

Estudio y modelación matemática del cambio metabólico de las bacterias responsables de la eliminación biológica del fósforo en el tratamiento de aguas residuales



Brenda Acevedo Juárez

Directores

Ramón Barat Baviera
Luis Borrás Falomir

Enero 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO
DE INGENIERÍA
HIDRÁULICA
Y MEDIO AMBIENTE



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO
DE INGENIERÍA
HIDRÁULICA
Y MEDIO AMBIENTE

TESIS DOCTORAL

Estudio y modelación matemática del cambio metabólico
de las bacterias responsables de la eliminación biológica
del fósforo en el tratamiento de aguas residuales

Presenta:

Brenda Acevedo Juárez

Directores:

Dr. Luis Borrás Falomir

Dr. Ramón Barat Baviera

Valencia, enero 2016.

*A los hombres que amo,
mi esposo **Himer** y mi hijo **Emmanuel**.*

Agradecimientos

Es para mí un verdadero placer utilizar este espacio, para expresar mi agradecimiento a las personas e instituciones que directa e indirectamente me brindaron su apoyo haciendo posible la realización de este trabajo.

Con especial agradecimiento a mis directores de tesis Ramón Barat Baviera y Luis Borrás Falomir, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por su tenacidad, su trabajo, su confianza en mí, por transmitirme sus conocimientos, por dar dirección a mi formación, por todo su apoyo, sus buenos consejos, comprensión y motivación no solo en el ámbito profesional sino en lo personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por poner la primera piedra al otorgarme la beca de posgrado en el extranjero.

I would like to thank Gilda Carvalho and Adrian Oehemen for receiving me in the Universidade Nova de Lisboa and giving me the opportunity to do a part of this thesis with you, thanks for sharing me your knowledge and giving me your friendship.

Al Dr. José Ferrer Polo y Dra. Aurora Seco Torrecillas por aceptarme como un miembro más del grupo CalAgua.

A Alberto Bouzas, Josep Ribes, Nuria Martí, Marcela Gatti, Vicky Ruano, Paqui García, Joaquín Serralta, Daniel Aguado, profesores de Máster y miembros del grupo CalAgua, por su apoyo durante la realización de este trabajo, sin nunca olvidar compartir buenos ánimos y una sonrisa.

A Mónica Murgui, Joana Piris, Raquel Golfe, Jesús Corona y Carla Carmiña, por su desempeño y compartir horas de trabajo para sus trabajos finales de Máster y colaboración con este trabajo de tesis, que además de dejar exitosos resultados dejó una buena amistad con cada uno de ustedes.

A mis compañeros del laboratorio en la Universidad de Valencia. A Javier Claros porque cuando pise por primera vez el laboratorio rompiste el hielo con una grata conversación, me brindaste tu apoyo desinteresado, me diste ánimos y seguridad.

A Javier Eduardo gracias por esa complicidad, por esa forma pintoresca latina de hablar que me hacía reír a carcajadas, gracias por escucharme y entenderme, por darme junto con Pili la mano tan repetidamente. A Freddy y Ángela por nuestras comidas juntos, pláticas y acompañarme en uno de los momentos más importantes de mi vida. A Ángel, Emerita, Juan B. y Ana R. por contagiarme de buenas vibras mostrando que aunque el trabajo no era sencillo había que ponerle buena cara y muchos ánimos. A Rafa un excelente químico, gracias por tus observaciones que aún sin pedirlos eran tan acertadas y siempre de muy buena ayuda. A Laura S. y Laura C. gracias por toda la ayuda y la confianza que junto con Sara, Berta, y Ana P. formamos un muy buen grupo de amigas.

A Marta, Dalghi y Eddy Roció gracias por la compañía en Lisboa (“Waka-Waka. This time for Africa.”), por las risas, paseos por Lisboa y una gran amistad.

A Natalia y Chelo gracias por el compañerismo y su apoyo durante la Máster, y lo mejor una amistad incondicional que me permitió albergar gratos recuerdos junto a sus familias y amigos.

A Luisa, Elena, Kristina, y especialmente a Cristina por compartir no sólo una casa, sino un hogar donde pasar un día era muy divertido. Gracias por impulsar siempre las sonrisas y la convivencia especialmente con Petter, Inma, Adriana, Jens y Josep que compartieron momentos muy especiales en casa y fuera de ella.

A Nora, Lili, Susan, Julieta, Lipita C., Lupita B., Brenda C., Ana L., Ana Florina, Teresa, Toño y Liz, Carlos e Ines, Omar y Claudia, Joe, Griselda, Roció, Miriam y los demás amigos en México, por la amistad que la distancia no opaco, por sus palabras de aliento “sabemos que lo lograrás” y bendiciones para terminar con este trabajo.

A mis padres Rafael y Virginia, mis hermanas Adriana y Carolina, mi sobrina Ileana, cuñados Jaime y Rafael, mi tía Feliza, mis suegros Modesta y Pedro y familiares, por su apoyo aún a la distancia, porque estos últimos años han soportado mi estrés, mi angustia y desesperación por terminar esto, por darme su comprensión, cariño y amor.

A Himer, gracias por aceptar y ayudarme a aceptar los retos que la vida nos ha puesto, porque a pesar de los tropiezos los hemos superado gracias al amor que nos tenemos, por no dejar que me rindiera, por ser fuerte y lógico ante las adversidades, por los sacrificios y el esfuerzo para concluir lo que empezamos juntos. Gracias por ser parte de mi y permitirme ser parte de ti.

A Emmanuel, mi gran motivación, a pesar de tu corta edad me has enseñado muchas cosas. Gracias a ti he visto el mundo con otros ojos, me has ayudado a madurar, le has dado sentido a los logros en mi vida. Concluir con este trabajo ha sido una gran travesía, lo sé, pero ver como día a día vamos superándolo me hace darme cuenta que podemos seguir adelante. Hijo mío eres la *luz* en mi corazón.

Resumen

El fósforo es de gran importancia para la vida debido a que desempeña un papel esencial en los procesos biológicos. El principal uso del fósforo está en la industria de los fertilizantes en forma de fosfatos. Estos fosfatos provienen principalmente de las rocas fosfáticas, las cuales podrían llegar a agotarse entre los próximos 50 y 100 años. La sobreexplotación de la roca fosfática, ha generado una disminución en la calidad de las reservas, y ha elevado el coste de su extracción, procesamiento y transporte marítimo.

Por otra parte, el fósforo proveniente de las aguas residuales, de la disolución de las rocas fosfáticas y de los suelos con excesivo aporte de fertilizantes, se deposita en los cuerpos de aguas superficiales produciendo un grave problema de contaminación llamado eutrofización.

Uno de los sistemas más empleados para reducir los niveles de fósforo en el agua residual es el proceso de eliminación biológica de fósforo (EBPR). Este proceso implica capturar biológicamente, alternando entre condiciones anaerobias óxicas/anóxicas, el fósforo del agua residual mediante organismos acumuladores de fósforo (PAOs). Sin embargo, uno de los principales problemas de este proceso, es la competencia de las PAOs con los organismos acumuladores de glucógeno (GAOs) por los ácidos grasos volátiles (AGV). Aunque si bien se han realizado muchos estudios sobre los factores que afectan la competencia entre PAOs y GAOs, existen aún muchas preguntas sin respuesta en relación al metabolismo de las PAOs cuando estas carecen de reservas energéticas en forma de polifosfatos intracelulares (poli-P) y a su efecto sobre la dinámica de las poblaciones de PAOs y GAOs en un sistema de fangos activados.

Es por ello que el objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en: estudiar a corto y largo plazo el comportamiento metabólico de las PAOs al cambiar el contenido en poli-P; analizar la dinámica poblacional de los microorganismos implicados en el proceso de EBPR; modelizar matemáticamente dicho comportamiento metabólico y por último evaluar la posible recuperación de fósforo mediante la extracción del poli-P presente en las PAOs.

En el estudio a corto y largo plazo se observó un cambio metabólico correlacionado con el contenido en poli-P, de forma que a bajos contenidos de poli-P las PAOs se comportaban metabólicamente como las GAOs, pero sin que estas últimas se llegaran a desarrollar de forma significativa. A pesar de observar el mismo comportamiento metabólico en ambos estudios, desde el punto de vista microbiológico se observaron diferencias. A corto plazo, las PAO Tipo II mostraron claramente el cambio metabólico, mientras que a largo plazo fueron las PAO Tipo I.

A partir de los experimentos realizados, se desarrollaron las expresiones necesarias (estequiométricas y cinéticas) para incluir los nuevos comportamientos observados (cambio metabólico) en los modelos metabólicos existentes en la actualidad. Expresiones tipo Monod fueron desarrolladas e implementadas en el modelo de las PAOs para representar el cambio entre los parámetros estequiométricos típicos del metabolismo PAO y GAO. El modelo fue calibrado y validado mostrando la capacidad de representar correctamente el cambio metabólico de las PAOs a concentraciones bajas de poli-P.

Al observar que las PAOs tienen la habilidad de cambiar su metabolismo a bajas concentraciones de poli-P, sin que se deteriorara el proceso por el desarrollo de las GAOs, se evaluaron dos estrategias de operación para la obtención de una corriente rica en fósforo que permita su posterior recuperación. Las estrategias estudiadas se diferenciaban en el nivel de extracción de poli-P de las PAOs. En la primera estrategia se extraía menos del 40 % de poli-P, mientras que en la segunda estrategia se llegaba a extraer más del 90 % de poli-P. La segunda estrategia mostró una eficacia de extracción superior, consiguiendo recuperar hasta el 81 % del fósforo presente en el agua residual.

Como resultado del trabajo realizado se han generado cuatro artículos, tres de ellos publicados en revistas de especial relevancia (2 en la revista *Water Research* y 1 en la revista *Chemical Engineering Journal*) que constituyen el cuerpo central de la presente tesis doctoral.

Abstract

Phosphorus is very important in life because it plays an essential role in biological processes. The main use of phosphorus is in the fertilizer industry in the form of phosphates. These phosphates come mainly from phosphate rocks which might be exhausted in 50 – 100 years. The overexploitation of phosphate rocks has resulted in decreased quality of reserves, and it has raised the cost of extraction, processing and shipping.

Moreover, phosphorus coming from wastewater, phosphate rock dissolution, and soil with an excessive supply of fertilizer, is deposited on the surface water bodies causing a serious pollution problem called eutrophication.

One of the systems most used to reduced phosphorus levels in the wastewater is the enhanced biological phosphorus removal (EBPR). This process involves capturing biologically, alternating between anaerobic oxic/anoxic conditions, the wastewater phosphorus through the phosphorus accumulating organisms (PAOs). However, one of the main problems of this process is that the glycogen accumulating organisms (GAOs) compete with PAOs for volatile fatty acids (VFA). Even though there have been many studies on the factors affecting competition between PAOs and GAOs, there are still many unanswered questions regarding the metabolism of PAOs when they lack energy reserves in the form of intracellular polyphosphates (poly-P) and its effect on the population dynamics of PAOs and GAOs in an activated sludge system.

Therefore, the main goal of this dissertation is to study short- and long-term the metabolic behavior of the PAOs to different levels of poly-P; to analyze the population dynamics of microorganisms involved in the process EBPR; to model mathematically that metabolic behavior; and finally, to evaluate the possible recovery of phosphorus by extracting poly-P present in the PAOs.

In the short- and long-term study was observed a metabolic shift correlates with the content in poly-P so that under low contents of poly-P the PAOs are able to behave as GAOs but without a significant development of the GAO population. Although, in both studies was observed the same metabolic behavior, from the

microbiological point of view were observed some differences. In the short-term, the PAO Type II clearly showed the metabolic shift, while long-term were the PAO Type I.

From the experiments performed, necessary expressions (stoichiometric and kinetic) were developed to include new behaviors observed (metabolic rate) in metabolic models existing today. Monod type expressions were developed and implemented on the model of the PAOs to represent the change between the typical stoichiometric parameters of PAO and GAO metabolism. The model was calibrated and validated showing the ability to correctly represent the metabolic change of PAOs under low concentrations of poly-P.

When was observed that with low concentrations of poly-P the PAOs have the ability to change its metabolism, without the process was deteriorated by the development of the GAO population, two operating strategies were evaluated to obtain a stream rich in phosphorus to allow later retrieval. The strategies studied differed in the level of extraction of the poly-P from PAOs. In the first strategy, it was extracted less than 40 % of poly-P, while the second strategy, it came to extract more than 90 % of poly-P. The second strategy showed a higher extraction efficiency, achieving recover up to 81 % of the phosphorus present in the wastewater.

As a result, of work performed four articles were generated, three of them published in journals of particular importance (2 in the journal Water Research and 1 in the journal Chemical Engineering Journal) constituting the main body of this thesis.

Resum

El fòsfor és de gran importància per a la vida a causa que exerceix un paper essencial en els processos biològics. El principal ús del fòsfor està en la indústria dels fertilitzants en forma de fosfats. Aquests fosfats provenen principalment de les roques fosfatades, les quals podrien arribar a esgotar-se entre els pròxims 50 i 100 anys. La sobreexplotació de la roca fosfatada, ha generat una disminució en la qualitat de les reserves, i ha elevat el cost de la seua extracció, processament i transport marítim.

D'altra banda, el fòsfor provinent de les aigües residuals, de la dissolució de les roques fosfatades i dels sòls amb excessiva aportació de fertilitzants, es diposita en els cossos d'aigües superficials produint un greu problema de contaminació anomenat eutrofització.

Un dels sistemes més utilitzats per a reduir els nivells de fòsfor en l'aigua residual és el procés d'eliminació biològica de fòsfor (EBPR). Aquest procés implica capturar biològicament, alternant entre condicions anaeròbies aeròbies/anòxies, el fòsfor de l'aigua residual mitjançant organismes acumuladors de fòsfor (PAOs). No obstant açò, un dels principals problemes d'aquest procés, és la competència de les PAOs amb els organismes acumuladors de glucogen (GAOs) pels àcids grassos volàtils (AGV). Encara que si bé s'han realitzat molts estudis sobre els factors que afecten la competència entre PAOs i GAOs, existixen encara moltes preguntes sense resposta en relació al metabolisme de les PAOs quan aquestes careixen de reserves energètiques en forma de polifosfat intracel·lulars (poli-P) i al seu efecte sobre la dinàmica de les poblacions de PAOs i GAOs en un sistema de fangs activats.

És per això que l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral consisteix en: estudiar a curt i llarg termini el comportament metabòlic de les PAOs en canviar el contingut en poli-P; analitzar la dinàmica poblacional dels microorganismes implicats en el procés de EBPR; modelatge matemàticament d'aquest comportament metabòlic i finalment avaluar la possible recuperació de fòsfor mitjançant l'extracció del poli-P present en les PAOs.

En l'estudi a curt i llarg termini es va observar un canvi metabòlic correlacionat amb el contingut en poli-P, de manera que a baixos continguts de poli-P les PAOs es comportaven metabòlicament com les GAOs, però sense que aquestes últimes s'arribaren a desenvolupar de forma significativa. Malgrat observar el mateix comportament metabòlic en tots dos estudis, des del punt de vista microbiològic es van observar diferències. A curt termini, les PAO Tipus II van mostrar clarament el canvi metabòlic, mentre que a llarg termini van ser les PAO Tipus I.

A partir dels experiments realitzats, es van desenvolupar les expressions necessàries (estequiomètriques i cinètiques) per a incloure els nous comportaments observats (canvi metabòlic) en els models metabòlics existents en l'actualitat. Expressions tipus Monod van ser desenvolupades e implementades en el model de les PAOs per a representar el canvi entre els paràmetres estequiomètrics típics del metabolisme PAO i GAO. El model va ser calibrat i validat mostrant la capacitat de representar correctament el canvi metabòlic de les PAOs a concentracions baixes de poli-P.

En observar que les PAOs tenen l'habilitat de canviar el seu metabolisme a baixes concentracions de poli-P, sense que es deteriorara el procés pel desenvolupament de les GAOs, es varen avaluar dues estratègies d'operació per a l'obtenció d'un corrent ric en fòsfor que permetia la seua posterior recuperació. Les estratègies estudiades es diferenciaven en el nivell d'extracció de poli-P de les PAOs. En la primera estratègia es va extraure menys del 40 % de poli-P, mentre que en la segona estratègia s'arribava a extraure més del 90 % de poli-P. La segona estratègia va mostrar una eficàcia d'extracció superior, aconseguint recuperar fins al 81 % del fòsfor present en l'aigua residual.

Com a resultat del treball realitzat s'han generat quatre articles, tres dels quals publicats en revistes d'especial rellevància (2 en la revista *WaterResearch* i 1 en la revista *ChemicalEngineeringJournal*) que constitueixen el cos central de la present tesi doctoral.

Índice general

Dedicatoria	III
Agradecimientos	V
Resumen	VII
Índice de figuras	XVII
Índice de tablas	XIX
1 Estado del arte	1
1.1 El fósforo	1
1.2 Contaminación del agua por fósforo	2
1.2.1 Importancia de la depuración de aguas residuales	4
1.2.2 Eliminación de fósforo de las aguas residuales	5
1.3 Proceso de eliminación biológica de fósforo	7
1.3.1 Antecedentes del proceso de eliminación biológica de fósforo	8
1.3.2 Condiciones operacionales que favorecen el proceso de elimi-	
nación biológica de fósforo	12
1.3.3 Modelos matemáticos del proceso de eliminación biológica	
de fósforo	14
1.3.4 FISH en los procesos de eliminación biológica de fósforo . .	24
1.3.5 Bioquímica del proceso de eliminación biológica de fósforo .	28
1.4 Cambios en el ciclo biogeoquímico del fósforo	34
1.5 Recuperación de fósforo	36
1.5.1 Recuperación de fósforo mediante el proceso de eliminación	
biológica de fósforo	37
2 Objetivos	41
3 Materiales y métodos	43
3.1 Descripción del montaje experimental	44
3.2 Diseño de experimentos	47
3.2.1 Puesta en marcha	48

3.2.2	Seguimiento del proceso de eliminación biológica de fósforo	48
3.2.3	Métodos analíticos	49
3.2.4	Métodos microbiológicos	52
3.2.5	Ciclo de extracción de fósforo	58
4	Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms	59
4.1	Introduction	60
4.2	Materials and methods	61
4.2.1	Reactor setup and operation	61
4.2.2	Experimental design	62
4.2.3	Analytical methods and microbiological techniques	63
4.3	Results and discussion	65
4.4	Conclusions	75
5	Long term study of PAO metabolic behaviour under negligible Poly-P reserves	81
5.1	Introduction	82
5.2	Materials and methods	83
5.2.1	Experimental design	84
5.2.2	Analytical methods and microbiological techniques	84
5.3	Results and discussion	85
5.4	Conclusions	95
6	Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms	101
6.1	Introduction	102
6.2	Materials and methods	103
6.3	Model extension	104
6.3.1	Stoichiometry	105
6.3.2	Kinetic	109
6.4	Results and discussion	111
6.4.1	Model calibration: kinetic parameters	111
6.4.2	Model validation	115
6.5	Conclusions	117
7	The metabolic versatility of PAOs as an opportunity for the P-recovery	121
7.1	Introduction	122
7.2	Materials and methods	124
7.2.1	Experimental device	124
7.2.2	Experimental design	125
7.2.3	Analytical methods and microbial techniques	126
7.3	Results and discussion	127
7.3.1	Biological process performance	129

7.4 Conclusions	137
8 Discusión general de resultados	141
9 Conclusiones	155
10 Desarrollos futuros	157
Referencias	159
A Stoichiometric matrix	175
B Anaerobic and aerobic sensitivity analysis	181
C Error analysis	211
C.1 Error analysis of calibration tests	211
C.2 Error analysis of validation tests	212
D Información suplementaria y la primera hoja de los papers aceptados	219

Índice de figuras

1.1	Composición del fósforo total en las aguas residuales.	6
1.2	Esquema de un sistema PhoStrip.	9
1.3	Esquema de un sistema A/O.	9
1.4	Evolución de los componentes involucrados en el proceso EBPR. . .	10
1.5	Esquema de un sistema SBR.	11
1.6	Modelo metabólico de Comeau <i>y col.</i> y Wentzel <i>y col.</i>	18
1.7	Ciclo del ácido tricarboxílico.	19
1.8	Modelo metabólico de Mino <i>y col.</i>	20
1.9	Modelo metabólico de las PAOs según Smolders <i>y col.</i>	22
1.10	Modelo metabólico de las GAOs según Zeng <i>y col.</i>	23
1.11	Modelo metabólico de las PAOs propuesto por Hesselmann <i>y col.</i> . .	29
1.12	Modelo metabólico de las PAOs propuesto por Martín <i>y col.</i>	32
1.13	Evolución de la población mundial.	35
1.14	Esquema del ciclo biogeoquímico del fósforo en la actualidad. . . .	36
3.1	Montaje del SBR.	44
3.2	Diagrama del montaje del SBR.	45
3.3	Fases de un ciclo del SBR.	46
3.4	Diagrama de flujo del procedimiento experimental.	47
3.5	Fases del ciclo de extracción de poli-P de la biomasa en un SBR. . .	58
4.1	Experimental design and phases of the biomass conditioning cycle for removing poly-P.	63
4.2	Monitoring of $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ and initial pH of phase anaerobic. . .	65
4.3	Evolution of carbon sources and phosphorus during the EX2.	66
4.4	Evolution of carbon compounds and phosphorus during the exper- iments.	68
4.5	Ratios $\text{P}_{\text{release}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ and $\text{Gly}_{\text{degraded}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ observed in the sludge with different amounts of poly-P.	70
4.6	Experimental values obtained for the ratios $\text{PHA}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$, $\text{PHB}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ and $\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ at different amounts of intracellular poly-P.	71
4.7	PAOs population dynamics in the experiments.	73

4.8	Schematic anaerobic metabolism for PAOs.	74
5.1	Profile of the $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ ratio, pH at the beginning and end of the anaerobic phase, pH max aerobic and VFA concentration at the beginning of the anaerobic stage.	85
5.2	Evolution of the main sludge components in an SBR cycle.	89
5.3	Concentration of poly-P, TSS, VSS and HAc at the beginning and end of the anaerobic phase.	90
5.4	Representation of anaerobic and aerobic ratios obtained in this long-term research compared with those reported in the short-term experimentation en Acevedo <i>et al.</i>	91
5.5	Microbial monitoring in the SBR.	92
6.1	Experimental data of the stoichiometric parameters obtained by Acevedo <i>et al.</i>	106
6.2	Error analysis for different combination of half saturation constants for the predictions of acetate, phosphate, PHA and glycogen in the experiments obtained by Acevedo <i>et al.</i>	109
6.3	Model calibration results for experiments 1 and 6.	113
6.4	Model validation results for the experiments 2, 3, 4, 5 and 7.	116
7.1	Stages implemented during the phosphorus recovery cycle.	125
7.2	Experimental design for this study.	126
7.3	VFAs, P- PO_4 , pH, and conductivity variations during P recovery cycle and the cycles before and after.	128
7.4	Evolution of phosphorus compounds during the strategies.	130
7.5	Evolution of YPO_4 and phosphate at the end of anaerobic phase for the strategies.	133
7.6	Population dynamics microbiological of strategies of this study.	134
7.7	Weekly phosphate input and output from both strategies.	136
8.1	Morfología de las PAOs y GAOs.	143
8.2	Observaciones microbiológicas de gránulos de poli-P con tinción azul de metileno.	145
8.3	Observaciones microbiológicas con FISH.	147
8.4	Esquema metabólico anaerobio para las PAOs.	149

Índice de tablas

1.1	Requisitos de vertido procedentes de EDAR según la normativa europea vigente.	5
1.2	Ejemplo de una matriz para un modelo matemático.	15
1.3	Cinética de la fase anaerobia y aerobia del modelo metabólico de las PAOs según Smolders <i>y col.</i>	22
1.4	Sondas FISH publicadas para hibridar sobre el 16S rRNA de las PAOs.	26
1.5	Sondas FISH publicadas para hibridar sobre el 16S rRNA de las GAOs.	27
3.1	Descripción detallada del montaje SBR.	45
3.2	Variables operacionales del proceso.	46
3.3	Agua residual sintética.	47
3.4	Sondas generales de las PAOs y las GAOs.	55
3.5	Reactivos y volúmenes de la solución tampón de hibridación en la técnica FISH.	57
3.6	Reactivos y volúmenes de la solución tampón de lavado en la técnica FISH.	57
4.1	Oligonucleotide probes used in this study.	64
4.2	Stoichiometric parameters observed in this study and proposed in literature, for processes that use acetate as C source.	67
4.3	Phosphorus, poly-P, TSS and VSS content in the biomass and microbiological results in all the experiments.	69
5.1	Stoichiometric parameters observed in this study and proposed in literature, for processes that use acetate as C source.	88
6.1	Stoichiometric parameters of the proposed model.	109
6.2	Stoichiometric matrix.	110
6.3	Experiments used for model calibration and validation.	113
6.4	Kinetic parameters implemented in this study.	114

7.1	Oligonucleotide probes used in this study.	127
7.2	Efficiency of phosphorus extraction and poly-P reduction during experiments.	131
A.1	Stoichiometric matrix (S).	176
A.2	Stoichiometric matrix (X).	177
A.3	Anaerobic stoichiometric of <i>Accumulibacter</i>	178
A.4	Kinetic expression for <i>Accumulibacter</i>	179
A.5	Kinetics parameters and kinetic coefficients for biomass.	180
C.1	Stoichiometric anaerobic parameters.	213
C.2	Kinetic anaerobic parameters.	214
C.3	Kinetic aerobic parameters.	215
C.4	Stoichiometric anaerobic parameters.	216
C.5	Kinetic anaerobic parameters.	217
C.6	Kinetic aerobic parameters.	218

Capítulo 1

Estado del arte

1.1 El fósforo

La palabra fósforo proviene del latín *phosphorus*, y éste del griego *phosphoros*; es un elemento muy reactivo que emite luz al oxidarse espontáneamente en contacto con el oxígeno atmosférico, de ahí que, su nombre signifique portador de luz.

