

Výskyt bakterií *Tetrasphaera* spp. v aktivovaném kalu

Occurrence of bacteria of genus *Tetrasphaera* in activated sludge

Kateřina Kohoutová¹; Ing. Iveta Růžicková, Ph.D.²; Ing. Dominik Matýšek³



INFORMACE O ČLÁNKU

DOI 10.35933/ENTECHO.2023.001

HISTORIE

Datum doručení: 6. 2. 2023

Datum revize: 1. 5. 2023

Datum akceptace: 4. 5. 2023

AFILACE

Ústav technologie vody a prostředí
VŠCHT Praha, Technická 5,
166 28 Praha 6

¹ +420 606 179 545;

kohoutou@vscht.cz;

ORCID ID 0000-0001-6711-305

² iveta.ruzickova@vscht.cz;

ORCID ID 0000-0001-6125-7465

³ matysek@vscht.cz;

ORCID ID 0000-0002-9760-56412

KLÍČOVÁ SLOVA

Biologické odstraňování fosforu;
polyfosfát-akumulující organismy;
fluorescenční *in-situ* hybridizace;
rod *Tetrasphaera*

KEYWORDS

Biological phosphorus removal;
polyphosphate-accumulating
organisms; fluorescent *in-situ*
hybridization; genus *Tetrasphaera*

ABSTRAKT

Fosfor lze z odpadní vody odstraňovat metodou chemického srážení, která je v České republice obvykle upřednostňována, anebo biologicky pomocí polyfosfát-akumulujících organismů. Do skupiny těchto organismů patří i rod bakterií *Tetrasphaera*. Se znalostí zastoupení významných polyfosfát-akumulujících organismů by mohlo být možné na čistírnách na našem území nastolit vhodné podmínky pro zvýšené biologické odstraňování fosforu.

Práce je tedy věnována zejména sledování výskytu bakterií rodu *Tetrasphaera* na čtyřech různých čistírnách odpadních vod v České republice pomocí metody fluorescenční *in-situ* hybridizace za využití pěti oligonukleotidových specifických sond a následné obrazové analýzy. Získané výsledky jsou dány do kontextu se znalostí podoby technologické linky příslušné čistírny odpadních vod. Tyto informace budou v pozdějším výzkumu posouzeny s ohledem na možné zapojení biologického odstraňování fosforu na českých čistírnách.

ABSTRACT

Levels of phosphorus in wastewater can be reduced using chemical precipitation or biologically by polyphosphate-accumulating organisms. The chemical method is preferred over the biological in the Czech Republic. Polyphosphate-accumulating organisms include, besides others, the bacterial genus *Tetrasphaera*. With the knowledge of the occurrence of significant polyphosphate-accumulating organisms, it could be possible to establish appropriate conditions for enhanced biological phosphorus removal.

Thus this study focuses mainly on monitoring the genus *Tetrasphaera* on four different wastewater treatment plants in the Czech Republic using fluorescence in situ hybridization with five specific oligonucleotide probes followed by image analysis. The results are compared with the forms of technological lines of wastewater treatment plants. The possibility of the application of enhanced biological phosphorus removal in Czech wastewater treatment plants will be evaluated in further research.

1 Úvod

Fosfor je nezbytnou součástí vzniku i existence všech živých organismů, řadí se mezi tzv. makrobiogenní prvky. Vysoká koncentrace sloučenin obsahujících tento nutrient může ale výrazně znesnadnit či dokonce znemožnit využití vody pro vodárenské účely nebo zapříčinit eutrofizaci povrchových vod (Henze et al., 2008).

Splaškové vody jsou jedním ze dvou hlavních vstupů fosforu do povrchových vod, tím druhým jsou splachy z polí (Muszyński and Miłobędzka, 2015). Snižování množství sloučenin tohoto prvku v odpadních vodách hraje tedy stěžejní roli při ochraně vodního životního prostředí.

Množství fosforu v odpadní vodě lze snížit biologickými nebo chemickými metodami. V České republice se většinou upřednostňují postupy chemické. Těmi je nejčastěji myšleno srážení přídavkem solí (obvykle síranů) železa či hliníku. Tyto metody vyžadují velké množství chemikálií, což vede k tvorbě chemického kalu, s nímž se nakládá podstatně obtížněji než s kalem biologickým (Bindzar et al., 2009).

Naproti tomu, na všech čistírnách odpadních vod (ČOV) s biologickým stupněm vždy dochází k alespoň částečnému odstranění fosforu

z odpadní vody. Tento prvek je jakožto nutrient zabudován do nově vznikající biomasy, která se později odstraní jako přebytečný kal. Sušina aktivovaného kalu z konvenčních ČOV obsahuje přibližně 2 % fosforu (Seviour and Nielsen, 2010).

Procesem zvýšeného biologického odstraňování fosforu lze ale tento krok zintenzivnit. Obsah fosforu v sušině aktivovaného kalu může potom dosáhnout > 10 % (Seviour and Nielsen, 2010). Mechanismus zvýšeného biologického odstraňování fosforu (EBPR z anglického enhanced biological phosphorus removal) je proces běžně zařazovaný do linek ČOV po celém světě (Henze et al., 2008; Nguyen et al., 2011). Jedná se totiž o poměrně levný, efektivní a environmentálně udržitelný způsob odstranění fosforu z odpadních vod (Nguyen et al., 2011). V EBPR se využívá polyfosfát-akumulujících bakterií (PAO), které v důsledku pro ně nezbytného střídání anaerobních a aerobních kulturačních podmínek získávají oproti jiným skupinám bakterií selektivní výhodu (Seviour and Blackall, 1999).

Jedním z hlavních zástupců skupiny PAO je i rod bakterií *Tetrasphaera*. Informace o jejich výskytu by mohla napovědět o vhodnosti zavádění EBPR na různých technologických linkách ČOV.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Nejobvyklejšími zástupci skupiny PAO, které hrají klíčovou roli při biologickém odstraňování fosforu na ČOV, jsou *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (dále jako *Ca. Accumulibacter*), organismy příbuzné rodu *Tetrasphaera* (*Actinobacteria*) (dále jako *Tetrasphaera*) a *Dechloromonas* (Zhao et al., 2022).

