

Výskyt denitrifikačních polyfosfátakumulujících bakterií v čistírnách odpadních vod na území ČR

Occurrence of denitrifying polyphosphate-accumulating bacteria in wastewater treatment plants in the Czech Republic

Dominik Matýsek¹, Miroslava Česká², Iveta Růžicková³

INFORMACE O ČLÁNKU

DOI 10.35933/ENTECHO.2022.003

HISTORIE

Datum doručení: 22. 6. 2022

Datum revize: 10. 8. 2022

Datum akceptace: 16. 8. 2022

AFILACE

Ústav technologie vody a prostředí
VŠCHT Praha

Technická 5, 166 28 Praha 6

¹ email: matysekd@vscht.cz

ORCID ID 0000-0002-9760-5641

² email: ceskam@vscht.cz

ORCID ID 0000-0001-7188-6943

³ email: iveta.ruzickovar@vscht.cz

ORCID ID 0000-0001-6125-7465

KLÍČOVÁ SLOVA

Biologické odstraňování fosforu; denitrifikační polyfosfátakumulující organismy; fluorescenční *in-situ* hybridizace; anoxická akumulace fosforu

KEYWORDS

Biological phosphorus removal; denitrifying polyphosphate accumulating organisms; fluorescent *in-situ* hybridization; anoxic accumulation of phosphorus

ABSTRAKT

Klíčovou technologií pro zachování kvality povrchových vod je odstraňování dusíku a fosforu z odpadních vod. Nejčastější a nejjednodušší technologií je biologické odstranění dusíku a chemické srážení fosforu. V tomto příspěvku byl monitorován výskyt bakterií *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, které jsou schopny odstraňovat oba tyto nutrienty. Výskyt těchto organismů a následné využití jejich potenciálu při biologickém odstranění nutrientů může přinášet značené benefity pro provoz čistíren odpadních vod, jako například snížení dávky srážecích činidel, nižší produkci kalu a nižší nároky na aeraci oxické části technologie. Práce je zaměřena na monitoring výskytu těchto organismů v čistírnách odpadních vod na území České republiky. Ke sledování a hodnocení vybraných bakterií byla využita fluorescenční *in-situ* hybridizace, jelikož konvenčními metodami nelze tyto organismy vzájemně rozlišit. Výsledky analýzy jednotlivých aktivovaných kalů ukázaly, že většina ze sledovaných čistíren odpadních vod, obsahovaly v konsorciu bakterií sledované denitrifikační polyfosfátakumulující bakterie. Ovšem jejich potenciál při simultánním odstranění dusíku a fosforu nebyl využit.

ABSTRACT

Key technology for maintaining surface water quality is nitrogen and phosphorus removal from wastewater. The most common and simplest technology is biological nitrogen removal and chemical precipitation of phosphorus. In this work, occurrence of bacteria *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, which can remove both of these nutrients, was monitored. The occurrence of these organisms and use of their potential in the biological nutrient removal can bring significant benefits to the operation of wastewater treatment plants, such as reduced dose of coagulating agents, lower sludge production and lower demands on aeration of the oxic part of the technology. This work is focused on monitoring of the occurrence of these organisms in wastewater treatment plants in the Czech Republic. Fluorescence *in-situ* hybridization was used to monitor and evaluate these bacteria, because conventional methods are not sufficient. The implementation of this method is described in the experimental part and obtained results are further discussed.

1 Úvod

Jednou z bariér mezi odpadní vodou a povrchovou vodou v recipientu je čistírna odpadních vod (ČOV). Na tuto technologii se kladou čím dál vyšší nároky, aby nedocházelo ke kontaminaci povrchových vod a potenciálních zdrojů pitné vody. Čistírna odpadních vod má za úkol odstraňovat znečišťující látky, a to jak rozpuštěné, tak nerozpuštěné, z proudů komunálních, ale také průmyslových odpadních vod. Mezi základní chemické znečišťující látky, které čistírna odpadních vod musí odstraňovat, jsou dusík a fosfor. Tyto látky v povrchových vodách velmi výrazně snižují jejich kvalitu, a to například vznikem známého jevu eutrofizace. Dusík a fosfor jsou obecně klíčové nutrienty pro život organismů ve vodním ekosystému, ale také mimo něj. Je proto důležité hlídat koncentraci těchto nutrientů a pokud možno vodní ekosystémy nezneškodnocovat jejich nadbytkem.