En la naturaleza, el fósforo no se da en estado puro, se encuentra formando parte de numerosos minerales. El fósforo, es el elemento base de un gran número de compuestos, de los cuales, los fosfatos (PO_3^-) son los más importantes. Los minerales que contienen fósforo se encuentran en forma de rocas fosfóricas como apatita. De casi 200 fosfatos minerales diferentes, sólo uno, la fluorapatita ($\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$) se extrae esencialmente de grandes depósitos secundarios originados de los huesos de animales que se hallan en el fondo de mares prehistóricos, y de los guanos depositados sobre rocas antiguas.

El fósforo es de gran importancia para la vida, debido a que desempeña un papel esencial en los procesos de transferencia de energía, la función nerviosa, la acción muscular, el metabolismo y la fotosíntesis. Un adulto humano contiene aproximadamente 0.7 kg de fósforo. Los animales adquieren el fósforo de los alimentos (plantas o animales de niveles tróficos inferiores). Las plantas absorben el fósforo del suelo. Finalmente, las plantas y los animales devuelven el fósforo al suelo a través de la excreción de la orina, las heces, y por medio de la descomposición y mineralización llevada a cabo por hongos y descomponedores de tejidos.

La importancia económica del fósforo reside en los fosfatos como principal componente de los fertilizantes. Usualmente, se emplea el ortofosfato diácido de calcio ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) u ortofosfato ácido de calcio (CaHPO_4). Hoy en día, toda la agricul-

tura moderna es dependiente de las entradas de fertilizantes fosfatados derivados principalmente de la roca fosfática para reponer el fósforo retirado del suelo por los cultivos. Los fertilizantes minerales se obtienen combinando los fosfatos extraídos con ácido sulfúrico, nitrógeno y potasio. Sin embargo, este tipo de agricultura no es sostenible; las reservas de roca fosfática existentes podrían agotarse entre los próximos 50 y 100 años. La industria de los fertilizantes reconoce que la calidad de las reservas está disminuyendo, mientras el coste de la extracción, el procesamiento y el transporte marítimo es cada vez mayor (Cordell *y col.*, 2009). El fósforo también se utiliza en la industria química; se fabrican grandes cantidades de ácido fosfórico (H_3PO_4), para emplearlo principalmente en la fabricación de detergentes.

Por otra parte, el fósforo proveniente de la disolución de las rocas fosfatadas, de la erosión de los suelos fuertemente fertilizados, de los detergentes y de las aguas residuales urbanas e industriales, es depositado en las masas de aguas superficiales, donde los microorganismos acuáticos (plantas y fitoplancton) tienden a desarrollarse rápidamente desencadenando junto con otros factores el problema llamado eutrofización.

1.2 Contaminación del agua por fósforo

El agua es esencial para la supervivencia de todas las formas de vida conocidas. En el planeta podemos encontrar agua dulce y salada. El agua dulce contiene cantidades mínimas de sales disueltas; por lo que es empleada en casi todas las actividades cotidianas e industriales. El agua salada contiene 3.3 g de sales disueltas por cada 100 g de disolución, por lo que se necesita de un tratamiento previo para que pueda ser empleada como agua de consumo.

La cantidad de agua dulce en el planeta es muy pequeña. De un total de 1360 millones de km^3 de agua, el 97 % es agua salada de los océanos, el 2.24 % es agua dulce que se encuentra en los glaciares y capas de hielo, principalmente en la Antártida y Groenlandia, y el 0.76 % es agua dulce de ríos, arroyos, manantiales y depósitos subterráneos. Tan solo un 0.6 % del volumen total es aprovechable para las actividades humanas.

Cuando las fuentes naturales de agua están en contacto con el aire y el suelo se producen diversos procesos físicos, químicos y biológicos naturales. Estos procesos provocan cierto grado de contaminación ocasionando una variación en la calidad de agua. Esta contaminación natural es compensada por los procesos de autodepuración que ocurren en las mismas. Sin embargo, en el último siglo el crecimiento de población ha demandado cada vez más los ecosistemas terrestres y acuáticos. La superficie terrestre ha sido transformada entre un tercio y la mitad; las actividades como el desbroce de tierras, la agricultura, la silvicultura, la ganadería, la urbanización y la alteración del ciclo hidrológico han cambiado radicalmente el

mundo; además, de tener un alto impacto sobre los ciclos biogeoquímicos globales de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) (Smith *y col.*, 1999).

La contaminación, en el caso de lagos, embalses, ríos y océanos es causada principalmente por el inadecuado tratamiento de aguas residuales industriales y municipales, vertidos ganaderos y agrícolas, granjas acuícolas, deposición atmosférica de óxidos de nitrógeno (NO_x) y fósforo, fertilizantes e instalaciones industriales. Se estima que en países en desarrollo, entre el 80 % y el 90 % del agua residual urbana y el 70 % de agua residual industrial se descarga directamente en cuerpos de agua superficiales, sin recibir ningún tratamiento previo (Corcoran, 2010). Esto trae consecuencias en: la cadena trófica, como la bioacumulación; en la salud pública y en el medio ambiente con problemas difíciles de reparar como la eutrofización.

Se considera un sistema acuático eutrofizado cuando el crecimiento de organismos como plantas acuáticas y microorganismos fotosintéticos se ven favorecidos por altos niveles de nutrientes. Aunque el término eutrofización se aplica más comúnmente a los lagos de agua dulce y embalses, éste también se aplica a las aguas de estuarios y aguas marinas costeras (Edmondson, 1995). Los resultados de la degradación de fuentes de agua por eutrofización son las pérdidas de las especies que las componen, así como la degradación de instalaciones y servicios que estos sistemas proporcionan.

En los sistemas acuáticos siempre hay suficiente carbono; en exceso, cuando sumamos las aportaciones de las descargas de aguas residuales. Estas aguas residuales contienen altos niveles de componentes inorgánicos que pueden ser fácilmente biodegradables para el crecimiento celular. Sin embargo, el crecimiento celular puede ser interrumpido debido a la insuficiencia de algún nutriente esencial.

De los muchos recursos minerales, se encontró que principalmente el nitrógeno inorgánico y el fósforo inorgánico son nutrientes que limitan el crecimiento, tanto, de plantas terrestres como de algas y plantas vasculares en agua dulce y ecosistemas marinos (Schlesinger *y col.*, 2013; Vitousek *y col.*, 1991; Smith, 1998). En la mayoría de los lagos y embalses el fósforo suele ser el nutriente limitante (Schindler, 1977; Hecky *y col.*, 1988), mientras que en los sistemas de agua salada el nitrógeno es el principal nutriente limitante (Karydis *y col.*, 2012). Aunque el nitrógeno es considerado el limitante de producción primaria en la mayoría de los océanos del mundo, varios estudios sugieren que el Mar Mediterráneo puede ser la excepción, siendo, en algunas zonas del Mar Mediterráneo el fósforo el nutriente limitante (Karydis *y col.*, 2012). Por lo tanto, a pesar de que el nitrógeno es probablemente la principal causa de la eutrofización en la mayoría de los sistemas costeros, la gestión óptima de la eutrofización costera sugiere controlar tanto el nitrógeno como el fósforo, debido a que el fósforo puede limitar la producción primaria en algunos sistemas alrededor del mundo.

1.2.1 Importancia de la depuración de aguas residuales

A principios del siglo XX algunas ciudades e industrias se dieron cuenta de los problemas sanitarios que ocasionaban los vertidos directos de aguas residuales sobre los ríos, lo que llevó a la construcción de instalaciones de depuración. El objetivo de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), entre los años sesenta y setenta, era la eliminación de los sólidos en suspensión, la materia orgánica biodegradable y los organismos patógenos. A partir de los setenta, se añadió un nuevo objetivo; el eliminar nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, con el fin de evitar la eutrofización (Tchobanoglous *y col.*, 1991).

A principio de los años noventa, se promulga la Directiva 91/271/CEE del Consejo Europeo sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas. Esta Directiva, establece para los Estados miembros el objetivo de la protección del medio ambiente sobre los efectos negativos provocados por los vertidos de aguas residuales urbanas y de determinados sectores industriales, solicitando a los estados miembros que adopten las medidas necesarias para garantizar que dichas aguas sean tratadas correctamente antes de su vertido.

La Directiva 91/271/CEE obliga a los Estados miembros a que los tratamientos serán más o menos rigurosos, teniendo en cuenta las características del emplazamiento donde se producen los vertidos. Es decir, según se efectúen en zonas calificadas como “sensibles”, “menos sensibles” o “normales”. Los Estados miembros establecieron la cualificación de dichas zonas, basándose en las disposiciones del anexo II de la Directiva 91/271/CEE.

La Directiva 91/271/CEE también establece la obligación de ser transpuesta al marco jurídico de cada Estado miembro. En el caso de España la transposición al derecho nacional se realizó mediante el Real Decreto-Ley 11/1995, el cual establece las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. A su vez el R.D. 509/1996 complementa la incorporación de la Directiva al: determinar los requerimientos técnicos que deberían cumplir los colectores y las instalaciones de tratamiento de aguas residuales; determinar los requisitos de los vertidos procedentes de instalaciones secundarias y de aquellos que vayan a realizarse en zonas sensibles; regular el tratamiento previo de los vertidos de las aguas residuales industriales cuando estos vayan a sistemas de colectores o instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas.

La Directiva 91/271/CE en lo relativo a las especificaciones sobre los requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles propensas a eutrofización, es modificada por la Directiva 98/15/CE. Por lo cual, mediante el R.D. 2116/1998 modifica el cuadro 2 del anexo I del R.D. 509/1996. Entonces, de acuerdo a la presente normativa, los requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas

residuales limitan el contenido de contaminantes a los valores que aparecen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Requisitos de vertido procedentes de EDAR según la normativa europea vigente sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.

Parámetro	Zonas normales ^a		Zonas sensibles ^b	
	Concentración mg/l	Reducción ^b %	Concentración mg/l	Reducción ^b %
DBO ₅	25	79 – 90	25	79 – 90
DQO	125	75	125	75
Sólidos en suspensión	35	90	35	90
Fósforo Total			2 (10000 – 100000 he) 1 (> 100000 he)	80
Nitrógeno Total ^c			15 (10000 – 100000 he) ^d 10 (> 100000 he) ^d	70 – 80

^a Los Estados miembros establecen de acuerdo a la Directiva 91/271/CEE las zonas sensibles y menos sensibles.

^b Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.

^c Nitrógeno total equivale a la suma de nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato y nitrógeno en forma de nitrito.

^d Estos valores de concentración constituyen medias anuales. No obstante los requisitos de vertido de nitrógeno pueden comprobarse mediante medias diarias. En este caso, la media diaria no deberá superar los 20 mg N/l de concentración para todas las muestras cuando la temperatura del reactor biológico sea superior o igual a 12°C. En sustitución al requisito de la temperatura, se podrá aplicar una limitación del tiempo de funcionamiento que tenga en cuentas las condiciones climáticas regionales.

Como consecuencia de esto las EDAR se ven obligadas a reducir o eliminar los nutrientes en las aguas residuales cuando se vierte a sistemas naturales calificados como sensibles. La eliminación de estos nutrientes puede llevarse a cabo tanto por procesos fisicoquímicos como por procesos biológicos, siendo estos últimos los de mayor proyección, ya que las nuevas tecnologías se han enfocado no solo a obtener un grado mayor de depuración sino también a reducir los costes de depuración y a la recuperación de nutrientes, en especial nitrógeno y fósforo.

1.2.2 Eliminación de fósforo de las aguas residuales

En las aguas residuales el fósforo proviene principalmente de los desechos humanos, de las actividades industriales, de los detergentes sintéticos y de los productos de limpieza. La influencia de los detergentes es fundamental en el contenido de fósforo de las aguas residuales. De manera que en los sitios donde se aplica la normativa europea sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, se consiguen importantes reducciones del contenido de fósforo en el agua residual. También se consigue cierta reducción debido al pretratamiento que aplican muchas industrias antes de verter sus aguas residuales en los colectores urbanos.

La concentración media de fósforo total (P_T) en las aguas residuales urbanas está en el intervalo de 5 – 15 mg/l. Las formas más comunes en que se presenta el fósforo en el agua residual son:

Ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$ y H_3PO_4) . En aguas residuales urbanas suelen encontrarse en un intervalo de concentración entre 3 – 7 mg/l.

Esta forma es fácilmente asimilable por la biomasa en tratamientos de aguas residuales. Los ortofosfatos pertenecen a la fracción inorgánica del fósforo total presente en las aguas residuales.

Polifosfatos ($(\text{PO}_3^{3-})_n$). Formados por la unión en cadena lineal de iones ortofosfato. El primer representante de la serie es el ion pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$). Dependiendo de su origen contienen entre 2 y 7 átomos de fósforo. Todos los polímeros del fosfato en medio acuoso se hidrolizan lentamente siendo el producto final el ion ortofosfato, por lo que también son parte de la fracción inorgánica del fósforo total en aguas residuales. Proceden principalmente de detergentes, aunque cada vez su uso es menor.

Fósforo precipitado (me-P). Fracción de ortofosfatos que forma precipitados con metales.

Fósforo orgánico. Proviene de residuos de animales y alimenticios y está constituido por ácidos nucleicos, fosfolípidos y adenosín tri-fosfato (ATP). Su concentración típica es de 3 mg/l.

El fósforo total en aguas residuales se puede dividir en fósforo soluble y particulado. Se identifica como fósforo soluble a los ortofosfatos y el fósforo orgánico soluble; y como fósforo particulado al polifosfato, el fósforo precipitado y el fósforo orgánico particulado (Metcalf, 2003)(Figura 1.1).

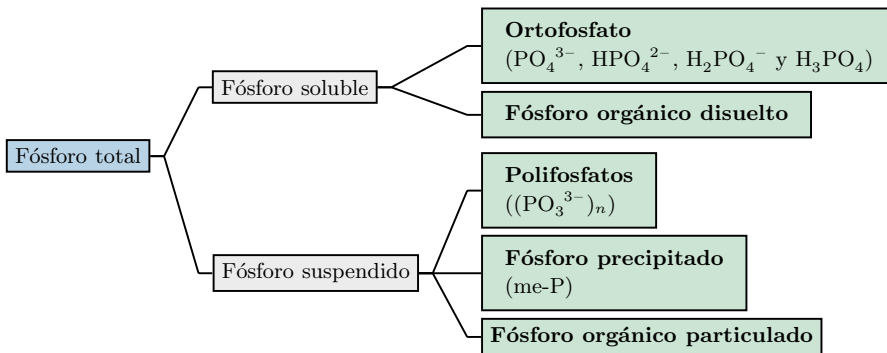


Figura 1.1: Composición del fósforo total en las aguas residuales.

La eliminación de fósforo de aguas residuales se puede realizar por métodos físico-químicos (precipitación química) y biológicos (eliminación biológica de fósforo), presentando cada uno ventajas y desventajas.

Tradicionalmente el método más utilizado para la eliminación de fósforo de las aguas residuales en las EDAR ha sido el proceso de precipitación química. El mecanismo principal de la precipitación química es la interacción del ion metálico de una sal metálica con el ortofosfato para formar un precipitado insoluble. Las reac-

ciones que ocurren entre las sales metálicas y el fosfato son complejas, y dependen de las características del agua residual y de las formas en las que se encuentre el fósforo. Entre los productos químicos más utilizados en dicho proceso están las sales de aluminio, hierro o calcio. Las más utilizadas son: el sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$), el aluminato de sodio ($\text{Na}_2\text{OAl}_2\text{O}_3$), el cloruro férrico (FeCl_3), el sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), el cloruro ferroso (FeCl_2) o el sulfato ferroso (FeSO_4); y con menor frecuencia se emplea la cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), que aunque es más accesible y de menor coste, exige mantener un pH demasiado elevado y provoca la precipitación de otros compuestos, así como la necesidad de un reajuste posterior. Cada reactivo posee un intervalo de pH para su operación óptima.

La eliminación de fósforo por precipitación química presenta las siguientes desventajas:

- Aumento de los costes del tratamiento del agua residual, por la adición de las sales metálicas y el ajuste de pH.
- Importante aumento en la producción de fangos generados por la precipitación química. Los fangos alcanzan un aumento del 50 % más en masa y más de un 150 % en volumen según el reactivo empleado, incidiendo en los costes de bombeo y disposición.
- Deterioro en la calidad del fango producido, limitando su posible utilización como fertilizante en la agricultura.

1.3 Proceso de eliminación biológica de fósforo

El proceso de eliminación biológica de fósforo (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) en un sistema de fangos activados, es la otra alternativa, para la eliminación de fósforo de las aguas residuales. Este proceso implica la incorporación del fósforo a la biomasa y su eliminación posterior en forma de fango rico en fósforo. No requiere el empleo de reactivos por lo que supone un ahorro en costes y es considerado un proceso más eficiente y sostenible, debido a que la eliminación biológica de fósforo permite la posterior recuperación de este, lo cual no es viable en el caso de la eliminación química de fósforo tal y como se había comentado anteriormente.

En un proceso convencional de fangos activados, del agua residual se puede llegar a eliminar entre un 20 y 30 % de fósforo, como consecuencia de la incorporación de fósforo a la biomasa. Además de un 10 % de eliminación en la decantación primaria. En plantas con fangos activos que en su configuración incluyen: la alternancia de condiciones anaerobias y aerobias/anóxicas sobre el fango activado y la presencia de ácidos grasos volátiles (AGV) en el agua residual, se alcanzan rendimientos

del 80 % en la eliminación de fósforo soluble (PO_4) sin necesidad de tratamientos químicos.

Al igual que la precipitación química, el proceso EBPR presenta desventajas. Las principales son:

- La dificultad de predecir la velocidad y porcentaje de eliminación de fósforo.
- La dificultad del control efectivo de la eficiencia del proceso. Esto mismo ocurre usualmente en los procesos biológicos convencionales. Generalmente en el proceso EBPR los niveles de descarga son garantizados por una etapa de precipitación química final.
- La producción de un fango flotante, causado por microorganismos hidrofóbicos, como *Microthrix* que es una de las principales bacterias que se han encontrado en los procesos biológicos de eliminación de fósforo.

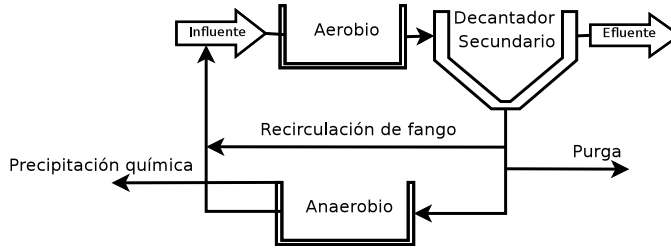
1.3.1 Antecedentes del proceso de eliminación biológica de fósforo

A mitad de los años sesenta se observó que en ciertas situaciones el fango activo era capaz de eliminar un alto porcentaje del fósforo presente en el agua residual. En las plantas de fangos activados donde se detectó este fenómeno, se daba la coincidencia de existir un tanque de estabilización anaerobio y posteriormente la mezcla de fango de retorno y el influente se distribuían a las balsas de aireación.

Tras los primeros estudios de la eliminación biológica de fósforo, Levin *y col.* (1965) desarrollaron la primera configuración del proceso de eliminación biológica de fósforo a gran escala llamada PhoStrip (Figura 1.2). Esta configuración consistió en retornar el fango activado a un tanque de aireación, después de haber estado en un fermentador donde el sobrenadante se enriquece en fósforo. Ese sobrenadante es separado para ser tratado con cal y obtener un precipitado. En el tanque de aireación el fósforo es eliminado del influente. Mediante este proceso, se observó que la eliminación de fósforo era muy eficiente; sin embargo, no se tenía una explicación clara del fenómeno.

En 1971, Milbury, observó en plantas de Estados Unidos, en que se eliminaba fósforo, se usaban sistemas de flujo de pistón sin nitrificación, presentando una liberación de fósforo en las zonas anaerobias. Posteriormente, Barnard en 1976 planteó las bases para el desarrollo científico de los estudios de EBPR, identificando como principales factores para la eliminación biológica de fósforo: la necesaria ausencia de nitratos en la fase anaerobia, la alternancia de ambientes anaerobio/aerobio o anóxico. En base a esas observaciones y estudios, Barnard desarrolló la configuración denominada Anaerobio/Óxico (A/O) con sus variaciones para la eliminación de nitrógeno (Barnard, 1976), ver figura 1.3.

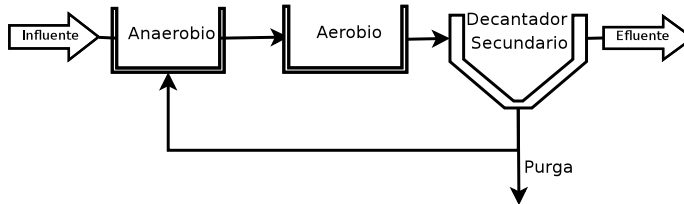
Configuración PhoStrip



Sistema de tratamiento que permite la eliminación de la materia orgánica y fósforo. Está constituido por un reactor aerobio y otro anaerobio. En el reactor aerobio tiene lugar la oxidación de la materia orgánica y el almacenamiento intracelular de fósforo en forma de polifosfatos en la biomasa. El licor mezcla con alto contenido en fósforo pasa al decantador, parte de estos fangos son eliminados del sistema (purga) y el resto son recirculados: una parte al reactor anaerobio y otra parte regresa al reactor aerobio. En el reactor anaerobio, el fósforo anteriormente almacenado intracelularmente en la biomasa es liberado. El fango con bajo contenido en fósforo se recircula al reactor aerobio y el sobrenadante rico en fósforo se trata químicamente en un tanque independiente.