Ca. Accumulibacter byl dlouho považován za hlavní organismus v EBPR a zastával roli modelového organismu s metabolismem typickým pro PAO (Nguyen et al., 2011).

Výzkumy z posledních let nicméně poukazují na významný podíl rodu *Tetrasphaera* na fungování systémů zvýšené bioakumulace fosforu (Liu et al., 2019).

Tento rod Gram-pozitivních organoheterotrofních organismů byl poprvé identifikován na počátku 21. století (Liu et al., 2019). Od té doby se stává čím dál více předmětem výzkumů spojených s biologickým odstraňováním fosforu. Podle dosavadních zjištění se rod *Tetrasphaera* dělí do tří větví (kladů). Izolováno a blíže popsáno bylo dosud osm druhů, z nichž byly všechny na základě pozorování označeny za domnělé PAO. Těmito druhy jsou *T. japonica*, *T. elongata*, *T. australiensis*, *T. duodecadis*, *T. jenkinsii*, *T. vanveenii*, *T. veronensis* a *T. remsis* (Singleton et al., 2022; Zhao et al., 2022).

Bakterie rodu *Tetrasphaera* mají velmi pestrou morfologii. Nejčastěji se vyskytují jako koky v tetrádových klastrech, jako krátké tyčinky, větevnaté útvary, shluky koků či jako vlákna. Mají ale i další podoby (Nguyen et al., 2011; Marques et al., 2018; Liu et al., 2019). Pozorované morfologie uvedené pro využití oligonukleotidové sondy Nguyenem et al. (2011) a Marquesem et al. (2018) jsou uvedené v **Tab. 2.1**.

Jako metabolický model rodu *Tetrasphaera* byl v roce 2013 představen metabolismus *T. elongata*, přičemž jako substrát byla využita glukóza. Ukázalo se, že v anaerobních podmínkách přijímají *Tetrasphaera* glukózu a uchovávají ji v podobě glykogenu. Energie pro tento proces pochází z hydrolyzy vnitrobuněčného polyfosfátu. Za aerobních podmínek dochází naopak k rozkladu glykogenu za příjmu fosfátu a jeho uchování ve formě polyfosfátu. Glykogen tedy zastupuje roli PHA, které mají tutéž funkci u jiných PAO (Kristiansen et al., 2013). Přítomnost genů zapojených pro příjem glukózy a aminokyselin byla potvrzena genovou analýzou. Příjem těchto látek je mimochodem i odlišujícím prvkem od metabolismu *Ca. Accumulibacter* (Kristiansen et al., 2013).

Zmíněný model rozporují ve své studii Fernando et al. (2019), kteří za stejných podmínek v *Tetrasphaera* nedetekovali pomocí Ramanovy mikrospektroskopie glykogen, zato zaznamenali přítomnost intracelulárních volných aminokyselin. Zpochybňuje jej do jisté míry i skutečnost, že bylo navrženo modelový organismus *T. elongata* překlasiﬁkovat mimo rod *Tetrasphaera*, je tedy otázka, do jaké míry je dostatečně reprezentativním druhem (Close et al., 2021).

V roce 2015 byl představen další metabolický model založený na glycinu, jakožto jediném zdroji uhlíku. Za anaerobních podmínek docházelo údajně k akumulaci vnitrobuněčného glycinu a v malých koncentracích též glutaminu, serinu a alaninu. Tyto metabolity byly

poté v aerobních podmínkách zdrojem energie pro příjem fosforu (Nguyen et al., 2015). V téže studii nebyly identifikovány glykogen ani PHA (Nguyen et al., 2015).

Obdobně jako v metabolismu *Ca. Accumulibacter* byl i u *Tetrasphaera* identifikován citrátový cyklus a stejný mechanismus syntézy i odbourávání polyfosfátu (Nguyen et al., 2011; Liu et al., 2019).

Jak je z poznatků výše patrné, disponují *Tetrasphaera* širokým spektrem možností využití látek jako zdroje uhlíku i energie (glukóza, aminokyseliny, atd.). To pro ně představuje zásadní výhodu oproti jiným organismům včetně *Ca. Accumulibacter* a umožňuje jim to přežít v dynamickém prostředí, kterým je prostředí ČOV (Zhao et al., 2022). Je to zároveň i důvodem absence obecného modelu jejich metabolismu (Liu et al., 2019). Srovnání metabolismu *Tetrasphaera* a *Ca. Accumulibacter* a metabolismu odstraňování fosforu *Tetrasphaera* v přítomnosti různých substrátů je znázorněno na **Obr. 2.1** (Zhao et al., 2022).

V mnoha výzkumech se ukazuje, že *Tetrasphaera* jsou schopny fermentovat glukózu a aminokyseliny na těkavé mastné kyseliny (Zhao et al., 2022). Získávají tím energii, jež mohou využít jako přídavný či alternativní zdroj pro svůj růst i pro hydrolyzu polyfosfátu. Produkty fermentace pak pravděpodobně využijí například *Ca. Accumulibacter* (Marques et al., 2017). K takové formě spolupráce může docházet i v odpadních vodách s větším podílem průmyslových odpadních vod, které obvykle obsahují pro *Ca. Accumulibacter* nedostatečné množství těkavých mastných kyselin.

Odpadní vody obsahují obvykle 25–35 % bílkovin a 15–25 % polysacharidů, které mohou být za anaerobních podmínek hydrolyzovány. Samy *Tetrasphaera* produkují exoenzymy, které jsou schopné hydrolyzovat škrob. Vznikající glukóza a aminokyseliny mohou být dále zfermentovány *Tetrasphaera* na jednodušší látky. Tato jejich schopnost je proto v aktivovaném kalu velmi zásadní (Nielsen et al., 2010).