V rámci čištění odpadních vod se pro odstraňování dusíku využívá biologické cesty, oxidace dusíku v podobě amonných iontů na dusitany a následně dusičnany. V druhém kroku jsou tyto látky redukovány na elementární dusík procesem, který se nazývá denitrifikace. Strategie pro odstraňování fosforu jsou však variabilnější. V ČR se přistupuje především k chemické cestě, tedy ke srážení fosforu a jeho následné separaci. Fosfor je však také možné odstraňovat biologicky s využitím bakterií, které se skupinově označují jako polyfosfátakumulující organismy (PAO). Systémy, které jsou založeny na biologickém odstraňování fosforu, se označují jako EBPR z anglického označení těchto systémů Enhanced biological phosphorus removal. Jedná se o technologii, ve které dochází ke změně kultivačního prostředí, v němž se bakterie nacházejí. Ty dále vlivem svého metabolismu snižují množství fosforu v odpadní vodě.

V 80. letech 20. století byla objevena nová skupina bakterií, tzv. denitrifikační polyfosfátakumulující organismy (DPAO). Jedná se o organismy, které na rozdíl od PAO nevyžadují změnu kultivačních podmínek, tedy střídání oxické/anaerobní fáze, ale preferují prostředí anoxické/anaerobní. Jak již název skupiny napovídá, jedná se o organismy schopné simultánního odstraňování dusíku a fosforu. Bylo by tedy žádoucí tyto bakterie v systémech biologického odstraňování nutrientů upřednostňovat, jelikož se podílejí na eliminaci obou prvků z odpadní vody. Tyto organismy mohou v hojnějším zastoupení pro čištění odpadních vod představovat významný benefit snížených nároků na aeraci systému, jelikož jsou schopny respirovat s využitím dusičnanů, popřípadě dusitanů, a zároveň nižší produkce kalu, která je typická pro biologické odstraňování fosforu.

2 Teoretická část

Organismy označované jako PAO jsou typickou skupinou účastníci se biologického odstraňování fosforu. Jejich metabolismu se využívá především v systémech EBPR. Využívá se zde schopnosti bakterií akumulovat fosfor do buněk v množství daleko vyšším, než jsou metabolické požadavky pro růst aktivovaného kalu (Seviour et al., 2003). Objasnění metabolismu a požadavků této kultury bylo možné až po vyvinutí metod, které nejsou založené na kultivaci těchto bakterií. Jedná se především o metody fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH), polymerázové řetězové reakce (PCR), a jejich metabolismus byl pečlivě zdokumentován metodou mikroautoradiografie (MAR-FISH). Byl tak podrobně popsán rod *Candidatus Accumulibacter phosphatis* jakožto nejhojnější zástupce PAO v systémech EBPR a hlavní činidel podílející se na biologickém odstraňování fosforu (Kim et al., 2013).

Rozmanitost *Candidatus Accumulibacter phosphatis* byla dále zkoumána pomocí PCR, kdy byly u této skupiny bakterií nalezeny značné rozdíly na základě sekvenování enzymu polyfosfátkinasa (*ppk 1*), který se účastní syntézy vnitrobuněčného polyfosfátu z *ortho*-fosfátů. *Candidatus Accumulibacter phosphatis* je tak možné rozdělit do dvou větví neboli cladů, které se označují jako clade I a clade II (Flowers et al., 2009). Tyto dvě větve mezi sebou nesou určitou rozdílnost, ale obě skupiny clade I a clade II lze ještě rozdělit do podskupin označovanými písmeny A-D, například clade IA, IIA a další (Kim et al., 2010). Jednotlivé skupiny se od sebe liší svým metabolismem a preferencí ke střídání kultivačních podmínek. Při tomto rozdělení bakterií je již použití skupinového označení PAO nevhodné a zavádějící, jelikož zástupci *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I a clade II mají různé metabolické dráhy a jsou schopny se vzájemně doplňovat, ale také si konkurovat.