Figura 1.2: Esquema de un sistema PhoStrip.

Configuración A/O



Este sistema de tratamiento permite la eliminación conjunta de materia orgánica y de fósforo. El agua residual entra en el reactor anaerobio donde se produce la toma de ácidos grasos de cadena corta y la suelta de fósforo. Seguidamente el licor mezcla pasa al reactor aerobio en el que tiene lugar el almacenamiento intracelular de fósforo en forma de polifosfatos. Parte de estos fangos son eliminados mediante la purga y el resto son recirculados al reactor anaerobio.

Figura 1.3: Esquema de un sistema A/O.

Fuhs *y col.* (1975) plantearon la teoría de que algunas bacterias acumuladoras de polifosfatos (Polyphosphate Accumulating Organisms, PAOs), podían tomar AGV en ausencia de oxígeno y nitratos. Mediante la técnica de cultivo puro aislaron la especie *Acinetobacter* como un cultivo de PAOs.

Nicholls *y col.* (1979), dieron a conocer por primera vez los polímeros intracelulares polihidroxialcanoatos (PHA), glucógeno (GLU) y los polifosfato (poli-P) como productos de reserva en los procesos de EBPR. Sugirieron que las PAOs en con-

diciones anaerobias obtenían la energía necesaria de la fragmentación del poli-P intracelular para la toma de AGV, liberando fósforo al medio; y que al tomar los AGV de la fase líquida, los almacenan intracelularmente como PHA. Además, en condiciones aerobias, el PHA era oxidado y transformado en glucógeno aportando energía y carbono para el crecimiento celular; al mismo tiempo el fósforo era capturado del medio en cantidades mayores a las liberadas en la fase anaerobia, y los almacenaban intracelularmente como poli-P lo que producía una eliminación neta de fósforo en el agua residual (Figura 1.4).

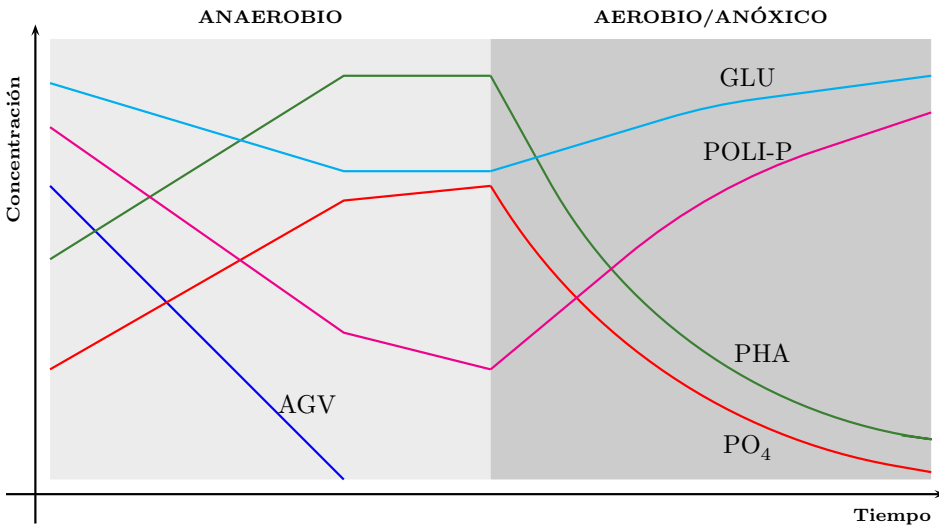
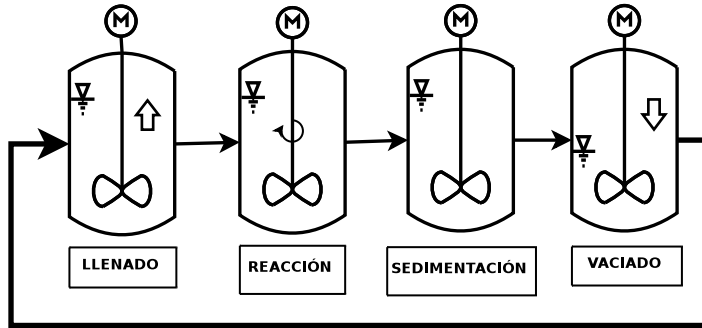


Figura 1.4: Diagrama esquemático de la evolución de AGV, PHA, poli-P, GLU y fosfato en el proceso EBPR operando en discontinuo.

Manning *y col.* (1985) observaron que el fenómeno de eliminación biológica de fósforo podía ser fácilmente implantado en un reactor secuencial discontinuo (Sequencing Batch Reactor, SBR) operado en condiciones anaerobias-aerobias (Figura 1.5).

Arvin *y col.* (1985) asociaron, en el proceso de EBPR, la suelta de fósforo a la suelta de potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}) y la captación de sustrato orgánico con captación de calcio (Ca^{2+}) tal vez involucrado en el proceso biológico o en precipitaciones en el proceso. Comeau *y col.* (1987) observaron que el Mg^{2+} y el K^+ eran transportados junto con el fosfato; sugirieron que junto con el Ca^+ estabilizarían las cadenas de poli-P en el interior de la célula. Rickard *y col.* (1992) confirmaron que los iones Mg^{2+} y K^+ estaban asociados a la suelta de fósforo en condiciones anaerobias, además plantearon que eran necesarios en los procesos de EBPR para mantener la electroneutralidad del poli-P en el interior de las PAOs.

Configuración SBR



Esta configuración puede emplearse para conseguir un proceso combinado de oxidación de carbono, reducción de nitrógeno y eliminación de fósforo. Se caracteriza por su fácil control y flexibilidad, permitiendo realizar rápidas modificaciones de las condiciones del proceso. Usualmente suele constar de cuatro etapas que se llevan a cabo de manera secuencial: llenado, reacción, sedimentación y vaciado.

Figura 1.5: Esquema de un sistema SBR.

Por otra parte, Gerber *y col.* (1986) mediante una serie de experimentos demostraron que solo los ácidos acético y propiónico podrían ser tomados directamente por las PAOs, siendo necesaria la transformación de cualquier otro sustrato a estos dos ácidos para su absorción por las PAOs.

Posteriormente, fueron desarrollados modelos para el control de los procesos EBPR. A partir del modelo matemático de fangos activados ASM2d (Henze *y col.*, 1999) y dos modelos metabólicos (Comeau *y col.*, 1986; Wentzel *y col.*, 1986; Mino *y col.*, 1987) se desarrollaron muchos estudios para el mejor control y entendimiento del proceso de eliminación biológica de fósforo.

Por otro lado, Fukase *y col.* (1985), mencionaron la existencia de organismos que podían competir con las PAOs, tomando AGV anaeróticamente, pero sin almacenar poli-P aeróticamente. Más tarde, Cech *y col.* (1990) observaron en sistemas alimentados con glucosa y/o acetato y sin eliminación de fosfatos, gran abundancia de bacterias en forma de cocos, que se agrupaban formando tétradas. Sugirieron que el deterioro de los procesos de EBPR podía ocurrir por el cambio de población microbiana. Inicialmente, estos organismos fueron llamados “G bacteria” (Cech *y col.*, 1993).

El término organismo acumulador de glucógeno (Glycogen Accumulating Organism, GAO) lo definieron Mino *y col.* (1995) y describieron su fenotipo como bacterias que eran capaces de proliferar en ambientes anaerobios-aerobios. En condiciones anaerobias las GAOs tomaban AGV y los almacenaban intracelular-

mente como polímeros de carbono (PHA), empleando el glucógeno como fuente de energía primaria. En condiciones aerobias oxidaban el PHA, la biomasa crecía y el glucógeno eran sintetizado. Sin embargo, no eran capaces de soltar ni tomar fosfatos, por lo que no contribuían a la eliminación del fósforo. Por ello, las GAOs competirían por el consumo de los AGV con las PAOs sin contribuir a la eliminación de fósforo y su desarrollo con llevaría un deterioro paulatino del proceso EBPR, por lo que se definieron como microorganismos indeseables en el sistema.

1.3.2 Condiciones operacionales que favorecen el proceso de eliminación biológica de fósforo

A partir del descubrimiento de los microorganismos responsables de la eliminación de fósforo en los fangos activados y de la confirmación de otros microorganismos que pueden afectar al sistema, aparecieron los cultivos enriquecidos en PAOs y/o GAOs. Los cultivos enriquecidos o “puros” permitieron: esclarecer algunas de las condiciones operacionales que favorecen la estabilidad del proceso EBR; conocer algunos factores que influyen en el desarrollo de las PAOs en competencia con las GAOs; proponer los fundamentos del proceso EBPR; como conocer el metabolismo de las PAOs y GAOs para la inclusión en los modelos. Cabe mencionar, que para la identificación del tipo de cultivo PAO, los estudios se basaban en las observaciones morfológicas de los microorganismos y/o en la observación del típico comportamiento encontrado en los procesos EBPR (Figura 1.4), o simplemente por la relación $P_{\text{liberado}}/HAc_{\text{tomado}}$. Típicamente, el cultivo GAO carecería de la suelta y toma de fósforo.

Uno de los principales factores que se observó puede afectar al proceso EBPR es la relación carbono orgánico por fósforo en el influente (DQO/P). Mino *y col.* (1987) estudiaron esta relación en el agua residual influente. Encontraron que un valor alto de DQO/P (mayor de 50 mgDQO/mgP) en el influente tendía a favorecer el crecimiento de las GAOs sobre las PAOs; y que valores bajos (entre el rango 10 – 20 mgDQO/mgP) favorecía para el crecimiento de las PAOs.

El proceso de EBPR se da obligadamente en dos fases. En las EDAR se observó que la suelta de fósforo en una primera etapa era necesaria, para que en la segunda fase se realizara la toma de fósforo en una mayor cantidad que en la primera fase. En varios estudios se concluyó que las PAOs no consumen los fosfatos en presencia de nitratos (NO_3) (Wentzel *y col.*, 1989a; Smolders *y col.*, 1994b). La concentración de nitratos debe mantenerse por debajo de 8 mgN- NO_3 /l, con concentraciones por encima de ese valor, las bacterias desnitrificantes competirían por los AGV y se reduciría la actividad del proceso de eliminación de fósforo. Por lo que se concluyó que la primera fase debe ser estrictamente anaerobia (Meinhold *y col.*, 1999).

La capacidad que presentaron tener las PAOs de consumir y almacenar los AGV en condiciones anaerobias se observó les permite estar en ventaja frente a otras

bacterias heterótrofas. Diversos estudios emplearon distintas fuentes de carbono, siendo el ácido acético (HAc) la fuente de carbono más ampliamente estudiada. En menor proporción fue empleado el propionato, valerato, isovalerato, glucosa, butirato, lactato, succinato y piruvato (Smolders *y col.*, 1994a; Mino *y col.*, 1998). Sin embargo, en la mayoría de los estudios se observó que el empleo del HAc como fuente de carbono favorece el proceso de EBPR (Filipe *y col.*, 2001a).

Como ya se comentó anteriormente, además de las condiciones anaerobias es necesario el establecimiento posterior de condiciones aerobias ó anóxicas. En condiciones aerobias se observó que las PAOs tienen la capacidad de tomar los AGV, sin embargo, no realizaban el principal objetivo que es la toma de fósforo (Wentzel *y col.*, 1989a; Smolders *y col.*, 1994b; Pijuan *y col.*, 2005).

En los estudios realizados por Smolders *y col.* (1994a) concluyeron que cuando el valor del pH es elevado, las PAOs requirieron más energía en forma de ATP para la toma de los AGV. Filipe *y col.* (2001a) encontraron que para un pH de 7.25 la velocidad específica de toma de acetato para las PAOs como para las GAOs era la misma. Sin embargo, para valores de pH más elevados, la velocidad de toma de acetato de las PAOs era superior a la de las GAOs. En ese mismo estudio, observaron que la energía requerida para el consumo de acético por las GAOs aumentó con el pH. Situación que puso en desventaja a las GAOs sobre las PAOs.

Filipe *y col.* (2001a) expusieron que en condiciones aerobias, valores de pH inferiores a 6.5 podrían inhibir el consumo de PHA, y por lo tanto, el crecimiento de la biomasa PAO. Griffiths *y col.* (2002) sugirieron que una concentración de oxígeno disuelto (OD) mayor de 4.5 mgO₂/l podía favorecer el crecimiento de las GAOs. Además, explican que una vez que la población de GAOs se desarrolló, una concentración de OD menor de 2.5 mgO₂/l también podría favorecerlas. Una concentración aproximada de entre 2.5 y 3.0 mgO₂/l era favorable para el crecimiento de PAOs.

Whang *y col.* (2002) estudiaron el efecto del tiempo de retención celular (TRC) de los procesos de EBPR y concluyeron que TRC altos (alrededor de 10 – 12 d) y una temperatura mayor de 30 °C son condiciones de operación que favorecerían a las GAOs. En el caso de las PAOs observaron que son favorecidas a bajos TRC y temperaturas bajas inferiores a 20 °C.

Pattarkine *y col.* (1999) y Brdjanovic *y col.* (1998a) confirmaron que los cationes como el Mg²⁺ y el K⁺ eran requeridos como nutrientes en cantidades específicas. Los cationes estaban presentes en la toma y liberación de fósforo y eran irremplazables por otros cationes. Los autores observaron que la carencia de Mg²⁺ y K⁺ podía inhibir el proceso de eliminación biológica del fósforo. Barat *y col.* (2008) estudiaron los efectos que tenía el calcio sobre los sistemas EBPR, observaron que concentraciones elevadas de calcio podría tener un efecto negativo sobre el efecto de EBPR. La posible precipitación del fósforo con el calcio reduciría el fósforo

disponible para la producción de poli-P, el cual se sugirió podría ser la principal fuente de energía de las PAOs.

1.3.3 Modelos matemáticos del proceso de eliminación biológica de fósforo

Las transformaciones y procesos bioquímicos que ocurren en el proceso de EBPR son descritos básicamente en dos tipos de modelos matemáticos: los modelos tipo ASM (Activated Sludge Model, ASM) y los modelos metabólicos. Ambos tipos de modelos consisten en conjuntos de expresiones estequiométricas y cinéticas describiendo las transformaciones bioquímicas del proceso. Sin embargo, los modelos tipo ASM se generan a partir de la observación general del proceso, mientras que los modelos metabólicos se generan a partir de la observación de las rutas metabólicas de un microorganismo. Otra diferencia clave entre los modelos, es que los coeficientes de rendimiento de los modelos metabólicos son obtenidos teóricamente a partir del sustrato y los balances de energía y poder reductor, lo que minimiza la necesidad de la calibración de parámetros (Oehmen *y col.*, 2007a).

1.3.3.1 Modelos tipo ASM

Los modelos matemáticos pueden definirse como la representación matemática de un fenómeno de la vida real o un proceso. Estos fenómenos o procesos en el tratamiento de aguas residuales, son representados por reacciones químicas y biológicas con un gran número de componentes solubles y particulados. Los modelos deben cuantificar tanto la cinética (velocidad de reacción de los procesos) como la estequiometría (relación entre componentes dentro de un mismo proceso) de cada proceso. Las reacciones deben ser representativas de los procesos fundamentales más importantes que ocurren dentro del sistema. El término “proceso” se usa para representar un evento distinto que actúa sobre uno o más componentes del sistema. Los coeficientes de rendimiento de los modelos matemáticos son determinados experimentalmente.

Los modelos tipo ASM incorporan procesos como oxidación de carbono, nitrificación y desnitrificación. En 1982, la Asociación Internacional para la Investigación de Contaminación del Agua y Control (IAWPRC), ahora Asociación Internacional de Agua (IWA), formó un grupo de investigadores para trabajar en la modelización matemática, diseño y operación de procesos de fangos activados. El grupo designó que para la descripción de los modelos se generaría una matriz, en la cual se recogiera toda la información estequiométrica y cinética de los diferentes procesos que forman el modelo. El primer paso para crear una matriz es la identificación y anotación de los componentes de relevancia del modelo. La notación y nomenclatura adoptada por la IWA para los modelos de fangos activados, se definieron como: componentes insolubles (X), componentes solubles (S); para especificar los

compuestos individuales se emplean en forma de subíndices: biomasa (B), sustrato (S) y oxígeno (O). El segundo paso para la elaboración de una la matriz es identificar los procesos biológicos que ocurren en el sistema. Las expresiones cinéticas se registran a la derecha en la última columna de la matriz en la fila correspondiente a cada proceso. En la tabla 1.2 se muestra un ejemplo sencillo de una matriz para representar un modelo matemático.

Tabla 1.2: Ejemplo de una matriz para un modelo matemático.

Proceso	Componentes			Cinética
	S_A	S_{PO_4}	X_{PP}	
Almacenamiento anaerobio de PHA por las PAOs	-1	Y_{PO_4}	$-Y_{PO_4}$	$q_{PHA} \times \frac{S_A}{S_A + K_{S,A}} \times \frac{S_{ALK}}{S_{ALK} + K_{ALK}} \times \frac{X_{PP}/X_{PAO}}{X_{PP}/X_{PAO} + K_{PP}} \times X_{PAO}$

El modelo tipo ASM1 fue desarrollado para predecir los procesos de oxidación de carbono y nitrificación-desnitrificación en los fangos activados, resultando ser una herramienta excelente, sobretodo en cuanto supuso un punto de inflexión hacia la unificación en la estructura de los modelos a desarrollar desde aquel momento (Henze *y col.*, 1987). Este modelo supuso un punto de partida para futuras ampliaciones y desarrollos y fue ampliamente aceptado por la comunidad científica.

Sin embargo, cuando se publicó el ASM1, limitadamente la eliminación biológica de fósforo empezaba a usarse en algunas plantas de tratamiento a gran escala. Hasta el año de 1990 fue cuando el proceso de eliminación biológica de fósforo se hizo popular y al mismo tiempo los fenómenos básicos del proceso eran comprendidos. Entonces en 1995, en el modelo de fangos activados No. 2 (ASM2) fueron incorporados los procesos de eliminación de fósforo mediante fangos activados (Gujer *y col.*, 1995). En el modelo ASM2 se incluyeron más componentes que en el ASM1, sobre todo incluyeron el parámetro X_{BM} que representa la estructura interna celular. Además, fue considerada la materia orgánica particulada (DQO) y una fracción de fósforo como poli-P que es de primordial importancia para el funcionamiento del sistema de fangos activados con eliminación biológica de fósforo. Además, en adición a los procesos biológicos, se incluyeron dos procesos químicos para modelar la precipitación química de fósforo.

Para la eliminación biológica de fósforo, en el ASM2 se asumió que las PAOs crecen en condiciones aerobias. Más tarde, otros estudios señalaron que las PAOs tienen la capacidad de desnitrificar, por lo que se modificó el modelo ASM2 incluyendo el fenómeno de desnitrificación por las PAOs, ésta modificación fue nombrada ASM2d (Henze *y col.*, 1999; Mino *y col.*, 1995). En éste modelo se incluyó la eliminación de fósforo y nitrógeno mediante las PAOs. En general, el modelo se considera detallista ya que incluye observaciones como la competencia por el sustrato cuando hay presencia de nitratos en la fase anaerobia, y simple porque permite la predicción de la eliminación biológica de fósforo, pero sin incluir todos los fenómenos del proceso EBPR observados hasta ese momento (Wentzel *y col.*, 1989b).

Posteriormente el grupo de investigación del IWA desarrolló el modelo ASM3 con base a los ASM anteriores, describiendo los procesos de menor interés para las EDAR; pero de interés para la investigación. Dándole un objetivo diferente a la modelación, no solo en la práctica de la ingeniería sino también en la investigación científica (Gujer *y col.*, 1999).

Sin embargo, en los modelos ASM la existencia de GAOs no fue considerada, por lo que, otras investigaciones han surgido en torno a predecir los cambios en los procesos EBPR provocados por la presencia de las GAOs. Algunas modificaciones al modelo ASM2 que se han realizado son: Manga *y col.* (2001) incorporan el crecimiento y actividad de las GAOs; Serralta *y col.* (2004) incluyeron la evolución del valor de pH; Pijuan *y col.* (2004) incluyeron al propionato como otra fuente de carbono, entre otras.

1.3.3.2 Modelos metabólicos

Los modelos metabólicos se basan en el conocimiento de las reacciones estequiometría de las rutas metabólicas involucradas en los procesos estudiados. Los coeficientes de rendimiento son obtenidos teóricamente a través de los balances de sustrato, energía y el poder reductor, minimizando así la necesidad de calibración de parámetros (Oehmen *y col.*, 2007a). Esta manera de obtener los coeficientes de rendimiento es una diferencia clave entre los modelos tipo ASM y metabólicos.

Comeau *y col.* (1985), Wentzel *y col.* (1986) y Mino *y col.* (1987) fueron los primeros en proponer las rutas metabólicas que describirían el proceso de eliminación biológica de fósforo por las PAOs. Estos autores proponen diferentes rutas metabólicas para la generación del poder reductor en condiciones anaerobias.

El modelo propuesto por Comeau *y col.* (1985) fue modificado y extendido posteriormente por Wentzel *y col.* (1986) (Figura 1.6). Estos autores sugirieron que el poder reductor (dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH)) para la síntesis del polímero de carbono PHA podría provenir del ciclo del ácido tricarbóxico (Tricarboxilic Acid, TCA) (Figura 1.7). Los mismos autores, explicaron con detalle las rutas metabólicas que pudieran ocurrir en las bacterias *Acinetobacter*. En condiciones anaerobias, el acetato podría ser transportado a través de la membrana celular por difusión pasiva. Una vez dentro de la bacteria, éste podría ser activado a Acetil-CoenzimaA (Acetil-CoA), empleando la hidrólisis de ATP a adenosín difosfato (ADP). El ATP se utilizaría para restaurar la fuerza protón-motriz que se pierde al transportar los protones asociados al ácido acético no disociado. La bacteria podría reaccionar a la disminución de la relación ATP/ADP potenciando la síntesis de ATP a partir del poli-P almacenado intracelularmente. Una porción del Acetil-CoA se metabolizaría a través del ciclo del TCA, para generar el poder reductor en forma de NADH requerido para la reducción de Acetil-CoA a PHA. El resto de Acetil-CoA se convertiría en PHA, de forma que aproximadamente un

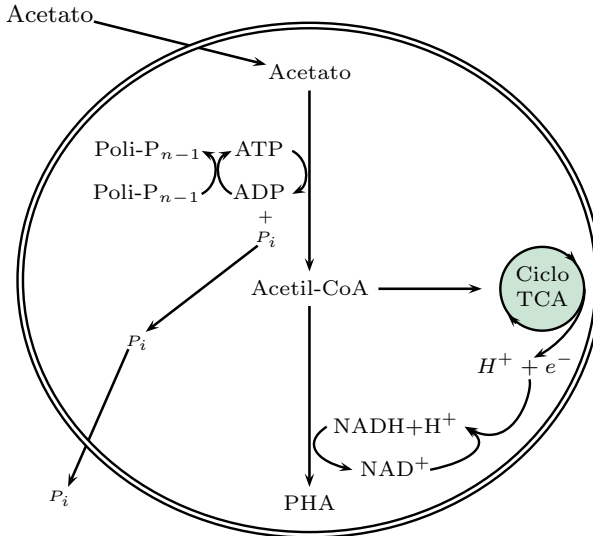
90% del carbono procedente del acetato fuese conservado en forma de PHA. En condiciones aerobias, las PAOs podrían llevar a cabo el metabolismo aerobio para crecer utilizando el PHA almacenado como fuente de carbono y de energía, generando ATP a través de la cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria) del TCA. Además, se sintetizaría poli-P intracelular con el aumento de la relación ATP/ADP, eliminando del medio los fosfatos y sus cationes asociados (Mg^{2+} y K^+).