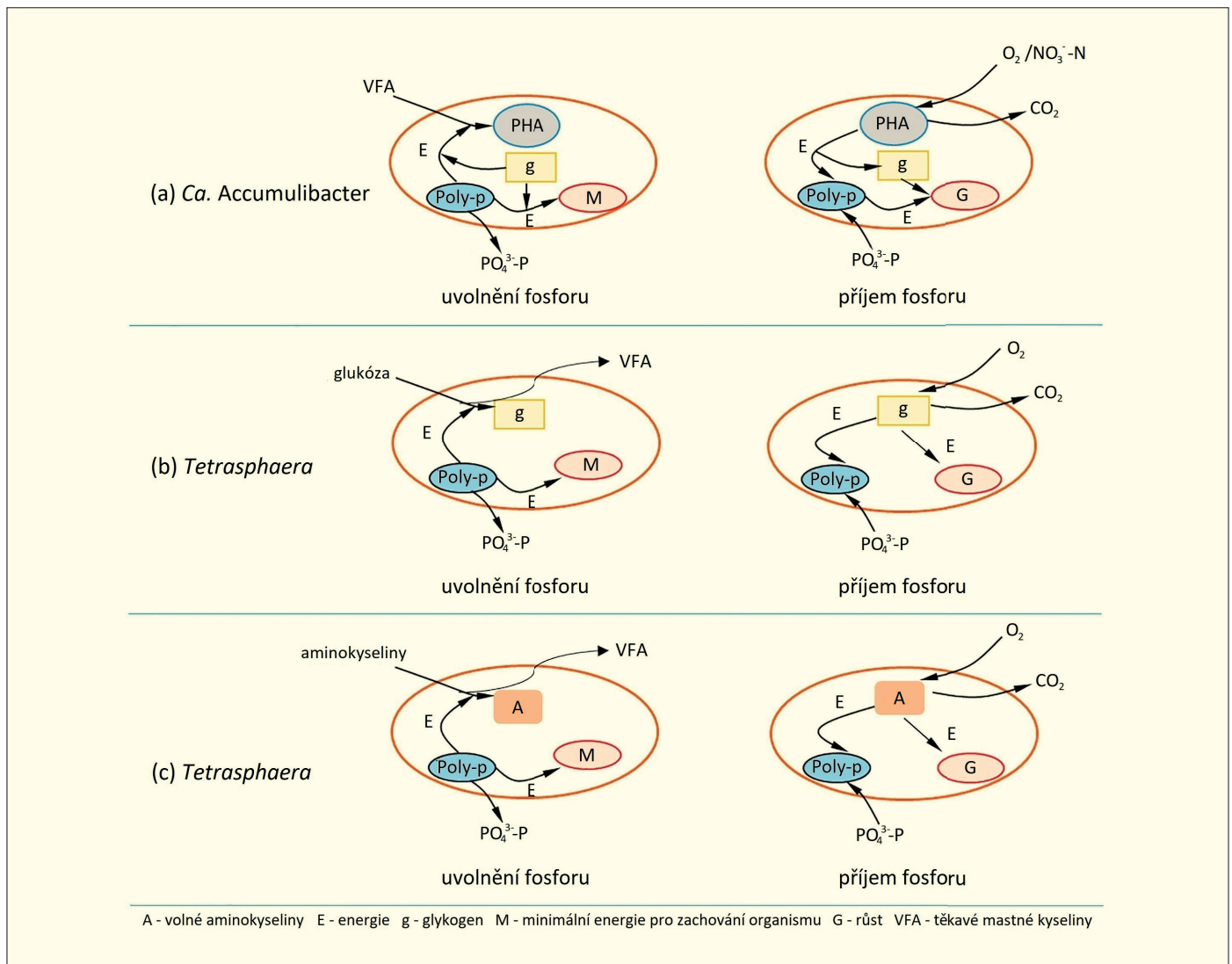
Díky fermentačním schopnostem *Tetrasphaera* dochází ke stabilizaci EBPR systému, a to i navzdory tomu, že jejich schopnost bioakumulace fosforu se může v daný moment významně snížit.

Tetrasphaera jsou v EBPR systémech často dominantními PAO napříč různými státy (Singleton et al., 2022), podle Marquese et al. (2017) a Liu et al. (2019) mohou tvořit až 30 % celkové biomasy těchto systémů. Podíl *Tetrasphaera* na biologickém odstraňování fosforu ale nelze vyvozovat pouze z informace o četnosti těchto organismů na ČOV (Liu et al., 2019). Specificky u *Tetrasphaera* je také nutné brát v potaz jejich nepřímou účast na bioakumulaci fosforu poskytováním vhodného substrátu pro další PAO fermentaci makromolekul (Zhao et al., 2022).

Ukazuje se, že *Tetrasphaera* by mohly mít potenciál uchovávat stejné množství fosfátu na objem buňky jako *Ca. Accumulibacter*, ne-li větší (Fernando et al., 2019; Liu et al., 2019). Close et al. (2021) nicméně pozorovali, že obohacená kultura (95 % *Tetrasphaera* sestávající zejména ze zástupců kladu 2) nedosahuje úplného odstranění fosforu bez ohledu na substrát. Naopak v kultuře se 70 % *Tetrasphaera* a 22 % *Ca. Accumulibacter*, kde z rodu *Tetrasphaera* převažovaly klady

Tabulka 2.1: Přehled nejčastěji pozorovaných morfologií cílových zástupců rodu *Tetrasphaera* (Nguyen et al., 2011; Marques et al., 2018)

název sondy	klad	morfologie dle Nguyena et al. (2011)	morfologie dle Marquese et al. (2018)
Tet1-266	1	klastry tetrád, větevnaté struktury	tenká vlákna, větevnaté struktury, koky v tetrádách
Tet2-892	2	klastry tetrád, větevnaté struktury, vlákna	vlákna, tetrády, tyčinky, větevnaté struktury
Tet2-174	2	klastry tetrád, tenká vlákna	větevnaté struktury, vlákna
Tet3-654	3	klastry tetrád	N/A
Tet3-19	3	klastry tetrád, větevnaté struktury, krátké tyčinky ve shlucích	větevnaté struktury, vlákna



Obrázek 2.1: Schéma metabolismu odstraňování fosforu *Ca. Accumulibacter* a *Tetrasphaera* s využitím různých substrátů (Zhao et al., 2022) (upr.)