Zásadní rozdíl mezi PAO a DPAO je schopnost využívat rozdílné akceptory elektronů. U zástupců PAO, například *Rhodocyclus tenuis* a ostatních *Candidatus Accumulibacter* spp., je jím kyslík. Akumulace fosforu tak nastává v oxických podmínkách. Zástupci DPAO, například *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I, popřípadě clade II, jako akceptor elektronů využívají dusičnany, popřípadě dusitany. Akumulace fosforu tedy nastává v anoxických podmínkách (Yun et al., 2019). Tyto organismy akumulující fosfor v anoxické fázi přináší pro provoz ČOV značné benefity. Jedná se například o snížení náročnosti aerae za předpokladu biologického odstranění fosforu, jelikož DPAO jej pro oxidaci poly- β -hydroxyalkanoátů nevyužívají, zároveň jsou jejich požadavky pro příjem uhlíku nižší než u skupiny PAO. To znamená, že biomasa DPAO v systému přirůstá daleko pomaleji, čímž se snižuje celková produkce kalu v daném provozu (Murnleitner et al., 1997).

Candidatus Accumulibacter phosphatis clade I (dále pouze *Accumulibacter* clade I) preferuje při anoxické akumulaci fosforu především dusičnany (Lanham et al., 2011). Anoxická akumulace fosforu, prováděná *Accumulibacter* clade I je velmi úzce spjatá také s pH. Nejlepších výsledků odstranění fosforu a dusíku, tedy poměr P/N, byl dosažen pomocí *Accumulibacter* clade I při pH 7,3. Následně se s rostoucím pH poměr výrazně snižuje. Ovšem ne všichni členové clade I dusičnany

preferují. Studie prováděná Flowersem ukazuje, že jasnou preferencí k dusičnanům se vyznačuje především clade IA, zatímco clade IIA nebyl schopen redukce dusičnanů ani po 24 hodinách, kdy se v systému vyskytovaly (Flowers et al., 2009). V této studii byla také vyřčena hypotéza, že zástupci *Accumulibacter* clade IIA preferují spíše dusitany, a proto je možné, že se tyto dva clady v systémech vyskytují společně, jelikož jeden provádí redukci dusičnanů na dusitany a druhý dusitany využívá jako akceptor elektronů. Tato hypotéza byla následně potvrzena hlubším prozkoumáním těchto cladů na základě metagenomické analýzy. Clade IIA postrádá enzym nitrátreduktasu, proto tedy není schopen využívat jako akceptor elektronů dusičnany (Rubio-Rincón et al., 2017). Není však vždy pravidlem, že clade I je v systémech hojněji zastoupen než clade II. Méně konkurenceschopnou, a tedy citlivější skupinou systémů EBPR je především clade I, jelikož jejich příjem organického substrátu je daleko nižší než právě u organismů clade II. Dokonce ani v případě, že je systém delší dobu vystaven nedostatku fosfátu, není to pro výskyt clade II tak limitující jako právě pro clade I. Tyto organismy jsou totiž schopny přejít do metabolismu, který se označuje jako GAM (glykogenakumulující metabolismus). Mohou tedy ze své metabolické dráhy fosfor úplně vynechat a fungovat pouze na základě akumulace uhlíkatých substrátů, jejich převedení do PHA a následně do glykogenu (Welles et al., 2016).

Zástupci DPAO byli hojně identifikováni a sledováni především v systémech EBPR. Jejich výskyt však nebyl tak pečlivě sledován na čistírnách odpadních vod, které nemají zařazen biologický stupeň odstraňování fosforu. Výměnu nutrientů, substrátu, ale také akceptorů elektronů s okolním prostředím mohou zprostředkovat agregáty aktivovaného kalu, kterými jsou vločky nebo granule, prostřednictvím difuze. Velké množství DPAO tak v agregátech aktivovaného kalu běžně metabolizuje, i když není systém založen na střídání kultivačních podmínek vhodných pro biologické odstraňování fosforu. Jelikož je výměna metabolitů a příjem substrátu z okolí řízena difuzí v různých místech agregátů, vzniká v těchto útvarech vhodný kyslíkový gradient právě pro denitrifikaci a souběžně je tedy možná i akumulace fosforu (Dockx et al., 2022).

Doposud však nebyla publikována žádná studie, která by shrnovala výskyt DPAO a jejich zástupců v systémech čištění odpadních vod na území České republiky. Tato práce se proto věnuje výskytu DPAO především na ČOV, které biologický stupeň odstraňování fosforu nemají zařazen, a nevyužívají tak potenciál DPAO pro biologické odstraňování fosforu z odpadních vod.