Mino *y col.* (1987) desarrollaron un modelo metabólico en el cual el poder reductor para la síntesis de PHA podría ser generado por el proceso de glucólisis. En general, este modelo es muy similar al propuesto por Wentzel *y col.* (1987), pero existió una diferencia importante en cuanto a la función del glucógeno como biopolímero de reserva. En el modelo desarrollado por Mino *y col.* expusieron que en condiciones anaerobias, el poder reductor requerido para la síntesis de PHA a partir del Acetil-CoA podría provenir de la degradación del glucógeno, ver la figura 1.8 (a).

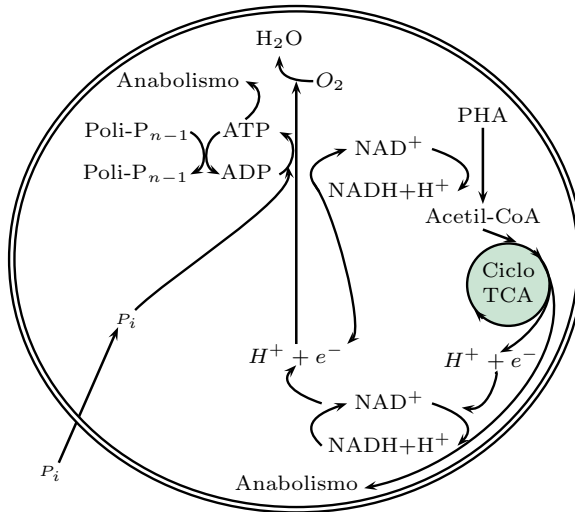
La explicación del supuesto por Mino *y col.* esta en que la energía liberada por la ruptura enzimática del glucógeno en pequeñas cadenas de monómeros de glucosa (residuos) es muy eficiente. Alrededor del 90% de los residuos podrían dividirse fosforolíticamente hasta glucosa 1-fosfato que se convierte, sin gasto de energía, en glucosa 6-fosfato. Posteriormente, la glucosa 6-fosfato podría metabolizarse a piruvato mediante la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o la ruta Entner-Doudoroff (ED). La ruta EMP teóricamente podría ser la más común para el metabolismo de carbohidratos en los microorganismos, sin embargo, en algunas bacterias es remplazada por la ruta ED (Voet *y col.*, 2006).

El proceso para la obtención de energía mediante la ruta EMP requeriría de una serie de procesos enzimáticos, de donde a partir de una molécula de glucosa se obtienen dos moléculas de piruvato y dos moléculas de NADH. La formación del piruvato podría ser catalizada por la piruvato quinasa, la cual requiere de K^+ y Mg^{2+} o Mn^{2+} , cationes que se observó en otros estudios eran requeridos por las PAOs, por lo que tal vez estos microorganismos empleen la ruta EMP. En las dos rutas por una molécula de glucosa se generan dos moléculas de piruvato. La diferencia entre la ruta EMP y la ruta ED es que en la ruta EMP se generan dos moléculas de NADH, mientras que en la ruta ED se genera solo una molécula de NADH empleando diferentes enzimas.

El otro 10% restante de los residuos teóricamente se escinden hidrolíticamente (Voet *y col.*, 2006), liberando fósforo. De esta forma, se podría suministrar parte del ATP para convertir el acetato en Acetil-CoA, y parte del poder reductor obtenido se utiliza para la síntesis de polihidroxibutirato (PHB). El piruvato podría oxidarse a Acetil-CoA y dióxido de carbono, y los electrones liberados son utilizados también para la síntesis de PHB. De esta forma, todo el acetato tomado podría almacenarse como PHB.



(a) Anaerobia



(b) Aerobia

Figura 1.6: Modelo metabólico de Comeau *et al.* (1986) y Wentzel *et al.* (1986) para la transformación del acetato a través del ciclo TCA.

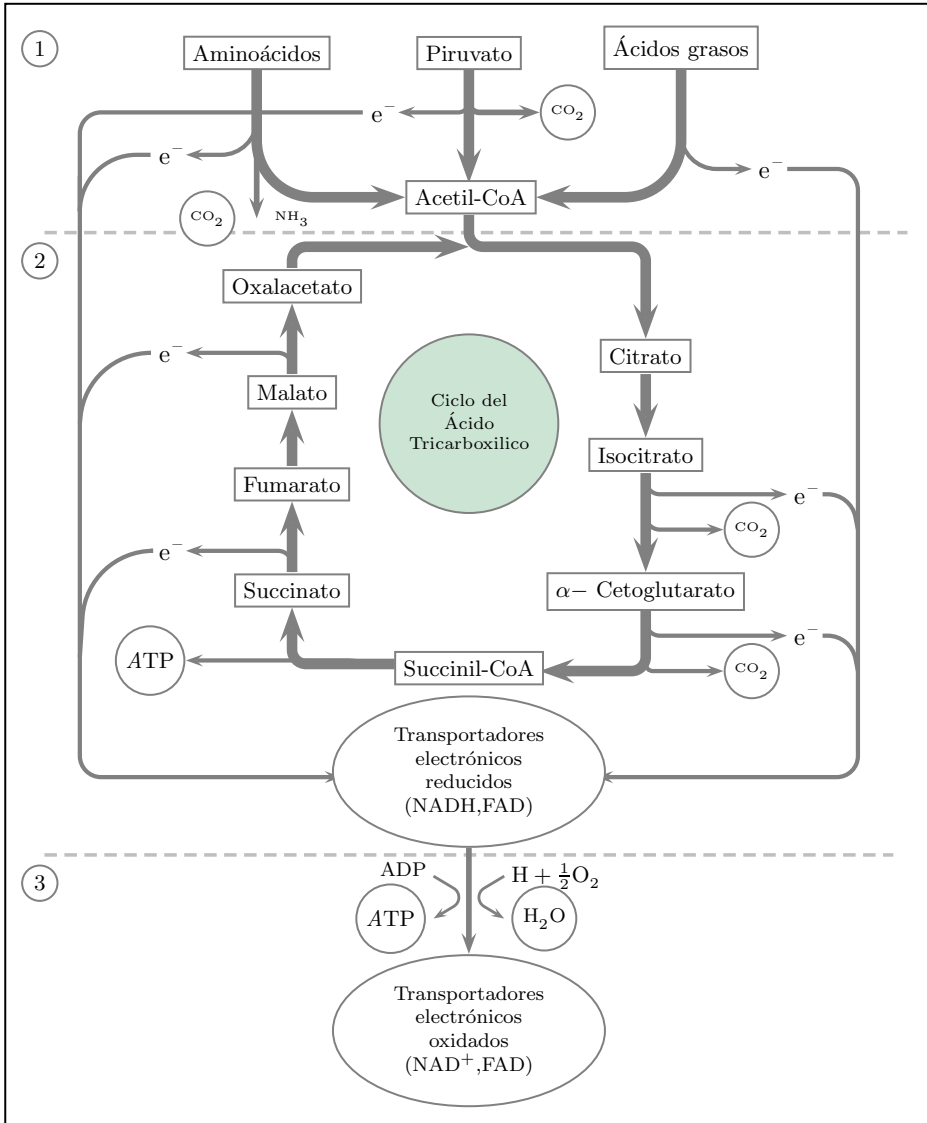
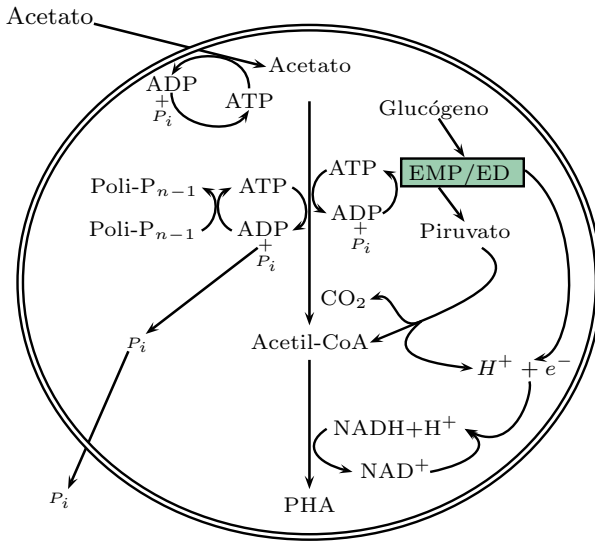
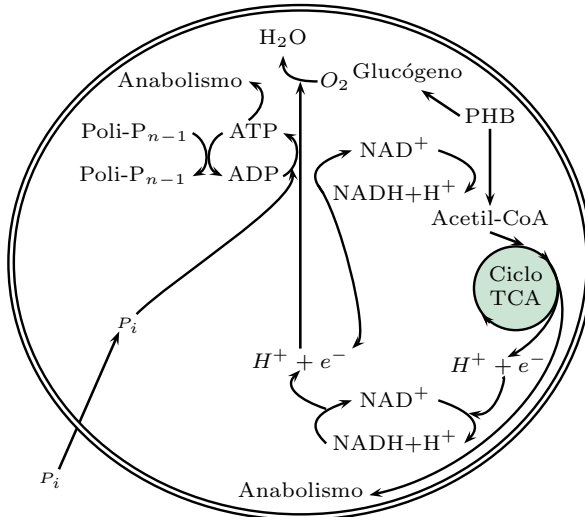


Figura 1.7: Etapas del ciclo del ácido tricarboxílico: (1) Los compuestos metabólicos se transforman Acetil-CoA (2) ciclo del TCA (3) Cadena respiratoria.

Mino *y col.* coincidieron con Wentzel *y col.* (1987) en proponer las mismas rutas para llevar a cabo la toma de fósforos en condiciones aerobias. El PHB podría ser utilizado para la síntesis de biomasa, la toma de fósforos del medio y su almacenamiento en forma de poli-P, con la diferencia de que parte del PHB podría utilizarse para la reposición del glucógeno, ver la figura 1.8 (b).



(a) Anaerobia



(b) Aerobia

Figura 1.8: Modelo metabólico Mino y col. (1987).

Estos dos modelos metabólicos fueron la línea base del desarrollo de modelos metabólicos que describen con detalle y bajo diversas condiciones de operación los procesos de EBPR. Smolders *y col.* (1994a) fueron los primeros en sugerir y desarrollar la estequiometría y la bioenergética de los procesos observados en la eliminación biológica de fósforo; basándose en el modelo de Mino *y col.* (1987) y en la descripción de las rutas metabólicas de Wentzel *y col.* (1986). En el modelo metabólico de Smolders *y col.* (1994a) se desarrolló la estequiometría anaerobia de los procesos y la influencia que tiene el pH sobre la misma. En base a las observaciones realizadas, se sugirió una correlación entre el pH del medio y la suelta de fósforo. Incluyeron en la estequiometría anaerobia el parámetro α que representa la energía necesaria (ATP) para el transporte activo del HAc a través de la membrana celular. Smolders *y col.* (1994b) definieron la estructura del modelo de la fase aerobia, siendo relevante el parámetro δ (P/O₂), que podría determinar las concentraciones de ATP producido por NADH oxidado (ATP/NADH).

Más tarde, Smolders *y col.* (1995) desarrollaron otro modelo metabólico para los procesos de eliminación de fósforo. En este modelo incluyeron todas las reacciones metabólicas relevantes que se habían observado hasta ese momento para la eliminación de fósforo. Consideraron relevantes diez componentes (acetato, fosfatos, biomasa, PHB, poli-P, glucógeno, amonio, oxígeno, dióxido de carbono y agua), tres reacciones anaerobias (toma y almacenamiento de PHB, degradación de poli-P, degradación de glucógeno) y cinco reacciones aerobias (catabolismo PHB, fosforilación oxidativa, síntesis de biomasa, transporte y síntesis de fosfatos y producción de glucógeno). Sugirieron que el metabolismo de la fase anaerobia y aerobia solo dependía de cuatro coeficientes bioquímicos fundamentales: α_1 (moles de ATP por moles necesarios para la toma de carbono del acetato), δ (P/O, representa la producción de ATP por la fosforilación oxidativa), K (ATP necesario para la formación de biomasa) y ε (energía necesaria para transportar el fósforo a través de la membrana), los cuales se determinaron experimentalmente. Los parámetros cinéticos fueron derivados de mediciones realizadas en ciclos anaerobios-aerobios de un SBR. Los conjuntos de datos que obtuvieron, fueron utilizados para encontrar, por el método de suma de mínimos cuadrados, los valores de los parámetros de la cinética propuesta (Tabla 1.3). La figura 1.9 muestra la estequiometría anaerobia y aerobia obtenida a un pH de 7.

Kuba *y col.* (1996), basándose en el modelo de Smolders *y col.* (1994a) y Smolders *y col.* (1995) desarrollaron la estequiometría y cinética de desnitrificación en los procesos de eliminación biológica de fósforo; y determinaron el valor de la relación ATP/NADH bajo condiciones anóxicas (δ_N). Empleando el parámetro obtenido δ_N modificaron la estequiometría y cinética para la desfosforilación/desnitrificación en la fase anóxica de los procesos EBPR.

Murnleitner *y col.* (1997) desarrollaron un modelo en el que integraba las fases anaerobia/aerobia/anóxica. Para integrar las fases, cambiaron la dependencia de la toma de fosfatos del oxígeno o nitratos a depender del sustrato PHA en los

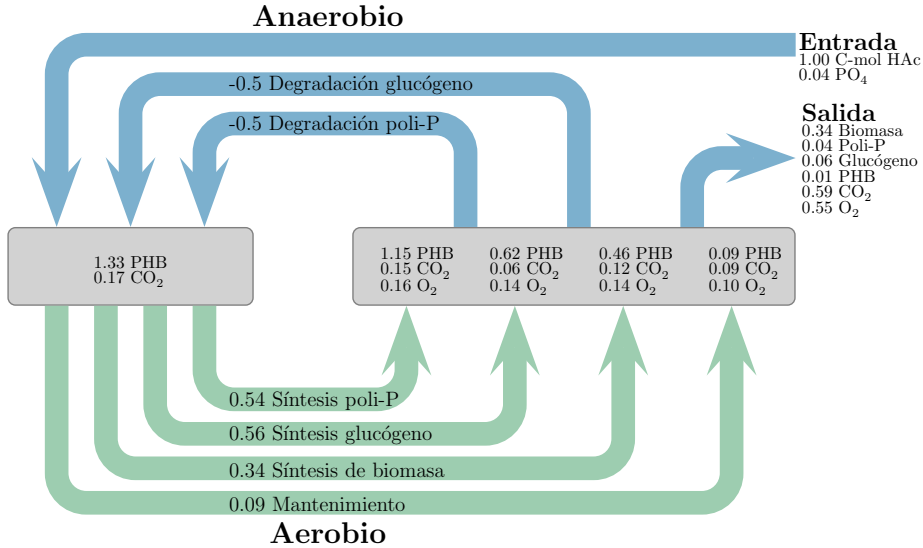


Figura 1.9: Modelo cuantitativo del metabolismo de las PAOs (Smolders *y col.*, 1994a; Smolders *y col.*, 1995).

Tabla 1.3: Cinética de la fase anaerobia y aerobia del modelo metabólico de las PAOs (Smolders *y col.*, 1994a; Smolders *y col.*, 1995).

Procesos	Cinética	Parámetro	Valor	Unidad
Anaerobia				
Toma de Acetato	$q_s^{max} \times \frac{C_s}{C_s + K_S}$	q_S^{max} K_S	0.4 1	molC/molC.h mmolC/l
Mantenimiento	m_{ana}	m_{ana}	2.5×10^{-3}	molP/molC.h
Aerobia				
Síntesis de biomasa	$k_X \times f_{phb}$	k_X	0.14	molC/molC.h
Toma de fósforo	$k_{PP} \times \left(\frac{C_P}{C_P + K_P}\right) \times \left(1 - \frac{f_{PP}}{f_{PP}^{max}}\right) \times f_{PHB}$	k_{PP} K_P f_{PP}^{max}	0.55 0.1 0.3	molP/molC.h mmolP/l molP/molC
Formación de glucógeno	$k_{GLY}(f_{GLY}^{max} - f_{GLY})$	k_{GLY} f_{GLY}^{max}	0.8 0.27	molC/molC.h molC/molC
Mantenimiento	m_{aer}	m_{aer}	4×10^{-3}	molC/molC.h

procesos de crecimiento, formación de poli-P y producción de glucógeno. Posteriormente, Filipe *y col.* (2001c) modificaron el modelo de Smolders *y col.* (1994a), incorporando que la toma de HAc dependa linealmente del pH. Sin embargo, (Filipe *y col.*, 2001c) concluyeron que la toma de HAc podría ser independiente entre el rango 6.5 a 8.0 de pH, encontrando diferentes valores para la estequiometría y cinética de la fase anaerobia.

La inclusión de las GAOs trascendió en los modelos metabólicos, debido a la complicación para obtener cultivos puros dePAOs y al deterioro del proceso EBPR por el crecimiento de las GAOs. En consecuencia, fueron desarrollados modelos

metabólicos para predecir el desarrollo de la población GAO y los efectos en los procesos EBPR con diversos factores de operación. El primer modelo metabólico para las GAOs fue el desarrollado por Filipe *y col.* (2001a). Estos autores desarrollaron la estequiometría y la cinética teniendo en cuenta el efecto del pH de la fase anaerobia. Posteriormente, Zeng *y col.* (2002b) corrigieron la estequiometría anaerobia propuesta por Filipe *y col.* (2001a), y a su vez desarrollaron la estequiometría aerobia y la cinética de la fase anaerobia y aerobia. En la figura 1.10 se muestra la estequiometría obtenida por Zeng *y col.* (2002b). Experimentalmente obtuvieron la cinética anaerobia: la velocidad máxima de toma de HAc (q_{GAO}^{max}) que obtuvieron fue $0.16 - 0.18 \text{ molC-HAc/molC-biomasa/h}$; coeficiente de mantenimiento anaerobio (m_{ATP}^A) fue determinado como $2.35 \times 10^{-3} \text{ molATP/molC-biomasa/h}$ y el coeficiente de mantenimiento aerobio (m_{ATP}^o) obtuvieron el valor de $0.014 \text{ mol ATP/molC-biomasa/h}$.

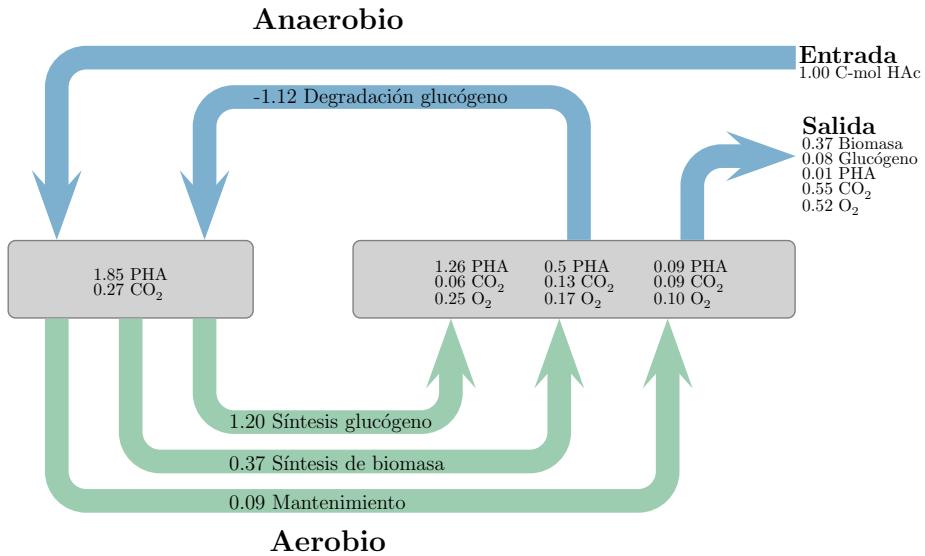


Figura 1.10: Modelo cuantitativo subjetivo del metabolismo de las GAOs (Zeng *y col.*, 2002a).

Otros modelos metabólicos fueron desarrollados, considerando otros factores de operación como: desarrollo de la estequiometría anaerobia empleando glucosa como sustrato (Whang *y col.*, 2002); modelo anaerobio de un cultivo de mezcla de PAOs y GAOs (Yagci *y col.*, 2003; Zeng *y col.*, 2003); estequiometría anaerobia para PAOs y GAOs empleando propionato como fuente de carbono (Oehmen *y col.*, 2005a; Oehmen *y col.*, 2006); desarrollo de la estequiometría aerobia para PAO empleando propionato como fuente de carbono (Oehmen *y col.*, 2007b); mezcla de acetato y propiónico para PAO y GAO (Zhang *y col.*, 2008); competición entre las PAOs y GAOs en condiciones anaerobias aerobias/anóxicas empleando diferentes

fuentes de carbono, grados temperatura y valores de pH (López-Vázquez *y col.*, 2009; Oehmen *y col.*, 2010b).

1.3.4 FISH en los procesos de eliminación biológica de fósforo

La técnica FISH utiliza sondas (secuencias de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos) que se unen produciendo una fluorescencia a la bacteria que contiene la fracción 16S del rRNA homóloga (bacteria “diana”) (Nielsen *y col.*, 2009). Por lo que, la técnica FISH, permite detectar la presencia de grupos de bacterias en una muestra, con una gran especificidad. Tan sólo será necesario que haya sido diseñada la sonda específica para la detección del organismo que se desea a estudiar.

En el tratamiento de aguas residuales, la técnica hibridación con fluoresceína *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) fue utilizada por Wagner *y col.* (1994) para estudiar la comunidad microbiana en una EDAR en la que se producía el fenómeno de la eliminación biológica de fósforo. Los resultados mostraron que la población bacteriana estaba comprendida por un 36 % de *Actinobacteria*, un 36 % de β -*proteobacteria* un 10 % de γ -*proteobacteria* y de 3 a 6 % de *Acinetobacter* del total de la comunidad bacteriana. Anterior al estudio de Wagner *y col.* (1994), se sugirió que la especie *Acinetobacter* podía ser la responsable del proceso de la eliminación biológica de fósforo, debido a que se correspondía en morfología, en la forma de agruparse y en contener poli-P intracelular, pero a pesar de ello, esta especie no estaba presente en una proporción suficiente como para ser la responsable de la eliminación de fósforo en el sistema. Esto fue corroborado en el estudio de Kampfer *y col.* (1996), en el cual, también obtuvieron que la especie *Acinetobacter* representaba menos del 5 % de la población bacteriana.

Entonces se realizaron estudios comparando la estructura de la comunidad bacteriana de fangos con y sin eliminación de fosfatos. En Bond *y col.* (1999), observaron que el subgrupo β -*proteobacteria-2* representaba el 55 % de todas las bacterias en un reactor de laboratorio con gran eficacia en EBPR. A partir de ese momento, comenzaron a emplear reactores de laboratorio llevando a cabo el proceso EBPR con gran eficacia. Hesselmann *y col.* (1999) fueron los primeros en indicar la posición filogenética definitiva del subgrupo β -*proteobacteria-2*, como muy cercano al género *Rhodocyclus*, y llamaron a dicho organismo “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*”. Crocetti *y col.* (2000) confirmaron este hallazgo, y demostraron que las bacterias *Accumulibacter* eran capaces de mantener el poli-P en tránsito, tal y como describen los procesos de EBPR. Cada uno de estos estudios demostraron que la bacteria *Accumulibacter* se correspondía con el fenotipo de las PAOs. Además, se comprobó el predominio de esta especie tanto en reactores de laboratorio como en plantas industriales. Las sondas empleadas por Hesselmann *y col.* (1999) y Crocetti *y col.* (2000) se muestran en la tabla 1.4.