1 a 3, zodpovídaly *Tetrasphaera* za přibližně 80 % odstranění fosforu (Marques et al., 2017). Evidentně tedy záleží i na zastoupení v rámci jednotlivých kladů.

Na reálných ČOV se rody skupiny PAO nevyskytují separátně, ale vždy dva, tři koexistují a kooperují spolu. Systém je pak výrazně stabilnější, účinnější a méně závislý například na koncentraci nízkomolekulárních mastných kyselin na přítoku odpadní vody. Při optimalizaci EBPR procesu je tedy třeba dbát mimo jiné i na mikrobiální zastoupení PAO v kalu, jejich fyziologii a metabolismus (Zhao et al., 2022).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část byla zaměřená na stanovení relativního množství *Tetrasphaera* metodou fluorescenční *in-situ* hybridizace s následnou obrazovou analýzou v softwaru DAIME (Daims et al., 2006) ve vzorcích aktivovaného kalu ze 4 ČOV v České republice, které se lišily uspořádáním technologické linky. Všechny čtyři preparáty byly připraveny v duplikátu a hybridizovány s pěti specifickými oligonukleotidovými sondami. Obrazové analýze bylo podrobeno vždy 20 náhodných manuálně pořízených a následně upravených fotografií každého vzorku jednotlivě po hybridizaci s každou sondou. Celkem bylo tedy pro tuto práci vyhodnoceno 400 fotografií vzorků.

Celý postup fixace, hybridizace a kontrastování vycházel s drobnými úpravami z postupu publikovaného Nielsenem et al. (2009).

3.1 Použité vzorky

V experimentální části této práce byly analyzovány 4 vzorky pocházející z ČOV s rozličnou podobou technologických linek ČOV.

Vzorek 1 – Systém R-An-D-N

Řazení zón anaerobní, anoxické a oxické je typickým pro EBPR systémy, které jsou zavedeny pro biologické odstraňování fosforu a dusíku. Zároveň je zde zařazena i regenerační zóna.

Vzorek 2 – Systém R-D-N

V systémech s předřazenou denitrifikací a regenerací vratného kalu dochází k biologickému odstraňování dusíku. Regenerační stupeň zvyšuje celkovou účinnost odstranění dusíkatých látek (Bindzar et al., 2009). Na této ČOV bylo rovněž zařazeno chemické srážení fosforu.

Vzorek 3 – Systém D-N

Aktivační systémy s předřazenou denitrifikací slouží k biologickému odstraňování sloučenin dusíku. V analyzovaném případě bylo navíc využito chemického srážení fosforu.

Vzorek 4 – Systém s odstraňováním organických sloučenin

Jedná se o nejjednodušší podobu mechanicko-biologických ČOV. Aktivační nádrž není členěna na dílčí části a je provzdušňována.

Všechny vzorky byly odebrány z provzdušňované, a tedy dobře promíchávané, části aktivační nádrže, čímž bylo zajištěno reprezentativní

zastoupení veškeré populace, a zároveň pod hladinou, čímž se předešlo kontaminaci vzorku případným materiálem plovoucím na hladině. Fixace získaného materiálu proběhla do 24 hodin po odběru a do analýzy byl vzorek skladován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Fixace vzorků

Do 2 ml zkumavky bylo odpipetováno 0,5 ml vzorku aktivovaného kalu. Následně bylo přidáno 1,5 ml rozmraženého roztoku paraformaldehydu (4%). Směs byla zlehka promíchána a po dobu tří hodin ponechána inkubovat při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla po dobu osmi minut při 3 500 g centrifugována. Byl odstraněn supernatant a kalová peleta byla resuspendována v 1 ml směsi ethanol/fosfátový pufr (EtOH/PBS) (1:1), toto promytí proběhlo ještě jednou. Promytá kalová peleta byla resuspendována v 1 ml směsi EtOH/PBS (1:1) a následně skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Dehydratace a následná hybridizace vzorků

Přibližně 8 μl vzorku bylo pipetováno na suché odmaštěné podložní sklíčko s epoxidovou vrstvou a ponecháno zaschnout. Následně byl vzorek dehydratován v roztocích ethanolu v rostoucí koncentraci 50 %, 80 % a 96 % vždy po dobu tří minut a opět ponechán zaschnout.

Vzorek byl poté hybridizován s využitím genových sond Tet1-266, Tet2-892, Tet2-174, Tet3-654 a Tet3-19 označených barvivem Cy3 (Tab. 3.1). Tyto sondy byly vyzdviženy Nguyenem et al. (2011), kteří z celkem 10 sond pozorovali právě u těchto nejvyšší podíl zastoupení *Tetrasphaera*. Zároveň jsou využívány i v dalších studiích, což umožňuje následné porovnávání výsledků (Marques et al., 2017; Marques et al., 2018; Close et al., 2021).

Hybridizační pufr byl připraven z 360 μl NaCl ($5\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 40 μl Tris-HCl ($1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 2 μl dodecylsiranu sodného (10%) a formamidu (FA) a sterilní destilované vody (dH_2O) dle Tab. 3.1.

Na vzorek bylo pipetováno 8 μl hybridizačního pufru a 1 μl zvolené oligonukleotidové sondy. Hybridizace probíhala ve vlhčené komůrce (50 ml centrifugační zkumavce se savým papírem napuštěným zbytkem hybridizačního pufru) při $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu dvou hodin.

Po skončení hybridizace byl vzorek 15 minut při $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ promýván v promývacím pufru. Ten byl připraven z 1000 μl Tris-HCl ($1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 500 μl EDTA ($0,5\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (pouze pokud byla koncentrace FA $\geq 20\%$), NaCl ($5\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) dle Tab. 3.1, 50 μl dodecylsiranu sodného (10%) a doplněn sterilní destilovanou vodou na 50 ml.

Po promytí byl vzorek opláchnut a ochlazen v ledové destilované vodě a ponechán na vzduchu uschnout.