3 Experimentální část

Experimentální část byla zaměřena na stanovení přítomnosti *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, dále pak jejich clade I, II, IA, IIA ve vzorcích aktivovaného kalu z 15 náhodně vybraných čistíren v ČR, které nemají zařazen stupeň biologického odstraňování fosforu. Pro porovnání naměřených výsledků byl získán také vzorek z ČOV, která systémem EBPR provozuje.

3.1 Fixace preparátů

Vzorky aktivovaného kalu byly zafixovány nejpozději do 48 hodin od odběru vzorku. Fixace těchto Gram-negativních organismů byla provedena optimalizovaným postupem, který vychází z publikace Van Loosdreshta et al. (2016). Vzorek aktivovaného kalu byl centrifugován při 4 000 g po dobu 10 minut. Následně byl odstraněn supernatant a kalová peleta byla resuspendována v 1% roztoku paraformaldehydu, který byl připraven v jedenkrát ředěném fosfátovém pufru (1× PBS). Takto připravená směs byla inkubována při teplotě 4 °C po dobu 18 hodin. Následně byla směs centrifugována, supernatant byl odstraněn a kalová peleta byla 2× promyta 1× PBS. Kalová peleta byla resuspendována v EtOH/1×PBS (1:1). Takto připravené vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C.

3.2 Dehydratace a hybridizace

Na odmaštěné podložní skříčko potažené epoxidovou vrstvou bylo pipetováno 8 µl fixovaného vzorku. Ten byl následně dehydratován v sérii roztoků ethanolu s rostoucí koncentrací (50%, 80%, 96%). Po dehydrataci bylo podložní skříčko usušeno na vzduchu, aby nedošlo k odplavení preparátu v dalších krocích. Připravená podložní skříčka s fixovanými vzorky byla následně hybridizována. Pro hybridizaci byly využity genové sondy uvedené v Tab. 1. Pro tuto sadu genových sond je možno použít koncentraci formamidu v hybridizačním pufru 35 %. Proto je možné jednotlivé sondy mezi sebou kombinovat v případě, že jsou značeny různými fluorochromy tak, aby byl následně signál jednotlivých organismů rozlišitelný.

Tabulka 1: Použité genové sondy pro monitoring DPAO

Název sondy	Cílová skupina organismů	Poznámka
PAOmix	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>	Směs PAO462, PAO846, PAO651
Acc-I-444	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade I	
Acc-II-444	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade II	
Acc444	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade IA	Přídavek helperu
Acc119	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade IIA	Přídavek helperu a kompetitoru

Hybridizační pufr byl složen z 360 µl NaCl (5M), 40 µl Tris-HCl (1M), 2 µl dodecylsírany sodného (10 %), 700 µl formamidu a 900 µl sterilní vody. Na každý ze vzorků bylo pipetováno 8 µl hybridizačního pufru a 1 µl příslušné genové sondy, kompetitoru nebo helperu. Hybridizace probíhala ve vlhčené komůrce při teplotě 46 °C po dobu 2 hodin. Následně byla skříčka z komůrky vytažena, promyta po dobu 15 minut v promývacím pufru, zchlazena a opláchnuta v ledové destilované vodě, aby došlo k úplnému odstranění nenavázané genové sondy. Hybridizované podložní skříčko bylo v temnu ponecháno zaschnout při laboratorní teplotě.

3.3 Kontrastování vzorků

Aby bylo možno stanovit celkovou plochu biomasy preparátu, ke které se získané výsledky stahují, je zapotřebí provést její vizualizaci. Proto je zapotřebí provést kontrastování vzorku.

Na podložní skříčko byl nanesen roztok DAPI (1 µg/ml) a následně byla provedena inkubace po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Po navázání DAPI na vzorek bylo skříčko opláchnuto v ledové destilované vodě, aby došlo k odstranění nezreagovaného barviva. Takto připravené preparáty byly uschovány při teplotě -20 °C před samotným mikroskopickým vyšetřením.