Zilles *y col.* (2002) realizaron algunas modificaciones a las sondas FISH para *Accumulibacter*, con el fin de abarcar dos clones adicionales obtenidos de una planta de tratamiento de aguas residuales. Algunos estudios demostraron que no todas las bacterias que hibridan con las sondas FISH para *Accumulibacter* son capaces de acumular poli-P (Wong *y col.*, 2005). Tal es el caso de las Actinobacterias, las cuales numerosos estudios las encuentran presentes en sistemas con EBPR (Bond *y col.*, 1999; Kawaharasaki *y col.*, 1999; Crocetti *y col.*, 2000). El estudio llevado a cabo por Kong *y col.* (2005) demostraron que dos morfotipos de Actinobacteria eran capaces de tomar fosfato aeróbicamente pero no anóxicamente, y solo después de haber tomado materia orgánica, como aminoácidos, en la fase anaerobia. Estos organismos no son capaces de tomar ácidos grasos volátiles, ni tampoco de almacenar PHA. Así que las Actinobacterias no se comportan según los mecanismos bioquímicos descritos tradicionalmente para las PAO. Estos organismos son particularmente abundantes en plantas de tratamiento industriales y también han sido detectadas en plantas de tratamiento domésticas. Por tanto, dado que son capaces de eliminar fósforo del medio, y a pesar de no coincidir con el fenotipo PAO, estas bacterias deberían tenerse en cuenta, y no ser descartadas como “potenciales PAO” (Oehmen *y col.*, 2007a). Las sondas que hibridan para Actinobacterias se incluyen en la tabla 1.4. Por otra parte, también se han observado inclusiones de poli-P en bacterias que no hibridan con las sondas para *Accumulibacter phosphatis* (Zilles *y col.*, 2002; He *y col.*, 2005; Wong *y col.*, 2005). Lo que sugiere que la especie *Accumulibacter* no debe ser la única cuyo fenotipo coincide con el de las PAOs.

Más tarde, Carvalho *y col.* (2007) operaron dos SBR bajo condiciones anaerobias-aerobias y poco a poco fueron aclimatados a condiciones anaerobias-anóxicas, como fuente de carbono emplearon acetato y propionato, respectivamente. En ambos reactores observaron una gran abundancia de *Accumulibacter*, pero con diferentes morfotipos. En el SBR alimentado por acetato, observaron bacterias con morfotipo *coccus*, mientras que el reactor alimentado por propionato tenían una morfología predominante tipo *varilla*, con la capacidad de desnitrificar. Entonces, sugirieron la presencia de dos diferentes grupos de PAO: DPAOs y no DPAOs, los cuales poseen diferentes afinidades por el nitrato. Entonces plantearon la hipótesis de la existencia de dos diferentes cepas de *Accumulibacter*; la del morfotipo *coccus* que es incapaz de utilizar el nitrato como aceptor de electrones, pero es capaz de utilizar el oxígeno, y posiblemente el nitrito, y la del morfotipo *varilla* que puede utilizar nitrato, nitrito y oxígeno. Posteriormente, Flowers *y col.* (2009) realizaron un estudio en el que diseñaron dos sondas la Acc-I-444 y la Acc-II-444 (la descripción de las estas sondas son mostradas en la tabla 1.4), con capacidad para diferenciar entre dos clases de *Accumulibacter*, llamándolas: PAO Tipo I y PAO Tipo II. Concluyeron que las PAO Tipo I fueron capaces de eliminar fósforo a la vez de reducir el nitrato, mientras que las PAO Tipo II no fueron capaces.

Actualmente, las sondas PAO462, PAO651 y PAO846 mostradas en la tabla 1.4 son utilizadas conjuntamente con la finalidad de cubrir al grupo de bacterias *Accumulibacter*. A esta mezcla de sondas se le conoce como PAOMix. Las sondas modificadas por Zilles *y col.* (2002) al ser empleadas parecen no mejorar sustancialmente la sensibilidad obtenida con la mezcla de sondas PAOMix (Borrás, 2008).

Tabla 1.4: Sondas FISH publicadas para hibridar sobre el 16S rRNA de los organismos relevantes más comunes responsables del proceso EBPR.

Sonda	Secuencia (5' → 3')	Especificidad	Referencia
RHC175 I RHC439 II	TGCTCACAGAATATGCGG CNATTTCTTCCCCGCCGA	Mayoría de <i>Rhodocyclaceae</i> <i>Rhodocyclus/Accumulibacter</i>	Hesselmann <i>y col.</i> (1999)
PAO462 PAO651	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC CCCTCTGCCAAACTCCAG	<i>Rhodocyclus tenuis</i> subgrup <i>Candidatus Accumulibacter</i> <i>phosphatis</i> <i>Rhodocyclus tenuis</i> subgrup	Crocetti <i>y col.</i> (2000)
PAO846	GTTAGTCTACGGCACTAAAAGG	<i>Rhodocyclus tenuis</i> subgrup	
PAO462b PAO846b	CCGTCATCTRCWCAGGGTATTAAC GTTAGTCTACGGYACTAAAAGG	Mayoría de <i>Accumulibacter</i> Mayoría de <i>Accumulibacter</i>	Zilles <i>y col.</i> (2002)
Actino-221a	CGCAGGTCCATCCCAGAC	<i>Actinobacteria-PAO</i> potenciales	
Actino-658a	TCCGGTCTCCCCTACCAT	<i>Actinobacteria-PAO</i> potenciales	Kong <i>y col.</i> (2002a)
Acc-I-444	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	Clade IA y otro Tipo I clades	
Acc-II-444	CCCGTGCAATTTCTTCCCC	Clade IIA, IIC y IID como Tipo II clades	Flowers <i>y col.</i> (2009)

Así mismo, para identificar a las GAOs también presentes en los sistemas EBPR, Nielsen *y col.* (1999) diseñaron dos sondas: Gam1019 y Gam1278 pertenecientes a la clase γ -*proteobacteria* (Tabla 1.5). Utilizando dichas sondas, encontraron que el 35 % de la población microbiana de un fango procedente de un proceso de EBPR deteriorado, coincidía con este grupo de bacterias. De igual manera, Crocetti *y col.* (2002) utilizaron fango de un proceso EBPR enormemente deteriorado y diseñaron dos nuevas sondas (GAOQ431 y GAOQ989) que hibridaban sobre bacterias pertenecientes también a la clase γ -*proteobacteria*. Se identificó claramente el fenotipo acumulador de glucógeno en este grupo de bacterias, y las llamaron “*Candidatus Competibacter phosphatis*” las sondas son mostradas en la tabla 1.5 (Crocetti *y col.*, 2002).

Tras un minucioso estudio con 32 secuencias distintas, Kong *y col.* (2002a) identificaron un nuevo grupo de GAOs compuesto por siete subgrupos dentro de la clase γ -*proteobacteria*. Se diseñaron 10 sondas para hibridar específicamente sobre este nuevo grupo de bacterias a diferentes niveles jerárquicos: GB, la sonda para el nivel más general, fue dividida en GB_G1 (idéntica a GAOQ989), GB_G2 y GB_1 a GB_7 (Tabla 1.5). Las bacterias que son hibridadas con estas sondas mostraron morfologías de cocos y bacilos, y representaban entre el 10 y 50 % de las bacterias en sistemas con EBPR, y entre el 1 y el 10 % en sistemas de depuración convencionales.

Otros dos subgrupos de la clase α -*proteobacteria* y próximos a *Deftuviicoccus vanus*, han sido relacionados con el fenotipo GAO y la morfología de tétradas. El primero de los subgrupos comprende las bacterias que hibridan con las sondas TFO_DF218 y TFO_DF618 (Wong *y col.*, 2004). Este grupo de bacterias mostró una presencia importante en reactores de laboratorio, pero no en plantas de tratamiento reales. A este subgrupo se le conoce como “*D. vanus* Cluster 1”. El segundo subgrupo fue descrito por Meyer *y col.* (2006), y se correspondía con bacterias encontradas en reactores alimentados con propionato. Las sondas diseñadas para hibridar sobre este subgrupo fueron DF988 y DF1020. A este subgrupo se le ha llamado “*D. vanus* Cluster 2” (Tabla 1.5).

Así que la bacteria *Competibacter* (también conocida como “linaje GB”) puede ser hibridada con la sonda GB (nivel jerárquico mas alto), o bien con una mezcla de sondas GAOQ989 (GB_G1) y GB_G2 llamada GAOmix. Cualquiera de estas dos opciones hibridará sobre toda la diversidad de organismos *Competibacter* conocidos. Se ha demostrado que existe una correlación clara entre la cantidad de *Competibacter* presente en el fango, y la baja relación fosfato liberado por acético consumido, lo que sugiere que efectivamente el grupo *Competibacter* compite con las PAOs por los AGV en condiciones anaerobias (Blackall *y col.*, 2004).

Tabla 1.5: Sondas FISH publicadas para hibridar sobre el 16S rRNA de los organismos relevantes más comunes en el deterioro de los procesos EBPR.

Sonda	Secuencia (5' → 3')	Especificidad	Referencia
Gam1019 I	GGTTCCTTGCGGCACCTC	Algunas <i>Gammaproteobacteria</i>	Nielsen <i>y col.</i> (1999)
Gam1278 II	ACGAGCGGCTTTTTGGGATT	Algunas <i>Gammaproteobacteria</i>	
GAOQ431	TCCCCGCCTAAAGGGCTT	Algunas <i>Competibacter</i>	Crocetti <i>y col.</i> (2002)
GAOQ989	TTCCCCGGATGTCAAGGC	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB	CGATCCTCTAGCCCACT	<i>Competibacter</i> (Grupo GB)	Kong <i>y col.</i> (2002a)
GB_G1	TTCCCCGGATGTCAAGGC	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB_G2	TTCCCCAGATGTCAAGGC	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB_1 y G_2	GGCTGACTGACCCATCC	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB_3	CCACTCAAGTCCAGCCGT	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB_4	GGCTCCTTGCGGCACCGT	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB_5	CTAGGCGCCGAAGCGCCC	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB_7	CATCTCTGGACATTCCCC	Algunas <i>Competibacter</i>	
GB_6	GGTTCCTTGCGGCACCTC	Algunas <i>Competibacter</i>	Kong <i>y col.</i> (2002b)
TFO_DF218	GAAGCCTTTGCCCTCAG	Organismos relativos a <i>Deftuviicoccus</i> (Cluster 1)	Wong <i>y col.</i> (2004)
TFO_DF618	GCCTCACTTGTCTAACC	Organismos relativos a <i>Deftuviicoccus</i> (Cluster 1)	
DEF988	GATACGACGCCATGTCAAGGG	Organismos relativos a <i>Deftuviicoccus</i> (Cluster 2)	Meyer <i>y col.</i> (2006)
DEF1020	CCGGCCGAACCGACTCCC	Organismos relativos a <i>Deftuviicoccus</i> (Cluster 2)	

1.3.5 Bioquímica del proceso de eliminación biológica de fósforo

Una de las principales limitaciones para entender el proceso de EBPR fue poder aislar los microorganismos responsables de la eliminación de fósforo. En varios estudios realizados anteriormente, probablemente las GAOs estaban presentes y activas (como se menciona anteriormente, los cultivos se diferenciaban por la relación fósforo liberado ácidos grasos tomados), haciendo más difícil de interpretar los resultados. En la actualidad, métodos moleculares como la técnica FISH han ayudado a detectar y cuantificar las PAOs y las GAOs, facilitando la interpretación de los resultados en estudios para determinar las rutas bioquímicas que emplean los microorganismos en el proceso EBPR (Oehmen *y col.*, 2007a).

Varias investigaciones han estudiado el mecanismo de transporte de acetato dentro de las PAOs y GAOs, específicamente si el transporte de acetato es realizado de forma pasiva o activa y la fuente de energía para realizar este proceso en caso de que fuese de forma activa. En el modelo metabólico de Wentzel *y col.* (1986) sugirieron que el HAc es transferido dentro de la célula PAO por difusión pasiva. Mientras que en el modelo de Mino *y col.* (1987) se planteó que el transporte del acetato al interior de las PAO es activo, necesitando energía en forma de ATP. La energía requerida se obtendría de la ruta glucolítica ED.

Smolders *y col.* (1994a) sugirieron que las PAOs empleaban un transporte activo y que posiblemente la toma de HAc estaba influenciada por el pH. En base a sus resultados, calcularon que 0.25 mol de ATP eran requeridos para el transporte de 1 mol de HAc y sugirieron que las PAOs empleaban la ruta glucolítica EMP para la obtención de energía. Filipe *y col.* (2001c) retoman la estequiometría; en base a investigaciones posteriores (Satoh *y col.*, 1992; Smolders *y col.*, 1994a) confirmaron experimentalmente que la degradación de poli-P es influenciada por el pH en el medio, definieron la dependencia del pH en el proceso de toma de HAc como se muestra en la ecuación 1.1.

$$\alpha_1 = 0.16 \times pH_{medio} - 0.7985 \text{ (mmolATP/mmolC)} \quad (1.1)$$

Al mismo tiempo, Filipe *y col.* (2001a) concluyeron en base a experimentos con cambios en el pH en aparentes cultivos GAO que el transporte de HAc al interior de las GAOs era activo. El total de concentración de ATP necesario para transportar 1 mol de HAc era $2\alpha_{GAO}$ mol de ATP. Sugirieron el uso del glucógeno como fuente de energía (ATP) y de poder reductor (NADH) empleando la ruta EMP para la degradación del glucógeno. Definieron la dependencia de la degradación de glucógeno con el pH mediante la ecuación 1.2.

$$\alpha_{GAO} = 0.057 \times pH_{medio} - 0.34 \text{ (mmol ATP/mmolC)} \quad (1.2)$$

Por el mismo camino, Hesselmann *y col.* (2000) estudiaron en un reactor de laboratorio alimentado con acetato, las reacciones enzimáticas y la estequiometría de la fase anaerobia del proceso EBPR. Los ensayos enzimáticos mostraron que el acetato era activado por medio de la acetil-CoA sintetasa. Resultados de las mediciones con RMN- C^{13} después de la alimentación con acetato marcado con C^{13} indicaron que el glucógeno fue degradado a través de la ruta metabólica ED. Sugirieron que la energía se suministraba por la glucólisis, la hidrólisis del poli-P y probablemente también por hidrólisis del pirofosfato. La relación de $P_{\text{liberado}}/HA_{\text{tomado}}$ fue variable y dependiente, aparentemente del contenido de polifosfato y el glucógeno. Propusieron un modelo bioquímico (ver tabla 1.11) para explicar los resultados experimentales en términos de balances de carbono, redox, y de la energía de la fase anaerobia empleando el ciclo de ácido tricarboxílico incompleto (TCA) para explicar la generación de equivalentes reductores adicionales.

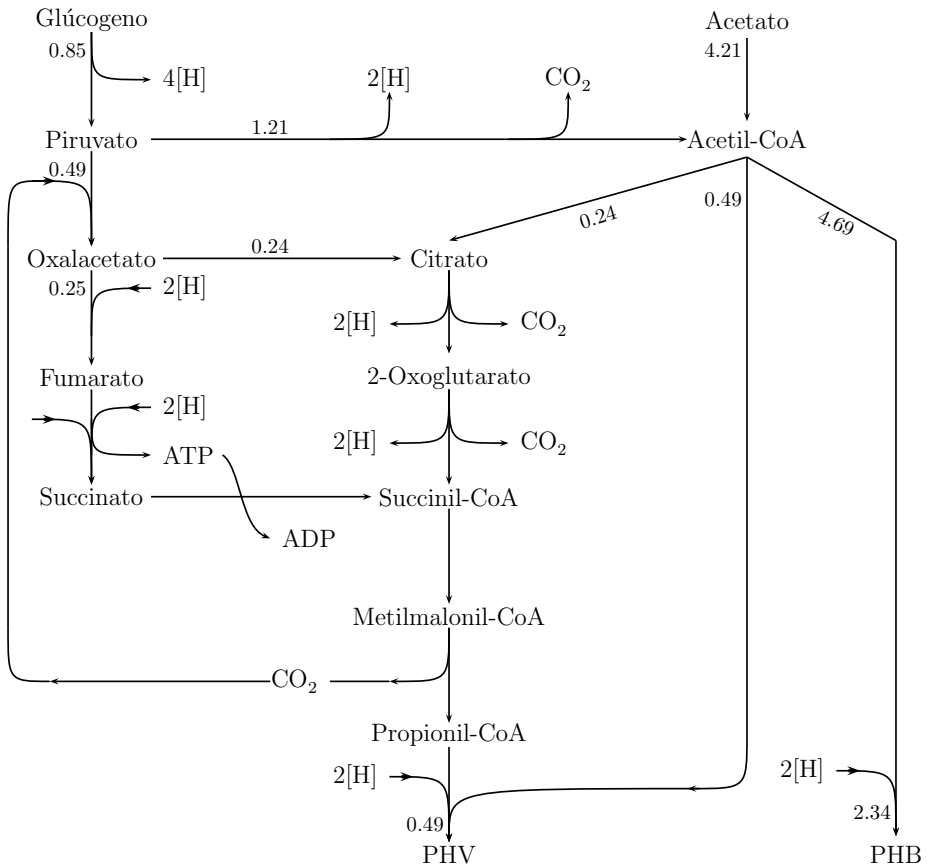


Figura 1.11: Modelo metabólico propuesto para las PAOs Hesselmann *y col.* (2000).

Reis *y col.* (2003) realizaron la observación de que las rutas metabólicas anaerobias y aerobias que emplean las PAOs y las GAOs eran muy similares. La energía requerida por el transporte de acetato sobre la membrana celular incrementó con el pH en ambos grupos de microorganismos. Expusieron que las principales diferencias entre los metabolismos anaerobios de las PAOs y las GAOs son que la hidrólisis de glucógeno las GAOs empleaban la ruta de EMP, mientras que para las PAOs usaban la ED y que la energía requerida para la conversión de carbono las GAOs la obtienen del glucógeno, mientras que las PAOs la obtienen de la hidrólisis del poli-P.

Saunders (2005) estudió con detalle el mecanismo de la toma de AGV por las PAOs y las GAOs, específicamente el paso por la membrana celular con cultivos individuales altamente enriquecido de *Accumulibacter* (95 % sobre EUBmix) y *Competibacter* (98 % sobre EUBmix). En su estudio concluyó que gran parte de la absorción de AGV por PAOs y GAOs fue impulsada por la fuerza proton-motriz (FPM). En condiciones anaerobias, la FPM se generó utilizando polímeros de almacenamiento intracelular. La FPM es la energía almacenada en el gradiente de concentración de protones. El gradiente de concentración de protones (según la teoría Quimiosmótica) sirve como almacén de energía que dirige la formación de ATP. Las PAOs emplean principalmente el flujo de salida del fósforo para generar FPM. Cuando la ATPasa fue inhibida en las PAOs, no observaron un cambio significativo en la velocidad de absorción de HAc; pero si observaron un aumento de la velocidad del proceso de glucólisis y en la fracción de polihidroxivalerato (PHV). Este comportamiento fue similar al de las GAOs, cuando consumieron glucógeno para la producción de ATP, produjeron un exceso de equivalentes reductores que debieron ser equilibrados por la producción del producto final más reducido como el propionil-CoA, el cual es precursor del PHV. Cuando inhibieron la ATPasa en las GAOs observaron una reducción drástica en la velocidad de absorción de HAc. Por lo que sugirieron que la FPM en las GAOs estaba siendo generada por la exportación de protones a través de la ATPasa. En este estudio concluyeron que efectivamente el transporte de HAc por la membrana bacteriana de las PAOs y las GAOs es activo.

En el estudio de Saunders (2005) también concluyeron que las PAOs utilizaban en condiciones anaerobias las reservas de poli-P para la generación de ATP y toma de AGV. El glucógeno como compuesto intracelular intervenía en la actividad de toma de AGV. La generación de equivalentes y ATP provenía principalmente de la glucólisis en las GAOs. Sin embargo, en las PAOs no se tenía claro si el poder reductor provenía de la glucólisis o del ciclo del TCA. Tampoco se definió si la glucólisis era realizada por la ruta de ED o EMP.

Pereira *y col.* (1996) proporcionaron evidencia experimental de la actividad de la ruta glucolítica en el proceso de EBPR en un cultivo PAO. De acuerdo con los experimentos realizados por estos autores, mediante marcadores de C^{13} , el HAc consumido y glucógeno almacenado intracelularmente proporcionaban carbono para

la formación de PHA. Por tanto, el glucógeno no sólo suministraría poder reductor sino también carbono para la síntesis del PHA. En este mismo trabajo, los autores señalaron que si se utilizará exclusivamente la ruta glucolítica como fuente de poder reductor para la formación del PHA, no se podría mantener el balance redox en el interior de la célula, por lo que propusieron un funcionamiento parcial del ciclo del TCA para suministrar una parte minoritaria (30 %) del poder reductor.

Martín *y col.* (2006), publicaron la existencia de genes para la expresión de la glucólisis y el TCA en la bacteria "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*" predominantes en el proceso de EBPR. Además sugirieron que en la fase anaerobia, el acetato y el propionato son almacenados como cuatro tipos de PHA: PHB (del acetato solamente), PHV (del acetato y el propionato), polihidroxi2metilbutirato (PH2MB) (del acetato y propionato) y polihidroxi2metilvalerato (PH2MV) (del propionato solamente) ver la figura 1.12 (a). La producción de PHA requeriría de energía (ATP) y poder reductor (NADH). El ATP era suministrado por la degradación del poli-P, y en menor grado, por la degradación del glucógeno. El NADH era proporcionado por la degradación del glucógeno y el ciclo del TCA. Un posible uso alternativo del TCA consiste en separar éste en dos ramas a través de la fumarato reductasa. En la fase aerobia cuando el oxígeno está disponible para la respiración, el acetato no está presente en el medio para otras especies y las reservas de PHA de la especie "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*" aseguran su predominio en el ecosistema microbiano del SBR. La regeneración de las reservas de poli-P utilizando ATP, agota los fosfatos del medio. La degradación del PHB a propionil CoA podría ser una ruta alternativa de degradación, en la que no fueron caracterizados el total de los genes implicados. Los transportadores de fosfato de alta afinidad (Pst) muy probablemente se encuentran inactivos durante la mayor parte de la fase aerobia, ver la figura 1.12 (b). El estudio realizado por Martín *y col.* (2006) coincide con que se utilizaban ambos mecanismos, ciclo del TCA y degradación del glucógeno, para la obtención de energía (ATP) y poder reductor (NADH). Otro hallazgo importante del estudio fue que todos los genes de la ruta EMP están presentes en la especie *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, sin aparecer los genes principales de la ruta ED. Esto indica que la especie *Accumulibacter phosphatis* sólo podría disponer de la ruta EMP para la degradación del glucógeno. Esto no implica que el resto de PAOs no sean capaces de incorporar la ruta ED para la degradación del glucógeno. Por otra parte, la ruta EMP es capaz de producir mayor cantidad de ATP que la ruta ED.