3.4 Kontrastování vzorků

Pro vizualizaci celkové biomasy v preparátu bylo provedeno kontrastování. Do jamky se vzorkem bylo nanášeno množství roztoku DAPI ($1\text{ }\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) dostatečné pro pokrytí celého vzorku a následovalo 15 mi-

nut inkubace při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl vzorek opláchnut a promyt ledovou destilovanou vodou. Vzorek byl po zaschnutí skladován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Mikroskopická analýza a vyhodnocení

Analýza vzorků probíhala na epifluorescenčním mikroskopu za využití fluorescenčních filtrů pro vlnové délky fluorochromů Cy3 a DAPI. Pozorování probíhalo při celkovém zvětšení 400 \times . Z pozorování každého vzorku bylo náhodně pořízeno 20 fotografií. Tyto byly následně vyhodnoceny pomocí softwaru DAIME (Daims et al., 2006), kde byl zjištěn poměr plochy pozorovaných organismů a celkové plochy biomasy. Aby nedošlo k falešnému nadhodnocení, byly dále využity jen ty výsledky, kde byl překryv ploch pozorovaných organismů a celkové biomasy alespoň 95 %.

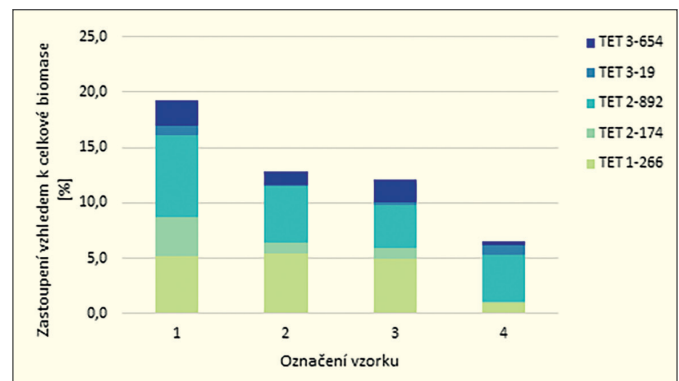
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci této práce byly analyzovány vzorky ze 4 ČOV v České republice, které se lišily podobou technologické linky. Ve vzorcích byla hodnocena přítomnost organismů hybridizujících postupně se všemi pěti sondami.

Výsledky procentuálního zastoupení daných organismů byly vyneseny do grafu na Obr. 4.1.

Ukazuje se, že přestože vzorky 2–4 pocházejí z ČOV, jež neaplikují zvýšené biologické odstraňování fosforu, vyskytují se na nich pozorované organismy v součtu v rozpětí 6,5–12,8 % celkové biomasy. Ve vzorku 1 (se zařazeným EBPR) bylo zjištěno 19,3% zastoupení *Tetrasphaera*. Dále je patrné, že s množstvím zařazených stupňů na technologické lince ČOV zastoupení rodu *Tetrasphaera* roste.

Nejvyšší zastoupení vykazovaly bez ohledu na podobu technologické linky organismy hybridizující se sondami Tet1-266 a Tet2-892. Naopak nejnižší zastoupení bylo pozorováno při hybridizaci se sondou Tet3-19.



Obrázek 4.1: Výsledné zastoupení rodu *Tetrasphaera* ve vzorcích čtyř čistíren odpadních vod lišících se podobou technologické linky

Tabulka 3.1: Přehled využívaných oligonukleotidových sond pro detekci *Tetrasphaera* (Nguyen et al., 2011)

název sondy	% FA	FA [μl]	dH_2O [μl]	NaCl v PP* [μl]	cílová skupina	sekvence (5'– 3')
Tet1-266	25	500	1 100	1 490	Clone ASM31	CCCGTCGTCGCCTGTAGC
Tet2-892	5	100	1 500	6 300	Clone ASM47	TAGTTAGCCTTGC GGCCG
Tet2-174	20	400	1 200	2 150	<i>T. jenkinsii</i> , <i>T. australiensis</i> , <i>T. veronensis</i> a <i>Ca. N. limicola</i>	GCTCCGTCTCGTATCCGG
Tet3-654	35	700	900	700	nekultivovatelné <i>Tetrasphaera</i>	GGTCTCCCCTACCATACT
Tet3-19	0	0	1 600	9 000	Clone ASM57	CAGCGTTCGTCTACACA

*PP – promývací pufr

V rámci kladů dominovaly organismy z kladu 2, nejméně bylo přítomno zástupců z kladu 3. Rozložení zástupců *Tetrasphaera* u vzorků 1-3 bylo přibližně srovnatelné, vzorek 4 se mírně vymykal menším zastoupením organismů hybridizujících se sondou Tet1-266.

Celosvětově se zastoupení *Tetrasphaera* v EBPR systémech pohybuje obvykle mezi 15 a 30 % biomasy (Marques et al., 2017; Liu et al., 2019). Zastoupení ve vzorku 1 tedy i v tomto ohledu odpovídá typickému EBPR systému. Ve vzorcích z ČOV s odstraňováním dusíku bylo po FISH se sondou Tetmix (zahrnující Tet1-266, Tet2-174, Tet2-892 a Tet3-654) pozorováno 16–28 % (Liu et al., 2019). Ani jeden z tří vzorků zde analyzovaných nedosáhl spodní hranice tohoto intervalu výskytu *Tetrasphaera* (Tab. 4.1). Jak je ale zmíněno níže, záleží i na kontrastní látce a konkrétní metodě použité pro kvantifikaci, jež v tomto review článku nebyly blíže specifikovány.

Nguyen et al. (2011) analyzovali podobným postupem využitým i v této práci, tedy podle Nielsen et al. (2009) za využití stejných sond vzorky z pěti dánských ČOV s EBPR a pozorovali srovnatelný výskyt *Tetrasphaera* se vzorkem 1 v této práci (19,3 %), a to mezi 15,9 a 27,2 % všech přítomných bakterií. Ve zmíněné studii byl na rozdíl od této práce ale výskyt *Tetrasphaera* porovnáván s celkovým výskytem bakterií značeným sondou EUBmix, nikoli pomocí DAPI, které označuje veškerou biomasu. To může srovnání výsledků zkreslovat, po barvení DAPI bude pravděpodobně vykazován nižší výskyt než po barvení EUBmixem, což je skutečnost, na niž je třeba brát zřetel.