3.4 Mikroskopická analýza a následné vyhodnocení

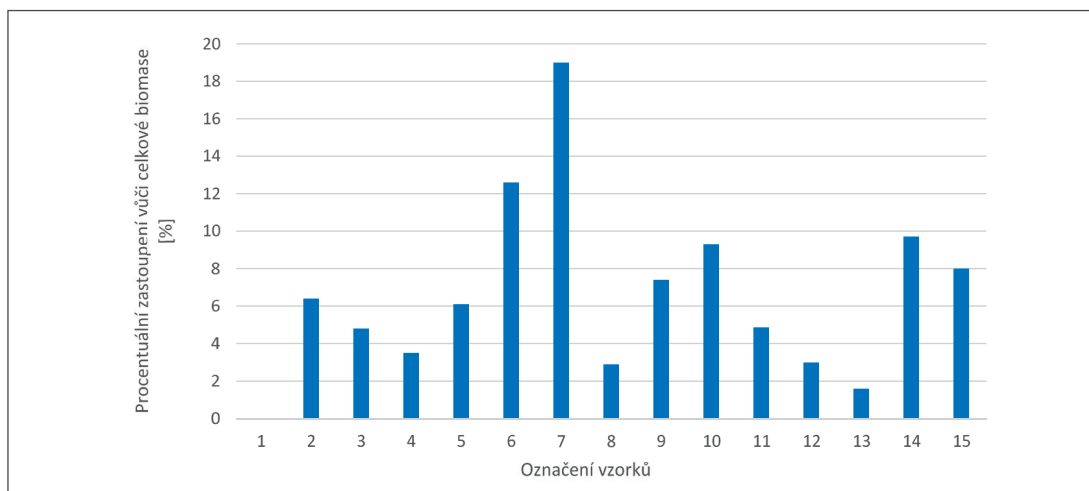
Mikroskopická analýza probíhala na epifluorescenčním mikroskopu, který je vybaven vhodnými fluorescenčními filtry pro oblast vlnových délek fluorochromů Cy3, 6-FAM a DAPI. Pozorování preparátů probíhalo při celkovém zvětšení 400x. Všechny pozorované preparáty byly připraveny v duplikátu a z každého vzorku bylo pořízeno 20 fotografií náhodných zorných polí. Tyto fotografie byly následně zpracovány softwarem DAIME (Daims et al., 2006), kde byla zjištěná plocha pozorovaných organismů vztažena na celkovou plochu biomasy. Získané výsledky byly uváděny v procentech zastoupení pozorovaných organismů a pro následné zpracování dat byly využity snímky, které měly shodu (překryv) sledovaných organismů s celkovou biomasou alespoň 95 %, aby se zabránilo falešnému nadhodnocení získaných výsledků z důvodu nespecifických interakcí.

4 Výsledky a diskuse

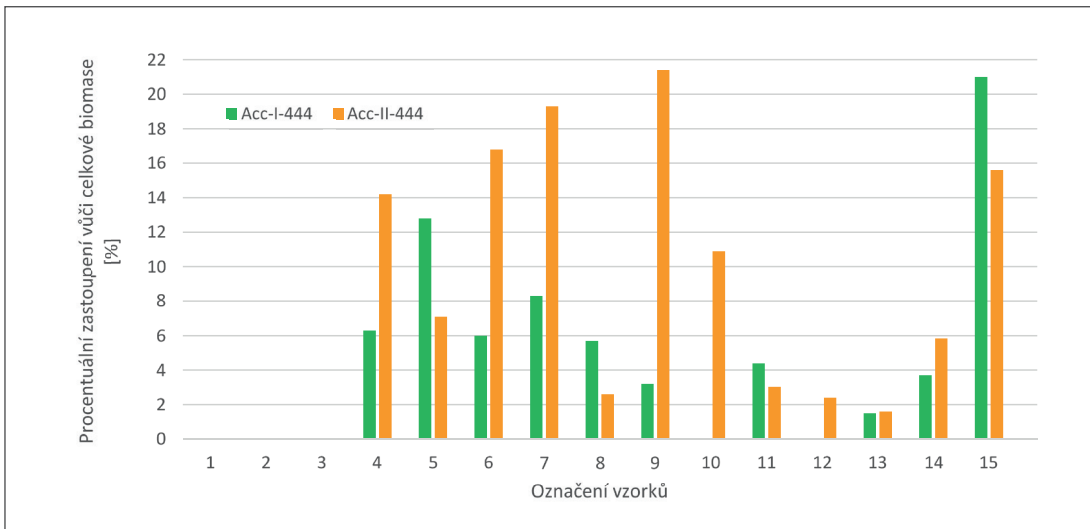
V rámci této práce bylo analyzováno 15 vzorků z ČOV na území ČR. Jednalo se o 14 čistíren, které nemají zařazen biologický stupeň odstraňování fosforu a jednu, která tento stupeň má, pro porovnání s ostatními získanými výsledky. Jednotlivé vzorky z ČOV jsou označeny 1–14 a vzorek z provozu zahrnující biologické odstraňování fosforu je vždy označen jako vzorek 15 (systém EBPR pro srovnání).