Lemos *y col.* (2007) emplearon *in vivo* resonancia magnética nuclear (nuclear magnetic resonance, NMR) con acetato en un cultivo enriquecidos en GAOs, también confirmaron la actividad de la vía glucolítica por ED. Además, en condiciones anaeróbicas se confirmó que puede operar la parte de descarboxilación del ciclo del ácido tricarbóxico. De igual manera confirmaron que las PAOs y GAOs podrían tener la capacidad de sintetizar y almacenar PHA cuando existe una fuente de carbono externa que sobrepasa las necesidades inmediatas de los micro-

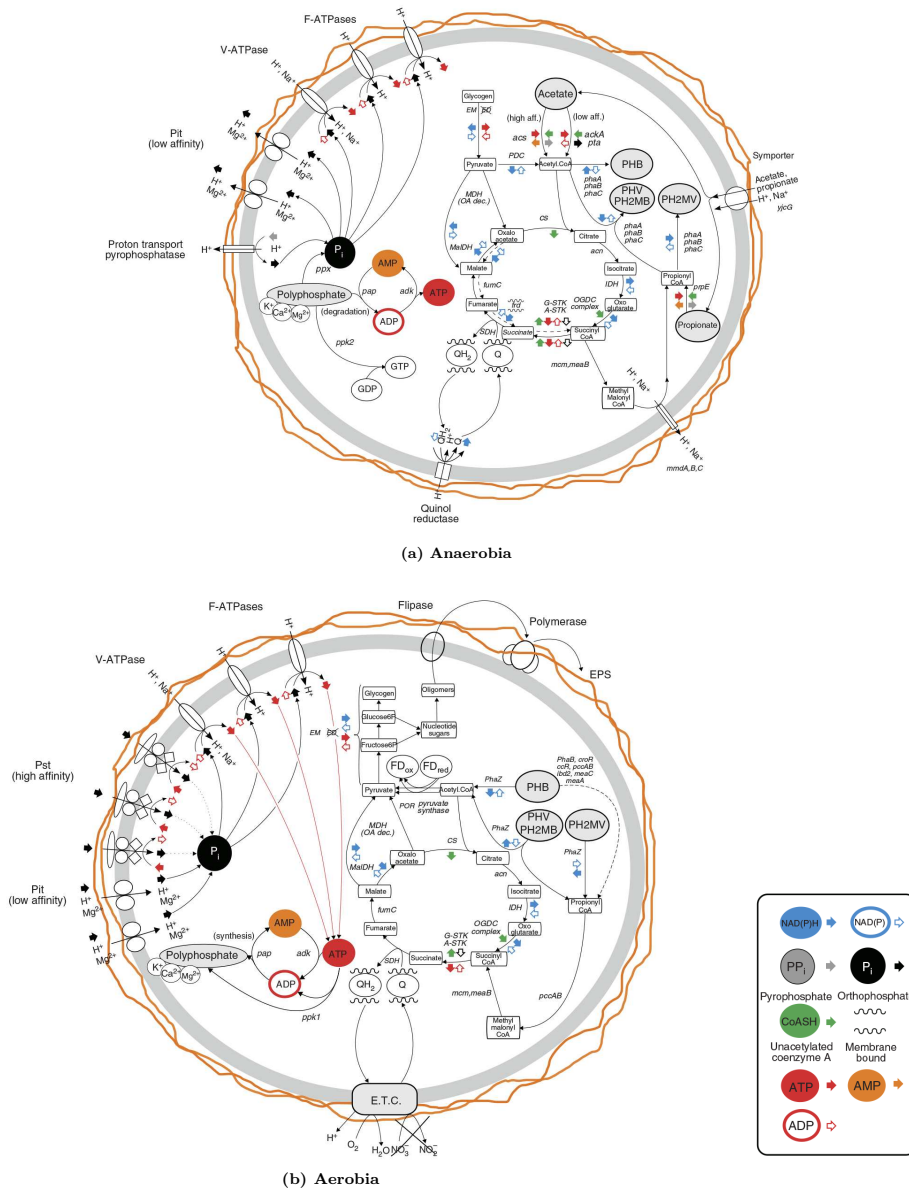


Figura 1.12: Modelo metabólico de las PAOs propuesto por Martín y col. (2006).

organismos. El PHA estaba formado por cadenas de ácidos grasos de naturaleza lipídica. La composición típica de PHA almacenado en los microorganismos PAO y GAO presentes en el proceso de EBPR es principalmente hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) con pequeñas cantidades de hidroximetilbutirato (HMB) e hidroximetilvalerato (HMV) (Liu *y col.*, 1996).

Lemos *y col.* (1998) sugirieron que la presencia y composición del PHA sintetizado podría depender del tipo de sustrato disponible. Randall *y col.* (2002) llevaron a cabo una serie de experimentos en un SBR para EBPR utilizando diferentes fuentes de AGV. Estos autores encontraron que la composición polimérica de los PHA era diferente según el AGV empleado y que esto influía significativamente en la toma de fósforo. Ellos concluyeron que la elevada eliminación de fósforo obtenida se debía principalmente al polímero mayoritariamente formado y no a la elevada cantidad de PHA almacenado. Adicionalmente, encontraron que con el HAc e isovalérico, producía una elevada eliminación de fósforo, siendo el PHB el principal constituyente del PHA, tal como también lo observó Lemos *y col.* (1998). Entonces, cuando utilizaron los ácidos propiónico y valérico, el principal polímero del PHA fue el PHV presentando una toma de fósforo mucho más baja por unidad de PHA.

Puede ser observado que las rutas metabólicas de las PAOs y GAOs son similares, según los estudios, siendo la diferencia básica entre sus metabolismos la toma y suelta de fósforo. Entonces, cuando en un sistema se presentan en condiciones anaerobias la toma de AGV, la síntesis de PHA, la degradación de glucógeno y la obtención de energía parece provenir principalmente de la degradación de poli-P observándose la suelta de fosfatos; y en condiciones aerobias se observa la toma de fosfatos que son almacenados intracelularmente en forma de poli-P, la degradación de PHA y almacenamiento de glucógeno, entonces el sistema presenta un metabolismo acumulador de polifosfatos (Polyphosphate Accumulating Metabolism, PAM). Sí en el sistema en condiciones anaerobias se observa la toma de los AGV, el almacenamiento de PHA y la utilización del glucógeno; y en condiciones aerobias se observa la degradación del PHA y el almacenamiento del glucógeno se denomina metabolismo acumulador de glucógeno (Glycogen Accumulating Metabolism, GAM).

Sin embargo, por el hecho de que los procesos de degradación y almacenamiento de glucógeno, característicos en las GAOs, también forman parte del metabolismo de las PAOs, Schuler *y col.* (2003a) sugirieron la posibilidad de que el GAM podría ser el proceso dominante de producción de energía por las PAOs en condiciones de déficit de fósforo. Eso significaría que cuando el proceso de eliminación biológica de fósforo fuera sometido a un déficit de fósforo en el agua influente, las PAOs podrían sufrir un cambio metabólico presentando un GAM sin cambiar la población de PAOs presentes en el sistema. Este hecho estaría aparentemente en contradicción con las consideraciones realizadas hasta el momento, en las cuales se señalaba que la insuficiencia de fósforo en el influente de un sistema con EBPR provocaba

un cambio de poblaciones, siendo desplazadas las PAOs por las GAOs (Liu *y col.*, 1997). Sin embargo, Schuler *y col.* (2003a) no presentaron pruebas que confirmaran su hipótesis de que las PAOs presentaran un metabolismo GAM. En los estudios realizados por Barat *y col.* (2008) sobre los efectos que tenía el ion calcio en los sistemas EBPR; observaron que debido a las precipitaciones el fósforo era limitado y por lo tanto se limita la formación de poli-P. Mediante la técnica de FISH observaron que la población de PAOs se mantenía alta, pero se el sistema presentaba un comportamiento metabólico GAM. Por otro lado, Zhou *y col.* (2008) también observaron un cambio metabólico en un cultivo enriquecido en PAOs cuando dramáticamente en un experimento eliminaron del sistema el fósforo. Sin embargo, existen aún muchas preguntas sin respuesta en relación al metabolismo de las PAOs cuando estas carecen de reservas energéticas en forma de poli-P y a su efecto sobre la dinámica de las poblaciones de PAOs y GAOs en un sistema de fangos activados.

1.4 Cambios en el ciclo biogeoquímico del fósforo

El fósforo es esencial para la vida (plantas, humanos, animales, bacterias, etc.). El fósforo es un constituyente importante en las cadenas de RNA y DNA, contribuyendo en un 9% de la masa de los ácidos nucleicos. El papel central del fósforo en la biología es de vital importancia y no hay otro elemento que lo pueda sustituir en sus funciones (Elser, 2012).

La Tierra constituye un sistema cerrado en materia por lo que nos encontramos con los ciclos biogeoquímicos. La corteza terrestre es la reserva fundamental del ciclo biogeoquímico del fósforo. El fósforo queda disponible por meteorización de las rocas o a partir de las cenizas volcánicas y es arrastrado por el viento y la lluvia para ser absorbido por las plantas, o es llevado hacia los cuerpos de agua para sedimentarse y formar rocas. Para que el fósforo sea liberado de las rocas sedimentadas en el fondo de los cuerpos de agua, como el mar, pueden pasar millones de años. El fósforo que no es sedimentado, más el fósforo que llega a disolverse de los sedimentos (principalmente en la forma de fosfatos), generan un flujo desde los sistemas acuáticos hacia el suelo. En el medio acuático el fósforo es consumido por la fauna y flora, en el suelo es absorbido por las plantas, y posteriormente por los animales. El fósforo al ser absorbido por los seres vivos, es incorporado a las moléculas orgánicas. Los excrementos y restos de animales y plantas son descompuestos por microorganismos mineralizándolos a fósforo inorgánico, regresando nuevamente a la tierra o al agua. En la actualidad, este ciclo biogeoquímico del fósforo es inusual, debido a que los efectos antropológicos han transformado el ciclo de fósforo.

En la actualidad nos encontramos con una población de 7300 millones de personas con un crecimiento estimado hasta alcanzar los 9000 millones de personas para el

año 2050 (Figura 1.13). Este crecimiento poblacional ha cambiado la producción agrícola, y por lo tanto, el sistema de agricultura. La agricultura convencional se basaba en la concentración natural de fósforo en el suelo. Residuos de alimentos, cultivos, animales así como restos humanos eran reciclados localmente como fertilizante. Con la revolución industrial hubo una enorme migración de la población, de las zonas rurales a las ciudades, lo que resultó en una concentración masiva de personas en un área donde el reciclaje de nutrientes ya no era posible. Con el crecimiento de la población, los cultivos agrícolas tuvieron que aumentar su productividad. Al elevar la producción de cultivos, los suelos se erosionaron y los malos manejos de los suelos como la falta de recuperación de fósforo por medio de los desechos llevó gradualmente a un empobrecimiento de nutrientes principalmente el fósforo. Después, la agricultura moderna se basó en la hipótesis de que los cultivos tendrían un crecimiento rápido con alta productividad, adicionando grandes cantidades de fósforo provenientes principalmente de fertilizantes (Elser, 2012). Para la producción de fertilizantes, el fósforo se ha extraído principalmente del guano y más tarde de la roca fosfática (Ashley *y col.*, 2011). Sustituyendo en gran medida a las fuentes de fósforo orgánicos, como el estiércol, residuos de cultivos y residuos orgánicos de los hogares, que poco se reciclan o están perdidos en el sistema alimentario.

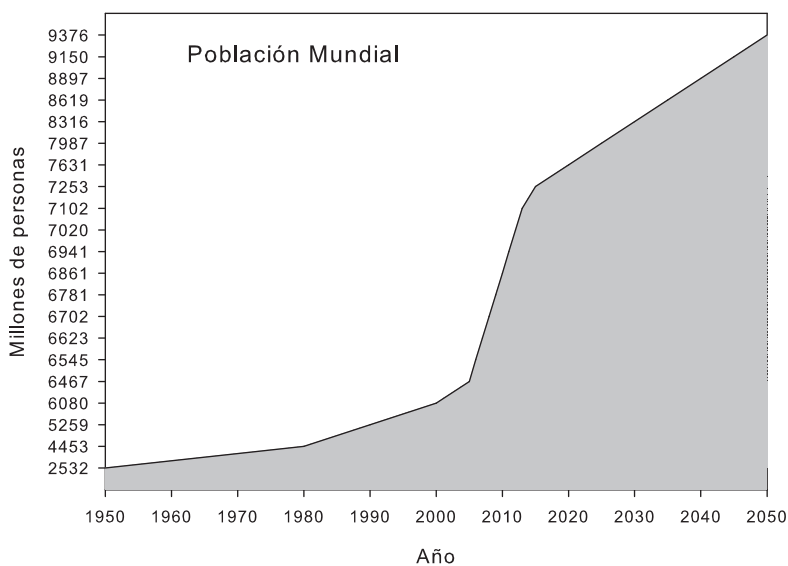


Figura 1.13: Evolución de la población mundial. Estadísticas de crecimiento del 2014 al 2050 (DESA, 2011; INE, 2014; WBG, 2014).

El crecimiento de la población y la revolución de saneamiento, provocaron que los residuos ya no fueran tratados como sólidos que regresan a la tierra, sino como residuos líquidos y diluidos (Ashley *y col.*, 2011). Todos los años, la población

mundial excreta alrededor de 3 millones de toneladas de fósforo, ya que cerca del 100% de fósforo de los alimentos consumidos es excretado en la orina y las heces. Teniendo en cuenta que más de la mitad de la población mundial vive en centros urbanos, y la urbanización va aumentando, se estima que cerca del 25% de los 1000 millones de toneladas de fósforo mineralizado extraído desde 1950, se ha enterrado en los vertederos y/o depositado en los cuerpos de agua donde se generan graves problemas ambientales, como la eutrofización (Cordell *et al.*, 2009). Como resultado, durante el último siglo, la humanidad ha movilizado masivamente el fósforo de las fuentes geológicas para la producción de fertilizantes, produciendo cambios importantes en el ciclo biogeoquímico del fósforo (Figura 1.14).



Figura 1.14: Esquema del ciclo biogeoquímico del fósforo en la actualidad (Cordell *et al.*, 2009; Elser, 2012; Westerson, 2015).

1.5 Recuperación de fósforo

El guano de las islas de la costa de Perú y de las islas del sur del Pacífico eran las principales fuentes comerciales de fósforo hasta finales del siglo XIX que comenzaron a agotarse, posteriormente se empleó la roca fosfática (recurso no renovable). El uso generalizado de la roca fosfática comenzó después de la segunda guerra mundial. En la actualidad, hay una gran dependencia hacia la roca fosfática para mantener el nivel de producción de alimentos que demanda el crecimiento poblacional (Ashley *et al.*, 2011). Sin embargo, se estima que las reservas en el mundo comenzaran a agotándose entre los próximos 50 y 100 años. Otro problema, es la calidad de las reservas restantes de la roca fosfática, la cuales contiene concentra-

ciones bajas de fósforo y concentraciones altas y en aumento de metales pesados como el cadmio y el uranio, los cuales, deben retirarse porque son tóxicos para los suelos y los seres humanos (tomando en cuenta que cada tonelada de fosfato genera cinco toneladas de subproducto demasiado radiactivo para reutilizar, por lo cual tiene que ser almacenado)(Cordell *y col.*, 2009). Esto incrementa los costes de extracción, tratamiento y transporte del fósforo.

Según Cordell *y col.* (2009), el destino de cerca de 17.5 Mt de fósforo mineralizadas en 2005 y 23 Mt en el 2009, aproximadamente 14 Mt fueron utilizadas en fertilizantes (gran parte del restante fue empleado en suplementos de alimentación de ganado, conservante de alimentos, producción de detergentes y agentes de limpieza industrial), pero sólo alrededor de 3 Mt llegaron a formar parte del alimento final. De estos alimentos alrededor del 30 – 40 % de los alimentos producidos caduca o se desecha por baja calidad, y ello cuesta alrededor de 1 Mt de fósforo cada año. Lo que quiere decir, que alrededor de 8 Mt (una gran pérdida de fósforo) son desechadas de los cultivos a través de la lixiviación y la erosión del suelo hacia los cuerpos de agua.

Por otra parte, cada persona excreta alrededor de 1.2 g de fósforo por día esto es cerca de 3 Mt por año a nivel mundial, que actualmente son llevados a las EDAR, o bien son llevados a los cuerpos de agua. Entonces, más de 9 Mt de fósforo son desechadas a los cuerpos de agua, causando graves problemas de contaminación. Si, este fósforo a nivel mundial fuese recuperando se tendría alrededor del 20 % del consumo anual mundial de fosfato para los fertilizantes. Actualmente, sólo el 10 % de fósforo de los desechos humanos se devuelve a la agricultura (Elser *y col.*, 2011).

Es por esto, que el proceso de eliminación biológica de fósforo es de gran importancia, porque puede dar soluciones a la la protección del medio ambiente y mediante estrategias de recuperación a la sostenibilidad del fósforo.

1.5.1 Recuperación de fósforo mediante el proceso de eliminación biológica de fósforo

Las aguas residuales han sido una fuente constante de nutrientes para los cultivos. Sin embargo, las necesidades de la cultura moderna, la salud pública y el cuidado ambiental hacen necesario el tratar las corrientes de aguas residuales. El potencial de las EDAR como una industria en todo el mundo se ha subestimado, además de la obtención de agua, los componentes del agua residual, pueden ser transformados en materiales valiosos como: nutrientes, energía y otros materiales reciclables (Verstraete *y col.*, 2009). En particular la eliminación biológica de fósforo supone ser un proceso más viable, sostenible y atractivo económicamente puesto que permite la posterior recuperación de fósforo.

Aunque se estima que el fósforo en las aguas residuales domésticas y muchas corrientes industriales, típicamente se encuentran en concentraciones inferiores a 10 mgP/l, en algunos casos las aguas residuales industriales provenientes de mataderos de animales llegan a tener una concentración de 20 a 40 mgP/l. Si incluyen la elaboración de alimentos, contienen una concentración de 60 a 100 mgP/l, y las aguas residuales provenientes de ganado, llegan a tener una concentración mayor a 100 mgP/l (Yuan *y col.*, 2012). Por lo que la recuperación de fósforo de este tipo de aguas presenta gran interés. En la Unión Europea según datos del 2001, entorno al 25 % del fósforo de las aguas residuales se recupera, y se reutiliza principalmente como lodos (Cordell *y col.*, 2011).

El fósforo proveniente de las aguas residuales puede ser recuperado de las EDAR, por medio de: los lodos provenientes de la precipitación química, los fangos activados de los procesos convencionales, y los fangos provenientes del proceso EBPR. Los fangos activados proveen mayor concentración de fósforo (1.4 % en peso) que otros residuos humanos primarios como la orina, heces fecales o bien los excrementos (Cordell *y col.*, 2011). De acuerdo con Yuan *y col.* (2012), los fangos enriquecidos en fósforo provenientes de sistemas EBPR contienen de 5 a 7 % de fósforo en contraste con fangos activados de procesos convencionales que contienen fósforo de 1 a 2 % de fósforo en peso seco.

Los recientes aumentos en los precios del fósforo y el déficit en las reservas de roca fosfática, junto con las necesidades medioambientales y la normativa para eliminar el fósforo de las aguas residuales, hacen que la recuperación de fósforo por el proceso EBPR sea más viable, sostenible y atractiva económicamente.

Yuan *y col.* (2012) indicaron que para el aprovechamiento del fósforo de los lodos de EBPR se emplean varias formas:

1. Aplicación directa de los biosólidos deshidratados (lodos estabilizados aeróbicamente o anaeróbicamente son llamados biosólidos) al suelo.
2. Liberación del fósforo a partir de fangos de EBPR por métodos biológicos, seguido de la recuperación a través de métodos químicos tales como precipitación o adsorción.
3. Liberación del fósforo a partir de fangos de EBPR por métodos termoquímicos (incineración), seguido de cualquier utilización del residuo o procesamiento adicional para la recuperación del fósforo.

Las implicaciones a considerar para la viabilidad de la recuperación de fósforo son principalmente: la concentración de fósforo que tiene la fuente, el almacenamiento y el transporte. En general, cuanto menor es la concentración de fósforo, se requiere más energía para concentrarlo (a través de los procesos de deshidratación o cualquier otro proceso físico o químico), o para transportar el material de baja

concentración pero voluminoso si no va a ser utilizado en el sitio (Cordell *y col.*, 2011).

La aplicación directa de biosólidos deshidratados ha demostrado ser una buena opción ya que es tan eficaz como el fósforo mineral, por lo que hay una extensa investigación sobre este producto. Sin embargo, el transporte de los biosólidos es un problema que aún no se ha resuelto. Los fangos de EBPR contiene 5 % de fósforo en peso seco y sólo de 1 a 2 % de fósforo en peso húmedo (es decir, el agua diluye el fósforo). Transportar los fangos eleva el coste, además se requiere de un equipo especializado para difundir los materiales húmedos. Sumado a esto, los biosólidos provenientes del proceso EBPR tienen una relación de N:P de aproximadamente 1, mientras que normalmente se requiere para la absorción de las plantas una proporción de 3:5. Sin embargo, el nitrógeno se añade a menudo por separado, y el resultado es comparable un fertilizante de fosfato de amonio. Por otra parte, en el empleo de lodos como fertilizantes se tiene el riesgo de la transferencia de contaminantes químicos y patógenos, tanto para los alimentos como para el medio ambiente. Generalmente la contaminación por patógenos se soluciona empleando un tratamiento térmico. La contaminación por metales debe ser manejada con cuidado, que no sobrepase las concentraciones permitidas, sobre todo cuando se vuelven a aplicar biosólidos, o donde el contenido de metales en el suelo ya es alto (Yuan *y col.*, 2012).

La incineración se utiliza ampliamente como un método de destrucción de lodos en Europa, y esto ha llevado a un mayor enfoque en la recuperación de fósforo de los lodos incinerados. El fósforo no es volátil, y se conserva en cenizas cuando los fangos son incinerados. Sin embargo, todos los contaminantes metálicos también se conservan en la ceniza, y metales tales como zinc, cobre, plomo y mercurio pueden hacer que la ceniza sea inutilizable. La extracción y recuperación posterior de fósforo a partir de cenizas es costosa. Puede haber dos formas de recuperar el fósforo de las cenizas: la extracción del fósforo por ácido que generalmente lixivia a los contaminantes metálicos; y la extracción alcalina que es ineficaz en la presencia de calcio o magnesio, elementos que aparecen en los sistemas EBPR. En la incineración se produce óxido nitroso y aunque la temperatura se controla para minimizar la producción, es complicado evitar su formación ya que los fangos son ricos en nitrógeno, lo cual es incompatible con la recuperación de fósforo agronómico.

El fósforo soluble se podría recuperar con gran eficacia a un límite de 10 mgP/l, a través del proceso de cristalización de estruvita ($6 \text{H}_2\text{OMgNH}_4\text{PO}_4$). Este proceso implica el ajuste del pH mayor de 8.0 por extracción (por aireación o agitación), seguido de la adición de magnesio (por ejemplo, como MgCl_2) y el ajuste del pH simultánea por NaOH , $\text{Mg}(\text{OH})_2$ o una suspensión de MgO . La estruvita obtenida por este método es fácil de transportar y se compara con los fertilizantes minerales por su contenido de fósforo (12 %) y nitrógeno (6 %) y con productos tales como el fosfato de di-amonio (DAP) debido a que cubre con las necesidades de nitrógeno.

También el fósforo soluble se recupera como fosfato de calcio por medio de la precipitación con cal. Esta precipitación puede lograr una recuperación alta de fosfatos; sin embargo, los fosfatos de calcio son un fertilizante pobre, en particular para suelos alcalinos (Yuan *y col.*, 2012).

Algunas de las configuraciones actuales que emplean el proceso de EBPR y la recuperación de fósforo son: Bardenpho modificado, Phoredox, A/O, Ratonox, Biedenipho, phoStrip, la eliminación biológica de fósforo y nitrógeno (Biological-chemical phosphorus and nitrogen removal, BCFS), el proceso UCT (University of Cape Town) y el UCT modificado. Sin embargo, el problema de estas configuraciones es que la mayoría emplean una digestión anaerobia previa a la recuperación del fósforo soluble del sobrenadante. Durante la digestión anaerobia es muy dado a que se presente una precipitación incontrolada, esta precipitación genera problemas de mantenimiento en los equipos y reduce el potencial de recuperación de fósforo.