I další studie, například autorů Dueholm et al. (2022), uvádí zastoupení *Tetrasphaera* na různých typech ČOV z celého světa. Pro systémy s pouhým odstraněním C je zde uváděno 1% zastoupení *Tetrasphaera*, pro systémy s odstraňováním dusíku a predenitrifikací 2,5 % a pro systémy s odstraňováním dusíku a fosforu pak 5,8 %. Tyto výsledky byly ovšem získané sekvenací a následnou kvantifikací, proto je nelze přímo porovnávat s výsledky jiných metod, jako je v této práci použítá obrazová

analýza po fluorescenční *in-situ* hybridizaci, kdy je vyhodnocován podíl plochy organismů ku ploše celkové biomasy. Porovnání komplikuje též nedostatečné množství informací o jednotlivých systémech, ze kterých byly odebrány a analyzovány vzorky, např. informace o případném srážení fosforu či zařazením regeneračního stupně linky ČOV.

Obecně je nicméně nutné podotknout, že vlastní povaha zvolené metody sebou nese poměrně vysokou chybu, je tedy vhodnější výsledky vyhodnocovat spíše z hlediska trendu než konkrétních hodnot. Pozorovaný trend do určité míry kopíroval očekávání, tedy že největší zastoupení bude mít rod *Tetrasphaera* v EBPR systému a nejménší v systému s pouhým odstraňováním C. Překvapivě významné zastoupení měly pozorované organismy ve vzorku ze systému D–N, tedy bez EBPR. Toto pozorování nicméně opět podporuje stanovisko prezentované Marquesem et al. (2017), že samotné zastoupení těchto organismů není nutně vypovídající o schopnosti kultury odstraňovat fosfor v požadované míře.

Pozorované bylo široké spektrum morfologických typů, ty se však daly v naprosté většině případů zařadit do některé z následujících skupin: tetrády, vlákna, větevnaté struktury, koky či tyčinky a shluky koků či tyčinek. Toto pozorování, jehož výsledky jsou uvedené v Tab. 4.2, bylo v některých případech v souladu s informacemi uváděnými Nguyenem et al. (2011) a Marquesem et al. (2018), uvedenými v Tab. 2.1, v některých spektrum zmíněné v těchto studiích rozšířilo.

Klastry tetrad, které Nguyen et al. (2011) prezentují jako typickou morfologii pro všechny sondy, nebyly vůbec pozorovány ve vzorku 4 a ve vzorcích 2 a 3 se vyskytovaly jen v nízkém zastoupení. Pouze ve vzorku 1 byly klastry tetrad pozorovány po hybridizaci se všemi používanými sondami. To může indikovat, že tetradové klastry jsou typem morfologie zodpovědným za EBPR. Tato morfologie byla nejčastěji pozorována po použití sond Tet1-266, Tet2-174 a Tet3-654, což odpovídá spíše údajům Marquese et al. (2018).

Tabulka 4.1: Relativní podíl zástupců rodu *Tetrasphaera* v celkové biomase

	Tet1-266 [%]	Tet2-174 [%]	Tet2-892 [%]	Tet3-19 [%]	Tet3-654 [%]	celkem [%]
vzorek 1	5,2	3,6	7,3	0,8	2,3	19,3
vzorek 2	5,5	0,9	5,1	0,1	1,1	12,8
vzorek 3	5,0	0,9	3,9	0,2	2,1	12,1
vzorek 4	0,9	0,2	4,2	0,9	0,3	6,5

Tabulka 4.2: Výsledky pozorování morfologie zástupců rodu *Tetrasphaera* hybridizujícími s pěti uvedenými sondami

morfologie	tetrády				větevnaté				vlákna				koky/tyčinky				shluky koků/tyčinek			
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4
Tet1-266	+	+–			+	+	++	+	++	+–	+–	+–								+
Tet2-174	+		+		+–	++	++	+	++		+–		+			+				
Tet2-892	++					+	+–		+	+	+			+	+	+	+	+	+	
Tet3-19	+				+	+–	++	+	+				+	+	+	+				
Tet3-654	++		+–		+	+	+	+	++	+–	+–		+			+				

Pozn.: „++“ značí výrazný výskyt cílových organismů oproti jiným typům v daném vzorku, konkrétně u tetrad je tímto znakem značen i výrazný výskyt oproti jiným vzorkům; „+“ značí typ běžný a nijak neobvyklý; „+–“ značí typ pozorovaný obvykle ojedinelé v daném vzorku (méně než v 5 snímcích sady); prázdné pole značí, že se daný typ morfologie v daném vzorku nevyskytoval vůbec

Větvnaté struktury byly pozorovány ve všech vzorcích po hybridizaci se všemi sondami mimo vzorky 1 a 4 se sondou Tet2-892. Vlákna se prakticky nevyskytovala ve vzorku 4, ale ve vzorku 1 byla spolu s klastry tetradů převažující morfologií. Toto je opět více v souladu s pozorováním Marquese et al. (2018), než Nguyen et al. (2011).

Po hybridizaci se sondou Tet3-19 byly pozorovány i další morfologie jako např. větvnaté struktury (Obr. 4.2 (f)) nebo koky, přestože Nguyen et al. (2011) jsou zmiňovány pouze tetradové klastry.

Obecně tedy pozorování morfologických typů odpovídají spíše údajům uváděným Marquesem et al. (2018), přestože v jejich studii se jednalo o vzorky kultivované v laboratoři. Odlišnost pozorování od informací uváděných Nguyenem et al. (2011), kteří analyzovali reálné vzorky z dánských ČOV, může být způsobena rozdílnými podmínkami v systémech ČOV (ve studii pouze EBPR systémy) i v regionech, kde se ČOV nachází, tedy v Dánsku a v České republice. Obecně je známo, že, protože je prostředí aktivovaného kalu velmi komplexní a jedinečné, závisí na substrátu (složení odpadní vody) a technologických parametrech systému, mohou některé organismy vykazovat rozličné odlišnosti nejen v morfologii, ale i ve fyziologii či genetické informaci, ve srovnání s laboratorně pěstovanými čistými kulturami. Rozdíly mohou být také důsledkem postupného vývoje a adaptace mikroorganismů.