Nejprve byla ve všech vzorcích hodnocena přítomnost organismů hybridizujících se směsnou sondou PAOmix (směs sond PAO462, PAO846 a PAO651). Jedná se o směsnou sondu, která detekuje organismy skupiny *Candidatus Accumulibacter phosphatis*. Výsledky procentuálního zastoupení těchto organismů vztažené na celkovou plochu biomasy jsou uvedeny v Grafu 1.

Výsledky ukazují, že mnoho ČOV, byť nemají typické podmínky pro biologické odstraňování fosforu, disponují alespoň 2% zastoupením těchto organismů, až na vzorek 1. Lze tedy konstatovat, že tyto organismy se v systémech vyskytují hojně, nezávisle na kultivačních podmínkách, které jsou doporučovány pro biologické odstraňování fosforu. U vzorku 15, který je srovnávací, jelikož je odebrán ze systému EBPR, jsme očekávali nejvyšší zastoupení těchto organismů. Ukázalo se však, že na některých ČOV jsou tyto bakterie zastoupeny hojněji, nicméně jejich potenciál pro biologické odstraňování fosforu není pravděpodobně technologicky využit.



Graf 1: Zastoupení *Candidatus Accumulibacter phosphatis* ve vzorcích aktivovaného kalu, hybridizováno s PAOmix



Graf 2: Zastoupení *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I a clade II ve vzorcích aktivovaného kalu

Dále byly vzorky hybridizovány se sondami Acc-I-444 a Acc-II-444. Jedná se o specifické sondy cílící na clady, konkrétně na *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I a clade II. Výsledky získané pozorováním hybridizovaných preparátů s těmito sondami jsou uvedeny v **Grafu 2**.

Porovnáním výsledků poskytnutých sondami Acc-I-444 a Acc-II-444 se směsnou sondou PAOmix bylo zjištěno, že sonda PAOmix nemůže být použita jako nadřazená nebo také obecná sonda při hodnocení výskytu *Candidatus Accumulibacter phosphatis* a následně jejich cladů, jelikož má nižší pokryvnost celé skupiny než jednotlivé specifické sondy. Směsná sonda PAOmix je obecně využívanou sondou, která, jak dokazují naměřená data, může sloužit pouze pro obecné hodnocení PAO ve vzorcích aktivovaného kalu, nikoli však jako výchozí sonda pro následné bližší specifikace jednotlivých organismů do cladů.