Los sistemas phoStrip y BCFS aunque pueden ser los más eficientes en la recuperación de fósforo, la concentración obtenida no es lo suficientemente alta para asegurar una alta eficiencia de recuperación de fósforo para el proceso de cristalización de estruvita (Barat *y col.*, 2006b).

Por lo tanto, los trabajos se deben enfocar en buscar y estudiar las configuraciones y condiciones operacionales que permitan operar el proceso EBPR con alta eficiencia permitiendo recuperar el fósforo en altas concentraciones.

En estudios recientes (Acevedo *y col.*, 2012) se reportó que en un proceso EBPR llevado a cabo en un sistema SBR, las condiciones de operación permitieron extraer el poli-P de las PAOs obteniendo un sobrenadante rico en fósforo sin que el proceso EBPR se deteriora. Este sistema y condiciones operacionales podrían ser utilizadas para obtener una corriente enriquecida en fósforo de fácil recuperación con el mínimo coste y un alto potencial. Por lo que fue necesario evaluar experimentalmente esta potencial de recuperación de fósforo y el efecto de este nuevo modo de funcionamiento sobre el proceso de eliminación biológica de fósforo en el tiempo.

Capítulo 2

Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis consiste en estudiar a profundidad el comportamiento de las PAOs, responsables de la eliminación biológica de fósforo en el tratamiento de las aguas residuales, cuando varían sus reservas energéticas intracelulares en forma de polifosfatos. Este estudio se realiza tanto a nivel metabólico como microbiológico.

Los objetivos específicos que se abordan en la presente tesis son:

1. Estudiar a corto plazo el comportamiento metabólico de las PAOs cuando contienen distintas cantidades de polifosfato intracelular.
2. Estudiar a medio-largo plazo el comportamiento metabólico de las PAOs cuando carecen de reservas energéticas intracelulares en forma de polifosfatos.
3. Estudiar la dinámica poblacional de las PAOs y GAOs, así como distintos tipos de PAO (Tipo I y Tipo II) tanto en el estudio a corto plazo como en el estudio a medio-largo plazo.
4. Desarrollar, calibrar y validar un modelo metabólico que permita representar la versatilidad metabólica de las PAOs.
5. Evaluar el potencial de recuperación de fósforo del agua residual mediante la extracción directa del polifosfato de las PAOs en la línea de aguas de un tratamiento de aguas residuales basado en la tecnología SBR, así como analizar la repercusión de dicha extracción del polifosfato sobre el rendimiento del proceso de depuración.

Esta tesis esta formada por un compendio de artículos científicos que dan respuesta tanto al objetivo principal como a los objetivos específicos. La relación entre los artículos publicados y los objetivos planteados se muestra en la siguiente tabla.

Artículo	Revista	Objetivo específico	Capítulo en este documento
Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage.	<i>Water Research</i>	1 y 3	4
Long term study of PAO metabolic behaviour under negligible Poly-P reserves.	<i>Submitted to Water Research</i>	2 y 3	5
Modelling the metabolic shift of polyphosphate accumulating organisms.	<i>Water Research</i>	4	6
The metabolic versatility of PAOs as an opportunity to obtain a highly P-enriched stream for further P-recovery.	<i>Chemical Engineering Journal</i>	5	7

Capítulo 3

Materiales y métodos

En el presente trabajo, se llevó a cabo el estudio del proceso EBPR en un reactor SBR a escala de laboratorio. En alternancia de condiciones anaerobias y aerobias, las PAOs llevan a cabo el proceso de EBPR. En este tipo de condiciones también se desarrollan las GAOs, ya que ambas bacterias utilizan AGV de cadena corta como fuente de materia orgánica en condiciones anaerobias. Por ello se ha llevado a cabo un control y seguimiento detallado del proceso, con la finalidad de obtener un cultivo enriquecido de PAOs, con el que posteriormente se realizaron varios experimentos que proporcionaron información sobre el metabolismo de las PAOs.

La experimentación llevada a cabo en este trabajo de tesis fue realizada en tres fases experimentales, utilizando el mismo sistema SBR en cada una de ellas. Así mismo, en las tres fases experimentales se obtuvieron biomazas en el SBR altamente enriquecidas en PAOs. En la primera fase experimental la biomasa enriquecida en PAOs fue sometida a la extracción de fósforo, con la finalidad de obtener diferentes contenidos de poli-P en la biomasa y así poder evaluar el efecto a corto plazo cuando se tiene distinta concentración de poli-P. En la segunda fase experimental el poli-P fue extraído de la biomasa y se controló su acumulación en niveles mínimos por un largo periodo de tiempo (3 TRC equivalentes a 40 días). En la tercera fase experimental se estudiaron dos estrategias para la recuperación de fósforo de un sistema SBR operando el proceso EBPR. En cada una de estas fases experimentales se realizaron determinaciones analíticas y microbiológicas. Las primeras, permitieron la caracterización del fango en cada una de las experiencias realizadas y las segundas fueron utilizadas como una herramienta para obtener información de los cambios en las poblaciones microbianas en el sistema, identificando y cuantificando los grupos de PAOs, distinguiendo entre las especies PAO Tipo I y PAO Tipo II, y las GAOs. También, a través de un grupo de sondas instaladas en el reactor, se pudo monitorizar el proceso en todo momento y en cada una de las experiencias realizadas.

3.1 Descripción del montaje experimental

El sistema SBR estaba conformado por un tanque agitado de metacrilato, con un volumen útil de 7 l, diámetro de 20 cm, altura útil de 24 cm, rebose de seguridad, agitación mecánica de pala ancha y aireación por medio de difusores. La alimentación se realizó en dos corrientes diferenciadas. Una de ellas se suministró por medio de un dosificador automatizado y la otra por medio de una bomba peristáltica. El flujo de salida fue controlado por medio de una electroválvula. El reactor estaba dentro de una cámara termostática que mantenía la temperatura entorno a 20 ± 1 °C. En la figura 3.1 se muestra el montaje del sistema.



Figura 3.1: Montaje del SBR.

El proceso fue monitorizado en tiempo real mediante sondas de conductividad, pH, potencial redox y temperatura conectadas a un medidor multiparamétrico de la marca comercial Consort (CONSORT C861); para la medición del oxígeno disuelto se empleó un oxímetro de la marca comercial WTW (Oxi 340). La automatización de los equipos de agitación, aireación, flujos de entrada y salida se realizó mediante el envío de la información capturada por el oxímetro y el medidor a un controlador. Además, los datos de las variables medidas a lo largo del tiempo fueron guardadas en un PC (Figura 3.2).

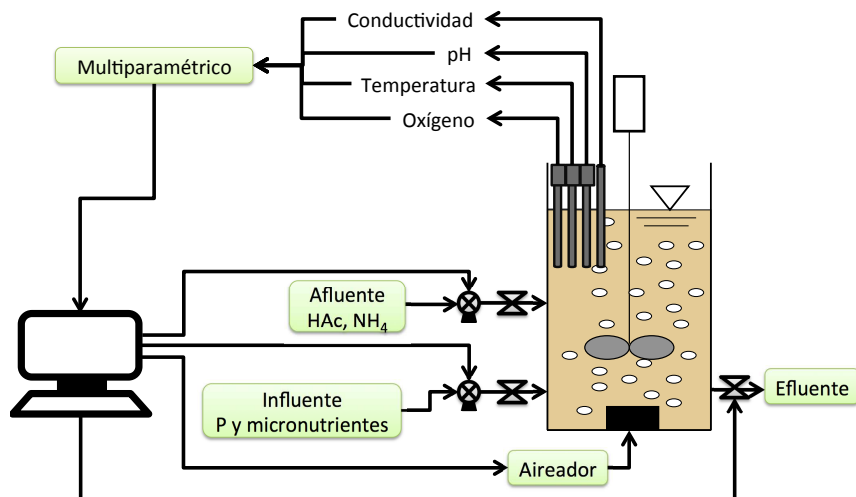


Figura 3.2: Diagrama del montaje del SBR.

La operación del SBR consistió en 4 ciclos por día cada ciclo de 6 h, alternando condiciones anaerobias y aerobias para llevar a cabo el proceso EBPR. Cada ciclo se dividía en 5 etapas. En la figura 3.3 se muestra un esquema de las etapas de un ciclo. En la primera fase de experimentación la duración de las etapas del montaje (SBR1) fueron diferentes a las empleadas en la segunda (SBR2) y tercera fase (SBR3). En la figura 3.1 se describen detalladamente cada una de las fases.

Tabla 3.1: Descripción detallada del montaje SBR.

Etapa	Descripción	Duración	
		SBR1	SBR2, SBR3
1: Llenado	Se administró 3.5l de agua residual sintética, completando un volumen de 7l en el reactor.	4 min	5 min
2: Anaerobia	El fango permanecía en ausencia de oxígeno y agitación con una velocidad de giro que aseguraba la completa homogeneización del licor mezcla, sin que se produjera la ruptura del floculo y evitando la reaeración.	1 h 30 min	1 h 30 min
3: Aerobia	Se proporcionó oxígeno disuelto por medio de difusores manteniendo una concentración de 2.5 mg O ₂ /l y se continuó con la agitación asegurando mezcla completa.	3 h 30 min	3 h
4: Sedimentación	Se detuvo la agitación y aireación para obtener un sobrenadante clarificado.	52 min	80 min
5: Vaciado	Un volumen de 3.5l de sobrenadante se eliminó del reactor.	4 min	5 min

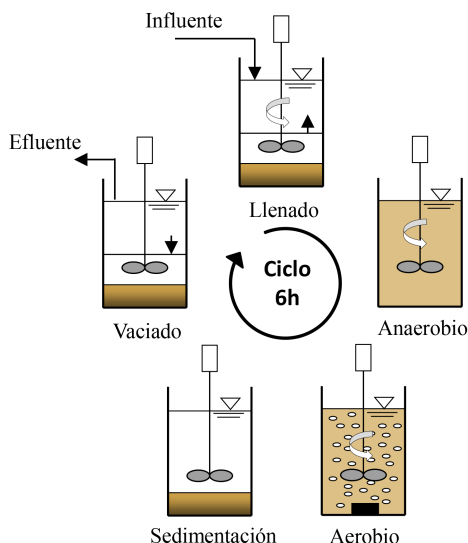


Figura 3.3: Esquema de las etapas que constituyen un ciclo del proceso de SBR.

El SBR funcionó de acuerdo a las variables de operación expuestas en la tabla 3.2. Los valores de las variables de operación, son las que de acuerdo con estudios recientes demostraron favorecer el desarrollo de los PAOs sobre las GAOs y otras bacterias características de los fangos activados.

Tabla 3.2: Variables de operación del SBR.

Parámetro	Valor
Temperatura	$20 \pm 1^\circ\text{C}$
Oxígeno disuelto	1.5 - 2.5 mgO ₂ /l
pH inicial	7.5
Tiempo de retención celular (TRC)	SBR1 y SBR2 8 d, SBR3 10 d
Tiempo de retención hidráulico (TRH)	12 h

El flujo de entrada fue agua residual sintética preparada en el mismo laboratorio. Su composición fue: agua des-ionizada, HAc como fuente de carbono, fosfatos y amonio como macro-nutrientes, metales y sales. Para mantener el equilibrio químico entre el medio y la biomasa, fue necesario asegurarse de que el agua residual artificial tuviese características químicas similares al agua residual real.

Las concentraciones de HAc y fosfatos fueron reguladas para favorecer el desarrollo de las PAOs. La concentración de amonio fue controlada solo para cubrir las necesidades nutricionales y de esta forma evitar que el amonio estuviera disponible para el proceso de nitrificación. Como se mencionó anteriormente y se muestra en la figura 3.2 el influente se dividió en dos corrientes, una de ellas estaba compuesta por HAc más amonio y la otra por el resto de los compuestos antes mencionados.

De esta manera se evitó favorecer el crecimiento de microorganismos no deseados en el influente. La tabla 3.3 muestra las concentraciones de los componentes del agua residual sintética.

Tabla 3.3: Agua residual sintética (componentes y concentraciones).

Componente	Concentración (mg/l)
HAc(DQO)	110.00
NH ₄ Cl	2.00 – 5.00
CaCl ₂	10.00
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200.00
K ₂ HPO ₄	118.10
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	3.00
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0.24
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	0.12
H ₃ BO ₃	0.30
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.06
KI	0.06
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.30
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.24
NaCO ₃ H	228.00
NaCl	345.00
Levadura	5.00
Tiurea	20.00

3.2 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos fue desarrollado para estudiar el comportamiento metabólico de las PAOs, cuando se someten a la reducción del contenido de poli-P almacenados intracelularmente. Para ello se operó el SBR anteriormente descrito, el cual en anteriores experiencias, demostró ser un sistema flexible y de fácil maniobra (Borrás, 2008; Montoya, 2008; Barat, 2004). En la figura 3.4 se muestra el diseño experimental.

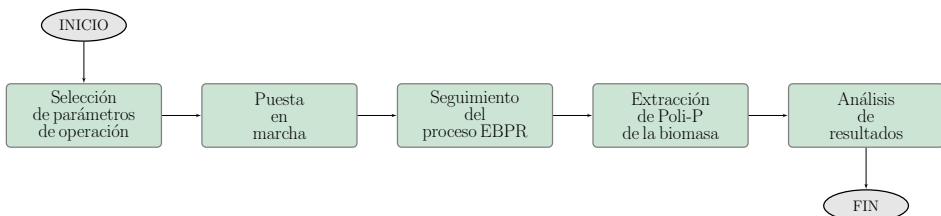


Figura 3.4: Diagrama de flujo del procedimiento experimental.

La puesta en marcha y el seguimiento del proceso fueron diseñados siguiendo las pautas del trabajo experimental realizado en Montoya (2008) y Barat (2004). En los siguientes apartados se detallan los pasos del procedimiento experimental.

3.2.1 Puesta en marcha

Para la puesta en marcha en los distintos periodos experimentales se utilizó como inóculo el fango procedente de la EDAR de Quart Benàger (Valencia), el cual presentaba el fenómeno de eliminación biológica de fósforo. Para la obtención de un fango enriquecido en PAOs, el fango empleado como inóculo fue expuesto a la alternancia de condiciones anaerobias y aerobias y a los parámetros de operación expuestos en la tabla 3.2. Las concentraciones de HAC y fosfato en el influente se incrementaban gradualmente, manteniendo la relación DQO/P dentro del rango 10 – 20 mgDQO/mgP. Durante este periodo se realizó un seguimiento del proceso, tanto por las sondas de conductividad, pH, potencial redox, temperatura y oxígeno disuelto que proporcionaban información instantánea, y por medio de las siguientes determinaciones analíticas que se realizaban rutinariamente:

- Ácido acético al inicio de la fase anaerobia.
- Fósforo soluble al inicio de la fase anaerobia, al final de la fase anaerobia y al final de la fase aerobia.
- Nitrato soluble al inicio de la fase anaerobia y al final de la fase aerobia.

3.2.2 Seguimiento del proceso de eliminación biológica de fósforo

Una vez que el fango fue altamente enriquecido en PAOs, las concentraciones de HAC y PO_4 en el influente se mantuvieron constante. En este periodo de la experimentación la monitorización del proceso se realizó mediante la información de las sondas instaladas en el reactor y las determinaciones analíticas y microbiológicas en listada a continuación:

- Determinaciones analíticas:
 - Ácido acético al inicio de la fase anaerobia.
 - Fósforo soluble al inicio y final de la fase anaerobia y final de la fase aerobia.
 - Amonio soluble al inicio y final de la fase anaerobia.
 - Nitrato soluble al inicio de la fase anaerobia y final de la fase aerobia.
 - Demanda Química de Oxígeno Total al final de la fase anaerobia.
 - Fósforo Total al final fase aerobia.
 - Sólidos Suspendidos Totales al final de la fase aerobia.

- Sólidos Suspendidos Volátiles al final de la fase aerobia.
- Polihidroxicarboxilatos al final de la fase anaerobia y final de la fase aerobia.
- Glucógeno al final de la fase anaerobia y final de la fase aerobia.
- Determinaciones microbiológicas:
 - Visualización del fango en contraste de fases.
 - Hibridación con fluorescencia *in situ*.

Con la información obtenida se verificó que el sistema alcanzó las condiciones pseudoestacionarias, donde los SST, los SSV, el P_T y el porcentaje de PAOs en la biomasa fueran estables. A partir de ese momento se iniciaron los distintos experimentos.

3.2.3 Métodos analíticos

Los métodos para las determinaciones analíticas que se emplearon en este trabajo se detallan a continuación:

3.2.3.1 Determinación de ácidos grasos volátiles de cadena corta y alcalinidad

El método de valoración ácido-base de 5 puntos propuesto por Moosbrugger *y col.* (1992) fue utilizado para la determinación de la concentración de ácidos volátiles de cadena corta, como es el acetato (mgHAc/l), además de la alcalinidad (mgCaCO₃/l) de la muestra.

El procedimiento experimental consistió en la valoración con HCl 0.1 N de la muestra filtrada mediante papel filtro estándar. Se determinaron los volúmenes de HCl necesarios para obtener los siguientes pH: 6.70, 5.90, 5.20 y 4.30 (método automatizado mediante el equipo Methom 716 DMS Titrimo). La concentración de los ácidos volátiles y de la alcalinidad de la muestra, son calculadas mediante un programa informático distribuido por los propios autores del método analítico. Este programa está basado en el equilibrio químico de las especies involucradas, como son los fosfatos, el amonio y los sulfuros que se presentan comúnmente como ácidos/bases débiles en el agua.

3.2.3.2 *Determinación de fósforo, amonio y nitrato*

Las concentraciones de PO_4 , NH_4 y NO_3 fueron determinadas de la muestra filtrada mediante un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$, usando un analizador de inyección de flujo (Lachat QuikChem800).

3.2.3.3 *Determinación de cationes metálicos*

Las concentraciones de los cationes metálicos: Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , fueron determinadas de la muestra filtrada mediante un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$, y medidas por cromatografía iónica, mediante el equipo 761 Metrohm Compact IC.

3.2.3.4 *Determinación de la demanda química de oxígeno total*

Para la determinación de DQO se utilizó el Método 5220-B del Standard Methods (Eaton *y col.*, 2005), el cual consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato mediante digestión con reflujo abierto. Esta determinación se llevó a cabo por calentamiento bajo condiciones de reflujo total de un determinado volumen de muestra de agua con un exceso conocido de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en presencia de H_2SO_4 al 96 %. El periodo de reflujo estándar es de 2 h a $150\ ^\circ\text{C}$. La reacción es catalizada con Ag_2SO_4 , y se utiliza HgSO_4 para eliminar posibles interferencias con los haluros presentes. El exceso de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se valoró con Sal de Mohr por medio de valoración potenciométrica. Es necesario incluir un blanco, usando agua des-ionizada, para valorar la sal de Mohr y considerar las posibles interferencias de los reactivos empleados.

3.2.3.5 *Determinación de fósforo total*

La determinación del fósforo total requirió de una previa conversión de las formas de fosfato (como poli-P, fósforo orgánico soluble y particulado) a ortofosfatos. Esta conversión se realizó mediante una digestión ácida con persulfato, siguiendo el Método 4500-P B del Standard Methods (Eaton *y col.*, 2005). Después de la digestión de 2 h a $150\ ^\circ\text{C}$, se determinó la concentración de fosfatos anteriormente descrito en la Subsubsección 3.2.3.2 p.50.

3.2.3.6 Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles

La concentración de los SST de la muestra previamente filtrada, mediante un filtro de fibra de vidrio de tamaño de poro de $1.5\ \mu\text{m}$, se determinó mediante la eliminación de la humedad en una estufa a $105\ ^\circ\text{C}$. La determinación de los SSV se obtuvo de la diferencia de pesos de la muestra, después de someterla a una temperatura de $550\ ^\circ\text{C}$ en una mufla. La metodología gravimétrica llevada a cabo fue la propuesta por Eaton *y col.* (2005) (método 2540-D).

3.2.3.7 Determinación de polihidrixialcanoatos

Principalmente los PHV, PHB y pequeñas fracciones de PH2MV y PH2MB constituyen los PHA almacenados intracelularmente por los PAO. Para la cuantificación de estos polímeros se empleó la cromatografía gaseosa. La metodología empleada fue la descrita en Gatti (2009) donde realizó algunas modificaciones a la metodología descrita en Comeau *y col.* (1988), la cual fue una extensión y mejora de la metodología desarrollada por Braunegg *y col.* (1978).

La metodología empleada consistió en digerir aproximadamente $200 \pm 1\ \text{mg}$ de liofilo en una mezcla de 3 ml de cloroformo y 3 ml de metanol acidificado al 3% con H_2SO_4 . El metanol acidificado contenía ácido benzoico como patrón interno en una concentración de 100 mg/l. El liofilo se obtuvo de centrifugar muestras de fango a 7500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante e inmediatamente se congeló a $-84\ ^\circ\text{C}$ para su posterior liofilización. La digestión se realizó a $100\ ^\circ\text{C}$ por 20 h. La concentración de acidificación y el tiempo de incubación son parámetros recomendados por Oehmen *y col.* (2005b) cuando el proceso EBPR enriquecido con PAO es alimentado con ácido acético. Una vez finalizada la digestión se realizó una separación de fases mediante la adición de 3 ml de agua destilada, agitando vigorosamente por 1 min entre cada ml añadido. Después de reposar por 2 h, un volumen de la fase orgánica o clorofórmica fue extraído con una pipeta pasteur y pasado por un filtro Miller-HN de $0.45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, luego fue depositado en un vial para el análisis cromatográfico.

El análisis se realizó empleando un cromatógrafo de gases de la marca comercial Agilent Technologies 6890 N, Network GC System. El cromatógrafo fue operado con una columna capilar Teknokroma SupraWax-208 (30 m de longitud x $0.53\ \text{mm}$ de diámetro interior x $1\ \mu\text{m}$ de grosor de la película), con un inyector modo split 2:1 y helio como gas portador, temperatura y volumen de inyección de $220\ ^\circ\text{C}$ y $1\ \mu\text{l}$ respectivamente, detector de ionización de flama (Flame Ionisation Detection, FID) operando a $275\ ^\circ\text{C}$ con un flujo de hidrógeno de 40 ml/min, flujo de aire de 450 ml/min y flujo de helio de 41 ml/min. El programa de temperatura del horno fue de $70\ ^\circ\text{C}$ durante 2 min, seguido de incrementos de $10\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta la temperatura final de $160\ ^\circ\text{C}$ mantenida por 2 min.

El análisis requiere de la preparación de un calibrado de la respuesta del cromatógrafo frente a los compuestos que se pretenden analizar. Este calibrado se realizó a partir de la preparación de 6 patrones compuestos de 0 – 1.2 mg de ácido-3-hidroxi-butírico y ácido-3-hidroxi-valérico en una proporción 9 : 1 (Sigma–Aldrich, Alemania) (Oehmen *y col.*, 2005b).

3.2.3.8 Determinación del glucógeno

Para la determinación del glucógeno, lo primero que se llevo a cabo fue transformar el polímero en unidades de glucosa, para ello la muestra fue tratada mediante una hidrólisis ácida. La glucosa fue cuantificada mediante el método enzimático, empleando el kit *Glucose HK* de la casa comercial Sigma-Aldrich. La metodología a seguir fue la siguiente: las muestras de fango fueron centrifugadas a 7500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante e inmediatamente se congelaron a -84 °C para su posterior liofilización. Una cantidad de aproximadamente 300 ± 1 mg de liofilo fue mezclada con 2 ml de HCl 0.6 N y digerida a 100 °C por 2 h. El sobrenadante fue analizado siguiendo el procedimiento descrito en el kit.