Tyto závěry také podporují tvrzení, že se zdaleka nejedná o zcela probádanou oblast problematiky biologického čištění odpadních vod.

Některé příklady pozorované morfologie jsou vyobrazeny na Obr. 4.2.

5 ZÁVĚR

Bakterie rodu *Tetrasphaera* tvořily na ČOV se zavedeným zvýšeným biologickým odstraňováním fosforu 19,3% biomasy, což bylo v souladu s literárními zdroji. Pozorovány byly rovněž na ČOV, kde zvýšené biologické odstraňování fosforu aplikováno není, tam jejich podíl dosahoval 6,5–12,8% biomasy, což byly hodnoty nižší než uváděné v literatuře.

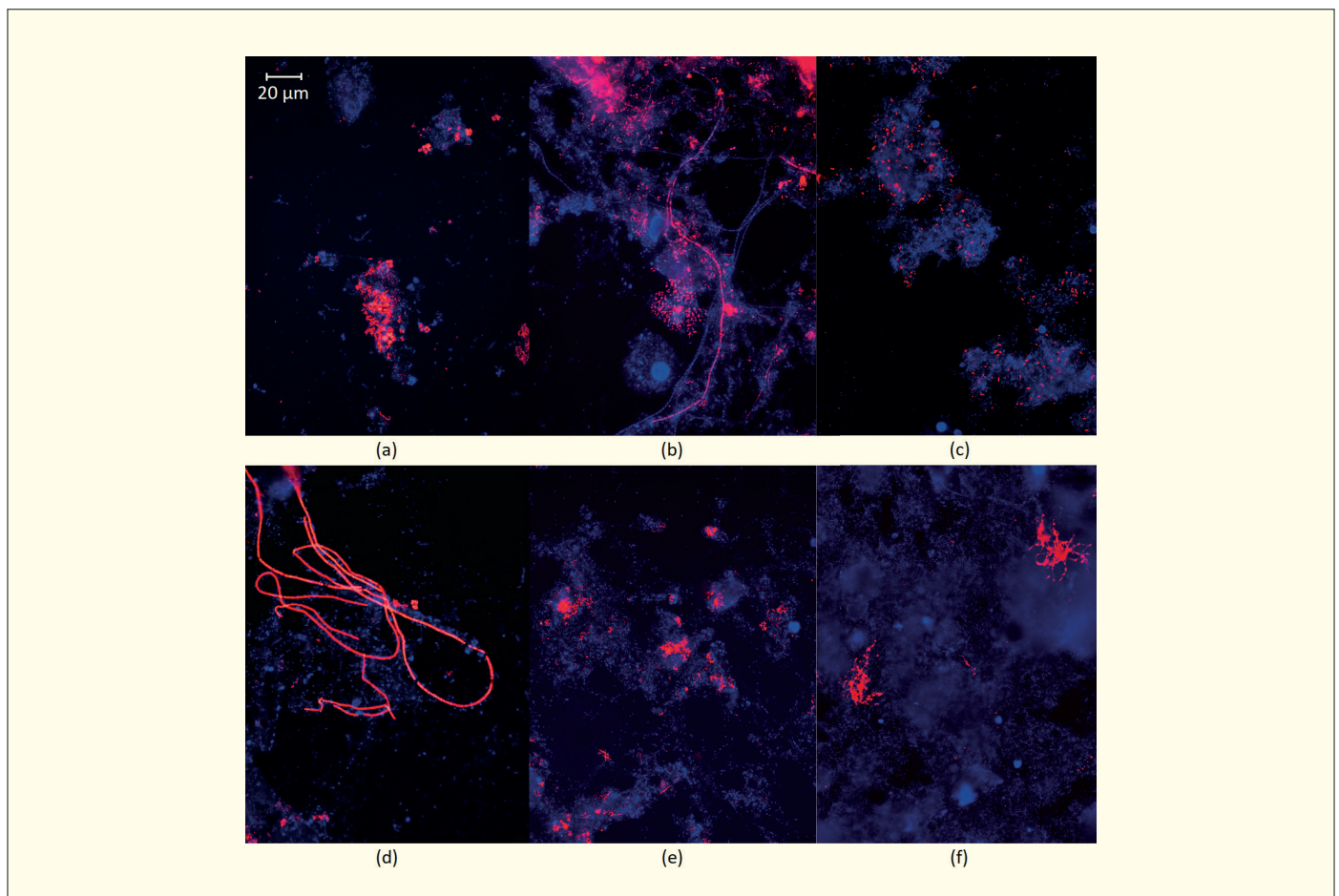
Nejvíce zastoupené byly bakterie hybridizující se sondami Tet1-266 a Tet2-892, dohromady tvoří 65–83% přítomných *Tetrasphaera*, naopak nejméně se vyskytující byli zástupci hybridizující se sondou Tet3-19 (1,1–13,7% přítomných *Tetrasphaera*). Byla též vyvozena jistá závislost zastoupení bakterií rodu *Tetrasphaera* v aktivovaném kalu na počtu stupňů technologické linky ČOV. S rostoucím počtem prvků rostl i podíl *Tetrasphaera* ve vzorku.

Pozorování zástupci se vyskytovali v různých morfologiích, z nichž některé nebyly v literatuře pro danou sondu uvedeny. Typické tetradové klastry se po hybridizaci se všemi sondami vyskytovaly pouze ve vzorku 1, tedy se zavedeným biologickým odstraňováním fosforu.

Ověření těchto závěrů bude předmětem dalšího studia, kde bude rozšířen počet vzorků v rámci daných uspořádání technologických linek ČOV.

