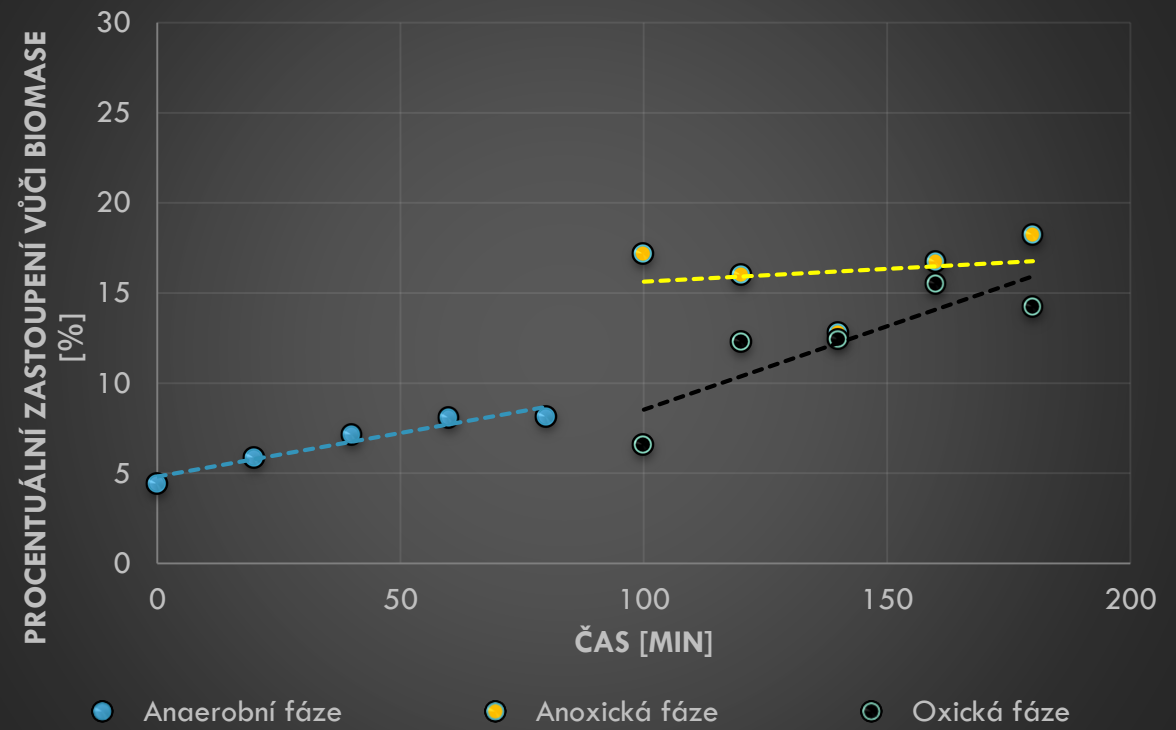


KINETICKÝ EXPERIMENT – S GLUKOSOU

Spektrofotometrie



Mikroskopie



POROVNÁNÍ METOD

Spektrofotometrie

- Obsah celkového fosforu v kalu
- Neposkytuje relevantní informace o aktuálním dění v aktivovaném kalu
- Pokud ČOV odstraňuje fosfor chemicky i biologicky, nelze získané výsledky odlišit
- Biologické uvolňování fosforu v anaerobii nelze pozorovat, jelikož ruší sraženiny Fe, Al a další.

Fluorescenční mikroskopie

- Obsah biologicky vázaného fosforu
- Na základě výsledků lze optimalizovat podmínky provozu
- Zatím nebyla nalezen přepočební vztah mezi obsahem v mg/g a procentuálním zastoupením fosforu v biomase
- Lze pozorovat anaerobní uvolňování fosforu, které je klíčové pro systémy EBPR

MIKROBIÁLNÍ KOMUNITA AKTIVOVANÉHO KALU

- Metoda fluorescenčního značení polyfosfátů je vhodná v kombinaci s FISH
- Pro anaerobní oblast je typické uvolňování buněčného fosforu
- V případě optimalizace procesu je dobré kal analyzovat oběma metodami

Anaerobní podmínky	Anoxické podmínky	Oxické podmínky	Organismus
Uvolňování	-	Akumulace	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>
Uvolňování	Akumulace	-	<i>Candidatus Accumulibacter IA, IIA</i>
Akumulace/Uvolňování	-	Akumulace/Uvolňování	<i>Paracoccus denitrificans</i>
Uvolňování	-	Akumulace	<i>Tetrasphaera spp.</i>

ZÁVĚR

- Fluorescenční mikroskopie poskytuje informace o stavu biologického stupně ČOV pro odstraňování fosforu
- Při posuzování stavu ČOV může být konkurenční pro spektrofotometrii
- Fluorescenční značení je rychlá a levná metoda
- Není potřeba využívat drahé a nebezpečné chemikálie
- Při správné fixaci lze vzorek archivovat

DĚKUJI ZA POZORNOST

Kontakt: matysekd@vscht.cz