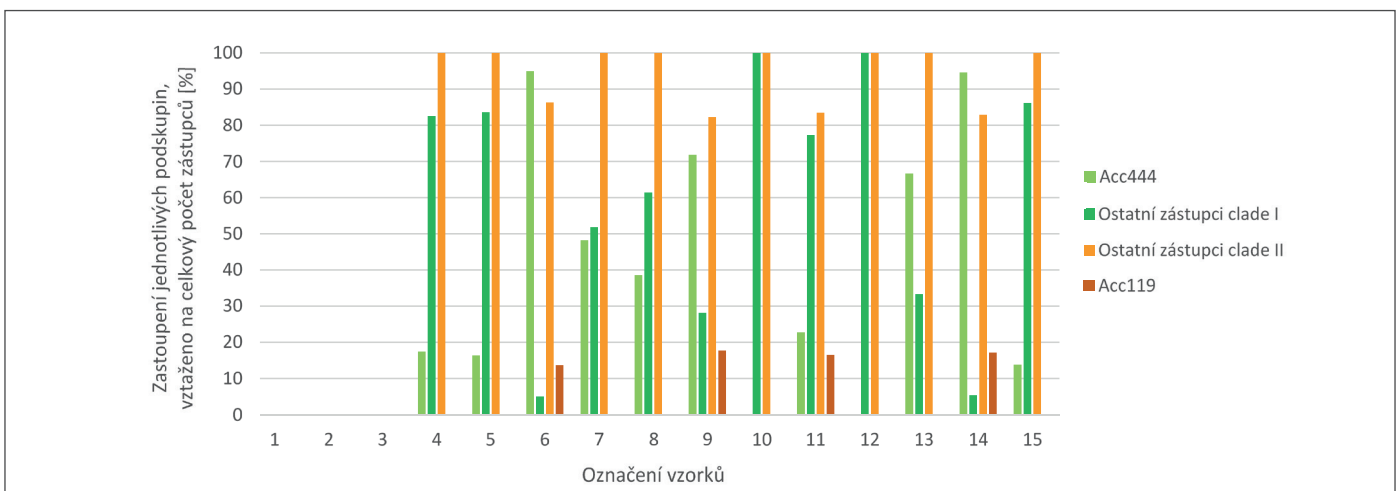
Výsledky zastoupení jednotlivých cladů ve vzorcích ukazují, že dominantní skupinou v kalesích je především *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade II. Výjimkou je vzorek 5, 8, 11 a srovnávací vzorek 15 z EBPR. V těchto vzorcích dominuje clade I. Tyto výsledky korelují také s výstupy získanými Wellesem et al. (2016) a ukazují, že clade I v konkurenci o substrát s clade II je výrazně pomalejší a je tak velmi pravděpodobné, že clade II bude v systému dominovat. Rovněž je clade II schopen svůj metabolismus plně změnit na GAM, a je tak adaptabilnější na různé změny podmínek v systému. Z monitoringu je tedy zřejmé, že pro přechod technologií odstraňování fosforu pomocí

srážení na biologický způsob, je potřeba upřednostňovat spíše clade II, jelikož je odolnější vůči změnám prostředí.

Aby bylo možné posoudit clady *Candidatus Accumulibacter phosphatis* v systémech a jejich afinitu k anoxické akumulaci fosforu, byli vybráni také dva zástupci jednotlivých podskupin, *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade IA a IIA. Pro jejich pozorování byly využity genové sondy Acc444 a Acc119. Získané výsledky jsou uvedeny v **Grafu 3**.

Výskyt zástupců cladu IA, tedy hybridizujících se sondou Acc444, se z celkového zastoupení organismů hybridizujících se sondou Acc-I-444 pohybovaly v rozmezí 14–70 %. Největší nálezy byly zaznamenány u vzorků 6 a 14. U těchto vzorků procentuální zastoupení činilo okolo 90 % z celkového počtu nálezů v preparátech. Clade IA byl nalezen v 9 ze 14 analyzovaných vzorků, přičemž zastoupení ve vzorcích bylo vždy téměř totožné nebo vyšší než ve srovnávacím vzorku 15 (vzorek EBPR), ve kterém bylo zastoupení cladu IA pouze 14 %. Při porovnání přítomnosti cladu IA se srovnávacím vzorkem 15 lze konstatovat, že především vzorky 4, 5, 7, 9, 11 a 13 mají ideální zastoupení těchto organismů pro přechod technologie k simultánnímu odstraňování dusíku a fosforu v anoxii, jelikož metabolismus tohoto cladu to umožňuje, jak je uvedeno ve studii provedené Flowersem et al. (2009). Druhým sledovaným zástupcem byl *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade IIA. Zde byl pozitivní nález pouze u 4 vzorků ze 14 analyzovaných, u srovnávacího vzorku 15 tento clad nebyl nalezen.

Graf 3: Zastoupení cladů IA a IIA ve vzorcích aktivovaného kalu



Z naměřených výsledků je také patrné, že vyšší nález byl u ostatních zástupců clade II (průměrně 50% zastoupení). Častěji se tedy vyskytují ostatní zástupci podskupiny cladu II (např. B–F), kteří se pravděpodobně na biologickém odstraňování fosforu budou podílet více než zástupci cladu I, jelikož se ve zkoumaných preparátech vyskytovali hojněji. Je proto potřeba se dále věnovat monitoringu také ostatních podskupin cladu II a objasnit jejich benefity při biologickém odstraňování fosforu z odpadních vod v anoxických podmínkách.