6 PODĚKOVÁNÍ

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A1_FTOP_2022_003



Obrázek 4.2: Příklady pozorovaných morfologií zástupců rodu *Tetrasphaera*. (a) shluk tetradových klastrů, vzorek 1, sonda Tet2-892; (b) vláknité struktury, koky, vzorek 2, sonda Tet2-892; (c) koky, vzorek 4, sonda Tet2-892; (d) vláknité struktury, vzorek 1, sonda Tet2-174; (e) větvnaté metličkové struktury, vzorek 3, sonda Tet1-266; (f) větvnaté struktury, vzorek 4, sonda Tet3-19. Pozorování červeného fluorochromu filtrem Cy3, modré kontrastování pomocí DAPI; zvětšení 400×

LITERATURA

- Bindzar, J.; Janda, V.; Jeníček, P.; Růžičková, I.; Strnadová, N., 2009. *Základy úpravy a čištění vod*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Close, K.; Marques, R.; Carvalho, V. C. F.; Freitas, E. B.; Reis, M. A. M.; Carvalho, G.; Oehmen, A., 2021. *The storage compounds associated with Tetrasphaera PAO metabolism and the relationship between diversity and P removal*. Water Research 204, doi:10.1016/j.watres.2021.117621.
- Daims, H.; Lucker, S.; Wagner, M., 2006. *Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research*. Environmental Microbiology 8(2), 200–213, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00880.x.
- Dueholm, M. K. D.; Nierychlo, M.; Andersen, K. S.; Rudkjøbing, V.; Knutsson, S.; Mi, D. A. S. G. C.; Albertsen, M.; Nielsen, P. H., 2022. *MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants*. Nat Commun 13(1), 1908, doi:10.1038/s41467-022-29438-7.
- Fernando, E. Y.; McIlroy, S. J.; Nierychlo, M.; Herbst, F. A.; Petriglieri, F.; Schmid, M. C.; Wagner, M.; Nielsen, J. L.; Nielsen, P. H., 2019. *Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological phosphorus removal with Raman-FISH*. The ISME Journal 13(8), 1933–1946, doi:10.1038/s41396-019-0399-7.
- Henze, M.; van Loosdrecht, M. C. M.; Ekama, G. A.; Brdjanovic, D. (eds.), 2008. *Biological wastewater treatment-principles, modelling and design*. IWA Publishing, London, UK, ISBN13: 9781843391883.
- Kristiansen, R.; Nguyen, H. T.; Saunders, A. M.; Nielsen, J. L.; Wimmer, R.; Le, V. Q.; McIlroy, S. J.; Petrovski, S.; Seviour, R. J.; Calteau, A.; Nielsen, K. L.; Nielsen, P. H., 2013. *A metabolic model for members of the genus Tetrasphaera involved in enhanced biological phosphorus removal*. The ISME Journal 7(3), 543–554, doi:10.1038/ismej.2012.136.
- Liu, R.; Hao, X.; Chen, Q.; Li, J., 2019. *Research advances of Tetrasphaera in enhanced biological phosphorus removal: A review*. Water Research 166, 115003, doi:10.1016/j.watres.2019.115003.
- Marques, R.; Ribera-Guardia, A.; Santos, J.; Carvalho, G.; Reis, M. A. M.; Pijuan, M.; Oehmen, A., 2018. *Denitrifying capabilities of Tetrasphaera and their contribution towards nitrous oxide production in enhanced biological phosphorus removal processes*. Water Research 137(262–272), doi:10.1016/j.watres.2018.03.010.
- Marques, R.; Santos, J.; Nguyen, H.; Carvalho, G.; Noronha, J. P.; Nielsen, P. H.; Reis, M. A. M.; Oehmen, A., 2017. *Metabolism and ecological niche of Tetrasphaera and Ca. Accumulibacter in enhanced biological phosphorus removal*. Water Research 122, 159–171, doi:10.1016/j.watres.2017.04.072.
- Muszyński, A.; Miłobędzka, A., 2015. *The effects of carbon/phosphorus ratio on polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in aerobic granular sludge*. International Journal of Environmental Science and Technology 12(9), 3053–3060, doi:10.1007/s13762-015-0828-8.
- Nguyen, H. T.; Kristiansen, R.; Vestergaard, M.; Wimmer, R.; Nielsen, P. H., 2015. *Intracellular accumulation of glycine in polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge, a novel storage mechanism under dynamic anaerobic-aerobic conditions*. Applied and Environmental Microbiology 81(14), 4809–4818, doi:10.1128/AEM.01012-15.
- Nguyen, H. T.; Le, V. Q.; Hansen, A. A.; Nielsen, J. L.; Nielsen, P. H., 2011. *High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems*. FEMS Microbiology Ecology 76(2), 256–267, doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01049.x.
- Nielsen, P. H.; Daims, H.; Lemmer, H. (eds.), 2009. *FISH handbook for biological wastewater treatment*. IWA Publishing.
- Nielsen, P. H.; Mielczarek, A. T.; Kragelund, C.; Nielsen, J. L.; Saunders, A. M.; Kong, Y.; Hansen, A. A.; Vollertsen, J., 2010. *A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants*. Water Research 44(17), 5070–5088, doi:10.1016/j.watres.2010.07.036.
- Seviour, R.; Nielsen, P. H. (eds.), 2010. *Microbial ecology of activated sludge*. IWA Publishing, London, UK, ISBN13: 9781843390329.
- Seviour, R. J.; Blackall, L. L. (eds.), 1999. *The microbiology of activated sludge*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, ISBN 978-0-412-79380-6.
- Singleton, C. M.; Petriglieri, F.; Wasmund, K.; Nierychlo, M.; Kondrotaitė, Z.; Petersen, J. F.; Peces, M.; Dueholm, M. S.; Wagner, M.; Nielsen, P. H., 2022. *The novel genus, 'Candidatus Phosphoribacter', previously identified as Tetrasphaera, is the dominant polyphosphate accumulating lineage in EBPR wastewater treatment plants worldwide*. The ISME Journal 16(6), 1605–1616, doi:10.1038/s41396-022-01212-z.
- Zhao, W.; Bi, X.; Peng, Y.; Bai, M., 2022. *Research advances of the phosphorus-accumulating organisms of Candidatus Accumulibacter, Dechloromonas and Tetrasphaera: Metabolic mechanisms, applications and influencing factors*. Chemosphere 307(Pt 1), 135675, doi:10.1016/j.chemosphere.2022.135675.