5 Závěr

Výsledky získané v experimentální části naznačují, že alespoň 9 ze 14 testovaných vzorků kalů obsahuje dostatečné množství *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I nebo II a rovněž jejich podskupinu A. U těchto ČOV by bylo možné přejít na simultánní biologické odstraňování dusíku a fosforu za současného snížení nároku na srážecí činidla pro odstranění fosforu tak, aby byly dodrženy odtokové parametry. *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade II byl ve vzorcích zastoupen hojněji než clade I, což nasvědčuje tomu, že tyto organismy jsou méně citlivé na změnu prostředí a složení přitékající odpadní vody. Je tedy vhodné se zaměřit spíše na ostatní podskupiny cladu II, ačkoli například clade IIA není schopen denitrifikovat z dusičnanů. Jelikož *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade II je mnohem tolerantnější ke změnám složení odpadní vody, mohou být tyto organismy klíčové při udržení správného chodu systémů EBPR, aby nedocházelo ke zvýšení odtokových koncentrací fosforu do recipientu a tím snižování kvality povrchových vod.

6 Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FT0P_2022_025.

7 Literatura

- Daims, H.; Lücker, S.; Wagner, M., 2006. *Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research*. Environmental Microbiology 8(2), 200–213. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00880.x>
- Dockx, L.; Caluwé, M.; Dobbeleers, T.; Dries, J., 2022. *Nitrous oxide formation during simultaneous phosphorus and nitrogen removal in aerobic granular sludge treating different carbon substrates*. Bioresource Technology 345, 126542. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126542>
- Flowers, J. J.; He, S.; Yilmaz, S.; Noguera, D. R.; McMahon, K. D., 2009. *Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal*

- sludges dominated by different ‘Candidatus Accumulibacter’ clades*. Environmental Microbiology Reports 1(6), 583–588. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00090.x>
- Kim, J. M.; Lee, H. J.; Kim, S. Y.; Song, J. J.; Park, W.; Jeon, C. O., 2010. *Analysis of the Fine-Scale Population Structure of ‘Candidatus Accumulibacter phosphatis’ in Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludge, Using Fluorescence In Situ Hybridization and Flow Cytometric Sorting*. Applied and Environmental Microbiology 76(12), 3825–3835. <https://doi.org/10.1128/AEM.00260-10>
- Kim, J. M.; Lee, H. J.; Lee, D. S.; Jeon, C. O., 2013. *Characterization of the Denitrification-Associated Phosphorus Uptake Properties of ‘Candidatus Accumulibacter phosphatis’ Clades in Sludge Subjected to Enhanced Biological Phosphorus Removal*. Applied and Environmental Microbiology 79(6), 1969–1979. <https://doi.org/10.1128/AEM.03464-12>
- Lanham, A. B.; Moita, R.; Lemos, P. C.; Reis, M. A. M., 2011. *Long-term operation of a reactor enriched in Accumulibacter clade I DPAOs: performance with nitrate, nitrite and oxygen*. Water Science and Technology 63(2), 352–359. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.063>
- Murnleitner, E.; Kuba, T.; van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J., 1997. *An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal*. Biotechnology and Bioengineering 54(5), 434–450. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970605\)54:5<434::AID-BIT4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<434::AID-BIT4>3.0.CO;2-F)
- Rubio-Rincón, F. J.; Lopez-Vazquez, C. M.; Welles, L.; van Loosdrecht, M. C. M.; Brdjanovic, D., 2017. *Cooperation between Candidatus Competibacter and Candidatus Accumulibacter clade I, in denitrification and phosphate removal processes*. Water Research 120, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.001>
- Seviour, R. J.; Mino, T.; Onuki, M., 2003. *The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems*. FEMS Microbiology Reviews 27(1), 99–127. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00021-4)
- van Loosdrecht, M. C. M.; Nielsen, P. H.; Lopez-Vazquez, C. M.; Brdjanovic, D. (Ed.), 2016. *Experimental methods in wastewater treatment*. IWA Publishing, London.
- Welles, L.; Lopez-Vazquez, C. M.; Hooijmans, C. M.; van Loosdrecht, M. C. M.; Brdjanovic, D., 2016. *Prevalence of ‘Candidatus Accumulibacter phosphatis’ type II under phosphate limiting conditions*. AMB Express 6(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0214-z>
- Yun, G.; Lee, H.; Hong, Y.; Kim, S.; Daigger, G. T.; Yun, Z., 2019. *The difference of morphological characteristics and population structure in PAO and DPAO granular sludges*. Journal of Environmental Sciences 76, 388–402. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.003>