3.2.4 Métodos microbiológicos

3.2.4.1 Visualización en contraste de fases

La visualización en contraste de fases consistió en la observación de muestras frescas. Para esto se tomó una gota (10 – 20 μ l) de muestra y se colocó sobre un portaobjetos, seguidamente se colocó con cuidado un cubreobjetos encima de la gota, y se visualizó en el microscopio en contraste de fases. Se utilizaron de 100x, 400x y en caso de una identificación de morfología se emplearon aumentos de 1000x.

3.2.4.2 Tinción con azul de metileno

La tinción con azul de metileno permitió la visualización de los poli-P almacenados intracelularmente, el método a seguir es el descrito por Seviour *y col.* (1999). El procedimiento se describe a continuación:

1. Poner una gota (10 – 20 μ l) de muestra en un portaobjetos, extenderla por la superficie hasta aproximadamente a la del cubre.
2. Se deja secar al aire el mínimo tiempo posible.
3. Aplicar una solución azul de metileno Loeffler de 10 – 30 s.
4. Lavar con abundante agua destilada.

5. Secar el porta al aire y examinar con aceite de inmersión, en campo claro y a 1000x aumentos.

La solución de azul de metileno Loeffler se compone de la mezcla en partes iguales de las siguientes soluciones:

- Solución 1:
 - 1 ml de solución de hidróxido potásico al 1 %.
- Solución 2:
 - 0.3 g de azul de metileno.
 - 100 ml etanol al 60 %

El resultado visual de esta tinción es ver las inclusiones de poli-P de color rosa brillante-violeta y el citoplasma ligeramente azulado.

3.2.4.3 *Hibridación con fluorescencia in situ (FISH)*

La técnica FISH permitió diferenciar y cuantificar los fenotipos PAO y GAO que se encontraban en el sistema. Fueron empleadas sondas de ADN marcadas con fluorocromos, que se unen a la fracción de 16S rARN de la bacteria en estudio, produciendo una fluorescencia en las bacterias con la fracción de rARN coincidente. Según la técnica, la especificidad varía con la extensión de la cadena y las condiciones de hibridación, por lo que es posible ajustar dicha especificidad a diferentes niveles filogenéticos. El efecto de la temperatura y el medio iónico en el que se encuentra el ADN o el ARN, permite la separación de las cadenas o regiones bicatenarias, en el caso del ADN, o en una sola cadena monocatenaria en el caso del ARN (Amann *y col.*, 1990).

La cuantificación de los grupos de bacterias se realizó mediante un software desarrollado en el trabajo de Tesis Doctoral de Borrás (2008). La cuantificación consistió en: hibridar la muestra mediante la técnica FISH con la sonda EUBmix y otra u otras sondas de interés con diferente fluorocromo, capturar en imágenes alrededor de 20 campos distintos de la muestra y emplear el software. El software analiza las imágenes obtenidas mediante el conteo de píxeles. La cuantificación mediante el software es automática, siendo el resultado final un número que representa el porcentaje en área de una especie bacteriana en la muestra, acompañado de su incertidumbre, calculada como la desviación estándar dividida por la raíz del número de campos analizados.

Técnica para identificación de las poblaciones microbianas mediante FISH

Las PAOs fueron identificadas como bacterias gram negativas y se encontró que tienen relación con *Rhodocyclus* de la clase de β -*Proteobacteria* (Crocetti *y col.*, 2000). Estos microorganismos fueron nombrados como *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (Hesselmann *y col.*, 1999). Las GAOs fueron identificadas dentro de la clase de α -*Proteobacteria* con bacterias gram negativas.

En la tabla 3.4 se presenta el nombre de la sonda, la secuencia de nucleótidos de la sonda, el microorganismo al que se identifica, el porcentaje de formamida óptimo para la hibridación y la referencia donde ha sido descrita la sonda. Las sondas fueron adquiridas a través de ThermoFisher Scientific.

El procedimiento de la técnica FISH se realizó conforme se describe a continuación; los reactivos son descritos en Nielsen *y col.* (2009):

A. Tratamiento de los portaobjetos FISH cubiertos con Teflón.

1. Lavar con solución de limpieza.
2. Enjuagar con agua destilada.
3. Secar al aire (proteger del polvo ambiental).
4. Cubrir con gelatina por inmersión en la solución de gelatina 0.1 % con sulfato potásico cromato 0.01 % (preparada en el momento, T= 60 °C).
5. Secar al aire.

B. Fijación de las muestras: GRAM negativas con paraformaldehído (PFA).

1. Lavar 1 ml de flóculo con 500 μ l de PBS 1X (6000 rpm durante 3 min).
2. Añadir 3 volúmenes de PFA (750 μ l) a 1 volumen (250 μ l) de muestra y mantener a 4 °C durante 1 – 3 h (mínimo 1 h – máximo 18 h).
3. Obtener un pellet de las células por centrifugación (6000 rpm durante 3 min) y eliminar el fijador.
4. Lavar las células con PBS 1X (500 μ l).
5. Resuspender en PBS 1X (500 μ l) (para tener una concentración de 108 – 109 células/ml) y añadir 1 volumen (500 μ l) de etanol absoluto frío (4 °C).

Tabla 3.4: Sondas generales para la identificación de las PAOs y las GAOs.

Sonda	Secuencia (5' → 3')	Especificidad	% de formamida	Referencia
EUB338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	0 – 50	Amann <i>y col.</i> (1990)
EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetales</i>	0 – 50	Daims <i>y col.</i> (1999)
EUB338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	0 – 50	
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	<i>Rhodocyclus tenuis subgrup</i>	35	Crocetti <i>y col.</i> (2000)
PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	<i>Candidatus Accumilibacter phosphatis</i>	35	
PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAAGG	<i>Rhodocyclus tenuis subgrup</i>	35	
Acc-I-444	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	Especie IA y otra especie TipoI	35	Flowers <i>y col.</i> (2009)
Acc-II-444	CCCGTGCAATTTCTTCCCC	Clade IIA, IIC y IID como especie TipoII	35	
GB	CGATCCTCTAGCCCACT	<i>Gammaproteobacterial group</i>	35 – 70	Kong <i>y col.</i> (2002a)
TFO-DF218	GAAGCCTTTGCCCTCAG	<i>Deftluviococcus</i> -related (cluster 1)	40	Wong <i>y col.</i> (2004)
TFO-DF618	GCCTCACTTGTCTAACCG	<i>Deftluviococcus</i> -related (cluster 1)	40	
DF10201	CCGGCCGAACCGACTCCC	Organismos relativos a <i>Deftluvicoccus</i> (cluster 2)	35	Meyer <i>y col.</i> (2006)
DF9881	GATACGACGCCATGTCAAGGG	Organismos relativos a <i>Deftluvicoccus</i> (cluster 2)	35	
H966 (DF9881 compet1)	CTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGC		35	
H1038(DF9881 compet2)	AGCAGCCATGCAGCACCTGTGTGGCGT		35	

6. Guardar a -20°C (se pueden conservar en condiciones varios meses las muestras).

C. Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH.

1. Poner un volumen de $3\ \mu\text{l}$ de muestra fijada en el portaobjetos.
2. Secar al aire.
3. Deshidratar en EtOH al 50 % durante 3 min (por inmersión).
4. Deshidratar en EtOH al 80 % durante 3 min (por inmersión).
5. Deshidratar en EtOH absoluto durante 3 min (por inmersión).
6. Tras la deshidratación, los portas pueden ser conservados indefinidamente.

D. Hibridación *in situ*.

1. Preparar la solución de hibridación con formamida (ver tabla 3.5) en un eppendorf de 2 ml.
2. De la solución de hibridación con formamida, reservar en un eppendorf $6 \times (10 - n)\ \mu\text{l}$ siendo n el volumen de sonda utilizada en cada pocillo.
3. Añadir al eppendorf reservado $6\ \mu\text{l}$ de sonda.
4. Poner un trozo de papel de celulosa dentro de un tubo Sarstedt de 50 ml y echar sobre el papel la solución de hibridación sin sonda.
5. Poner $9\ \mu\text{l}$ de la solución de hibridación más $1\ \mu\text{l}$ de sonda en cada pocillo y repartir homogéneamente por todo el campo.
6. Introducir el porta dentro del tubo Sarstedt, manteniendo siempre la posición horizontal.
7. Incubar a 46°C durante hora y media.
8. Preparar 50 ml de la solución de lavado (ver tabla 3.6), y atemperar a 48°C .
9. Sacar del horno y rápidamente lavar los portas e introducirlos dentro del tubo con la solución de lavado.
10. Incubar en un baño a 48°C durante 15 – 20 min.
11. Lavar con agua destilada.

12. Secar al aire en la oscuridad.
13. Si no se observa al microscopio inmediatamente, guardar el porta a -20°C dentro de un tubo Sarstedt de 50 ml.
14. Observar al microscopio de epifluorescencia o un microscopio confocal láser, con los filtros adecuados según los fluorocromos utilizados.

Tabla 3.5: Volúmenes de reactivos en función del porcentaje de formamida para la preparación de la solución tampón de hibridación en la técnica FISH.

Reactivo (μl)	% de formamida						
	10	20	25	30	35	40	45
NaCl 5M	360	360	360	360	360	360	360
HCl-Tris 1M	40	40	40	40	40	40	40
Formamida	200	400	500	600	700	800	900
Agua Mili-Q	1398	1198	1098	998	898	798	698
SDS 10%	2	2	2	2	2	2	2
Volumen final	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

Tabla 3.6: Volúmenes de reactivos en función del porcentaje de formamida para la preparación de la solución tampón de lavado en la técnica FISH.

Reactivo	% de formamida						
	10	20	25	30	35	40	45
NaCl 5M (μl)	4500	2150	1490	1020	700	460	300
EDTA 0.5M (μl)	500	500	500	500	500	500	500
HCl-Tris 1M (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Agua Mili-Q (μl)	44.45	46.3	46.96	47.43	47.75	47.99	48.15
SDS 10% (μl)	50	50	50	50	50	50	50
Volumen Final (ml)	50	50	50	50	50	50	50

Después de aplicar el procedimiento, los portaobjetos fueron examinados utilizando un microscopio óptico con fluorescencia Leica DM2500 cámara digital Leica DFC420c.

Método de cuantificación de las poblaciones microbianas

Una vez que se hibrido *in situ* la muestra, se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. La muestra se observa en el microscopio óptico con fluorescencia Leica DM2500 cámara digital Leica DFC420c y se tomaron imágenes de entre 20 y 40 campos representativos de la muestra hibridada.
2. Las imágenes son introducidas al software de cuantificación descrito en (Borrás, 2008), dando un informe detallado de los porcentajes de áreas ocupadas por las bacterias presentes en la muestra hibridada.
3. Se realiza un análisis de los resultados, con el fin de filtrar posibles resultados erróneos o estadísticamente incoherentes.

3.2.5 Ciclo de extracción de fósforo

En cada una de la experiencias realizadas el poli-P fue extraído de la biomasa. Para la extracción del poli-P se empleó un ciclo que consistió en eliminar el sobrenadante enriquecido en fósforo al final de la fase anaerobia y remplazarlo por con agua sintética sin fósforo, de esta manera se redujo el contenido en poli-P al final del ciclo. En la figura 3.5 se muestran las diferentes etapas durante el ciclo de extracción de fósforo.

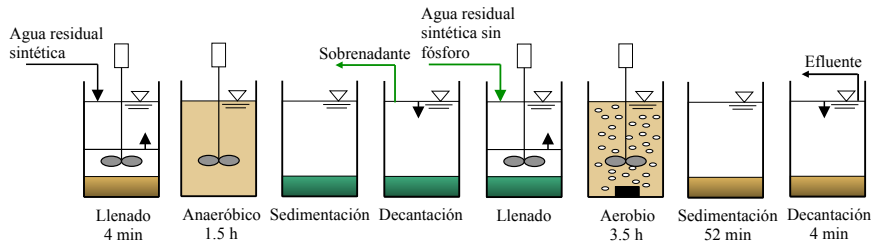


Figura 3.5: Fases del ciclo de extracción de poli-P de la biomasa en un SBR.

Chapter 4

Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage

B. Acevedo^a, A. Oehmen^b, G. Carvalho^b, A. Seco^c, L. Borrás^c, R. Barat^{a1}

^a Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022. Valencia. Spain (e-mail: breaclu@posgrado.upv.es, rababa@dihma.upv.es)

^b REQUIMTE/CQFB, Chemistry Department, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal (e-mail: adriano@dq.fct.unl.pt, gildacarvalho@dq.fct.unl.pt)

^c Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia. Doctor Moliner, 50. 46100 – Burjassot. Valencia. Spain (e-mail: aurora.seco@uv.es, luis-borras-falomir@uv.es)

ABSTRACT

Previous studies have shown that polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) are able to behave as glycogen-accumulating organisms (GAOs) under different conditions. In this study we investigated the behavior of a culture enriched with *Accumulibacter* at different levels of polyphosphate (poly-P) storage. The results of stoichiometric ratios $\text{Gly}_{\text{degraded}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$, $\text{PHB}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$, $\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ and $\text{P}_{\text{release}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ confirmed a metabolic shift from PAO metabolism to GAO metabolism: PAOs with high poly-P content used the poly-P to obtain adenosine tri-phosphate (ATP), and glycogen (Gly) to obtain nicotinamide

¹In: *Water Research* 46(2012) pp. 1889-1900. DOI: [10.1016/j.watres.2012.01.003](https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.003)

adenine dinucleotide (NADH) and some ATP. In a test where poly-P depletion was imposed on the culture, all the acetate (HAc) added in each cycle was transformed into polyhydroxyalkanoate (PHA) despite the decrease of poly-P inside the cells. This led to an increase of the $\text{Gly}_{\text{degraded}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ ratio that resulted from a shift towards the glycolytic pathway in order to compensate for the lack of ATP formed from poly-P hydrolysis. The shift from PAO to GAO metabolism was also reflected in the change in the PHA composition as the poly-P availability decreased, suggesting that polyhydroxyvalerate (PHV) is obtained due to the consumption of excess reducing equivalents to balance the internal NADH, similarly to GAO metabolism. Fluorescence in situ hybridization analysis showed a significant PAO population change from Type I to Type II *Accumulibacter* as the poly-P availability decreased in short term experiments. This work suggests that poly-P storage levels and GAO-like metabolism are important factors affecting the competition between different PAO Types in enhanced biological phosphorus removal systems.

4.1 Introduction

Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) is widely accepted as one of the most economical and sustainable processes to remove phosphorus from wastewater. PAOs are the group of microorganisms primarily responsible for the EBPR process. PAOs are equipped with a polyphosphate-accumulating metabolism (PAM) under alternating anaerobic-aerobic/anoxic conditions. Under anaerobic conditions, PAOs take up volatile fatty acids (VFAs) (e.g. acetate) and store them as PHAs (Comeau *et al.*, 1986; Mino *et al.*, 1987; Wentzel *et al.*, 1986). ATP is required for HAc transport (Comeau *et al.*, 1986; Smolders *et al.*, 1994) and conversion to acetyl coenzyme A (Ac-CoA) inside the cell. The source of ATP is thought to be provided primarily by the hydrolysis of intracellularly stored inorganic poly-P. A reducing equivalent source, such as reduced NADH, is required under anaerobic conditions for the synthesis of PHA. Many researchers have been studying biochemical pathways of PAOs (Schuler *et al.*, 2003a; Schuler *et al.*, 2003b; Erdal *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009). The major differences in the proposed metabolic pathways are related to the source of the reducing equivalents for PHA synthesis (Oehmen *et al.*, 2007). Comeau *et al.* (1986) and Wentzel *et al.* (1986) suggested the anaerobic operation of the tricarboxylic acid cycle (TCA) as a reducing equivalent source. Mino *et al.* (1987) suggested that anaerobic glycogen degradation through glycolysis was a possible source of the reducing equivalents. It is suggested in many experimental studies (Pereira *et al.*, 1996; Lemos *et al.*, 1998; Hesselmann *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009) that both, TCA and glycolysis, provide the reducing equivalents. PAOs use oxygen or NO_x (aerobic or anoxic conditions) to take up the phosphate in order to recover the poly-P level (Oehmen *et al.*, 2007). Different species of PAOs have been reported, among which include Type I and Type II *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, which are able to denitrify. The PAO Type I are thought to be able to denitrify from nitrate and/or nitrite while PAO Type II are able to denitrify from nitrite

(Carvalho *et al.*, 2007; Flowers *et al.*, 2009). Under aerobic/anoxic conditions, the source of energy and carbon is obtained from stored PHAs, to regenerate the glycogen and recover the poly-P.

In EBPR processes, the GAOs compete with PAOs for VFA uptake under anaerobic conditions. GAOs have a glycogen-accumulating metabolism (GAM) which is similar to PAM but without phosphorus release and phosphorus uptake; therefore, GAOs do not remove phosphorus from wastewater. GAOs use glycolysis to obtain energy and reducing equivalents for VFA uptake and PHA storage. Under aerobic conditions, glycogen is regenerated from PHAs.

Microbiological studies identify PAOs and GAOs as different microorganisms with similar metabolisms. Given this observation, Schuler *et al.* (2003a) hypothesized that GAM was most likely the dominant process in PAO cultures when subjected to certain operational conditions. It has been observed in recent studies that PAOs are able to behave as GAOs under different conditions (Barat *et al.*, 2008; Erdal *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

Erdal *et al.* (2008) and Zhou *et al.* (2008) observed that under low poly-P conditions, PAOs are able to take up acetate anaerobically, suggesting that acetate can be stored as PHA using glycogen as the primary energy source. Barat *et al.* (2006) and Barat *et al.* (2008) observed that the calcium ion clearly affects the PAOs performance in a Sequencing Batch Reactor (SBR) operated for EBPR. These authors detected a clear effect of influent Ca concentration on the amount of phosphate released per unit of acetate taken up during the anaerobic phase. They also observed a metabolic shift from PAM to GAM.

The aim of this work is to study the PAOs behavior with different levels of poly-P storage from a macroscopic to a microscopic point of view. For this purpose we have reduced the internal poly-P at different levels (from a highly enriched PAOs with poly-P to a system starved of poly-P) in a SBR reactor operated for EBPR in order to study the evolution of the internal polymers and the population dynamics of PAOs (including PAO Types I and PAO Type II) and GAOs. The results of this work could help for a better understanding of PAO metabolism and for a future modification of the current models adding the metabolic shift into PAO models.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Reactor setup and operation

A laboratory scale sequencing batch reactor (SBR) enriched in *Accumulibacter* was setup in this study. The SBR was operated under anaerobic-aerobic conditions for biological phosphorus removal during 134 days. The SBR was fed with HAC as

the sole carbon source. The working volume of the SBR was 7 l and the volume of synthetic wastewater added in each cycle was 3.5 l (overall hydraulic retention time was 12 h). Biomass was wasted daily from the system to maintain the sludge retention time at 8 days. The SBR was operated with four 6 h cycles per day: filling period 4 min; anaerobic phase 1.5 h; aerobic phase 3.5 h; settling phase 52 min and withdrawing period 4 min.

The reactor was equipped with conductivity, ORP, pH, temperature and dissolved oxygen electrodes. The dissolved oxygen (DO) concentration in the aerobic phase was controlled between 1.5 and 2.5 O₂mg/l. The temperature was maintained at 20 ± 1 °C. The initial pH for each cycle was kept around 7.5 and ranged from 7.0 to 8.9 during the different phases of each cycle. Synthetic wastewater was used during the pseudo-steady state and experimental period with a COD/P ratio of 10.5 CODmg/Pmg (110 CODmg/l and 10.5 Pmg/l). The wastewater consisted of two separate solutions as follows: one solution contained mineral compounds, including K₂HPO₄ and the other one contained acetate and NH₄Cl (see Barat *et al.*, 2008 for a detailed description). Thiourea was added to the synthetic media (20 mg/l) in order to inhibit nitrification.

4.2.2 Experimental design

The SBR was seeded with sludge from a wastewater treatment plant (WWTP) operated for biological phosphorus removal that is located in Valencia (Spain). Once the process was stabilized and the biomass was enriched in PAOs, six experiments were carried out. All the experiments were carried out keeping constant all the factors known to favor the population of PAOs over GAOs: a low COD/P ratio in the influent of about 10 – 20 CODmg/Pmg (Mino *et al.*, 1998; Oehmen *et al.*, 2007); a pH above 7 (Smolders *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 1999; Filipe *et al.*, 2001b; Filipe *et al.*, 2001c); and a temperature of 20 °C (Oehmen *et al.*, 2007). Each experiment consisted of intensively monitoring the concentrations of HAc, phosphorus, ammonia, nitrate, PHA and glycogen during one whole SBR cycle. Moreover, COD, PT, TSS and VSS were measured at the end of the aerobic phase. Samples for fluorescence in situ hybridization were also collected.

The 1st and 2nd experiments were carried out at the same operational conditions to characterize the process performance with high poly-P content. The 3rd, 4th and 5th experiments were carried out at decreasing intracellular poly-P content. In order to reach these conditions, it was necessary to carry out a conditioning cycle before each of these experiments (one conditioning cycle in the experiments 3, and 4, and two conditioning cycles in the experiment 5). A period of time after each experiment was used for the system to recover the initial conditions of phosphorus release. The 6th experiment was performed when the poly-P content in the biomass was recovered. During the course of the experiments the influent wastewater was the same, with the exception of the conditioning cycles prior to

the 4th and 5th experiment, where the HAC concentration was increased to 170 and 400 CODmg/l respectively, in order to induce higher poly-P hydrolysis and phosphate release (Figure 4.1 A). The conditioning cycle consisted of removing the supernatant highly enriched with phosphate at the end of the anaerobic phase and replacing it with synthetic media without phosphate, reducing the poly-P content at the end of the cycle. Figure 4.1 B shows the different stages during the conditioning cycle.

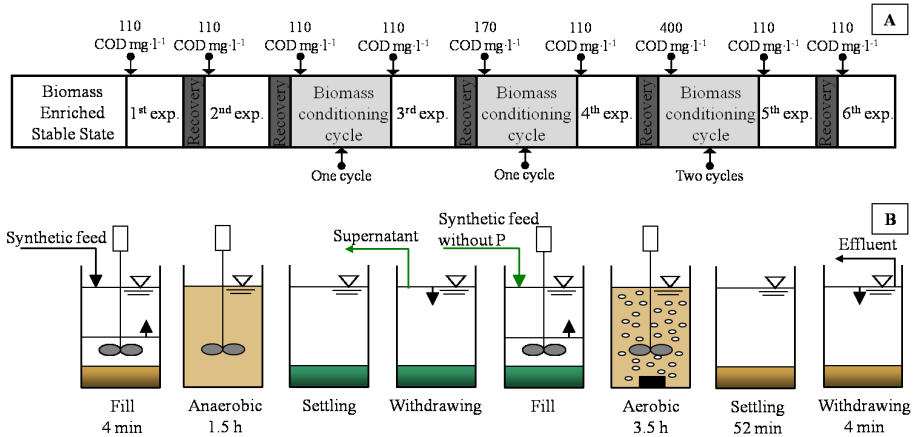


Figure 4.1: Experimental design (A) and phases of the biomass conditioning cycle for removing poly-P in the SBR (B).

4.2.3 Analytical methods and microbiological techniques

VFAs were measured by the method proposed by Moosbrugger *et al.* (1992) using a Metrom 716 DMS tritino. The analyses of phosphorus, ammonia and nitrite were carried out using a Lachat QuikChem800 flow injection analyzer. COD, P_T, TSS and VSS were performed in accordance with Standard Methods (Eaton *et al.*, 2005). PHA was analyzed by the method proposed by Oehmen *et al.* (2005). For the determination of glycogen, 30 mg of biomass was mixed with 4 ml of a 0.6 M hydrochloric acid solution kept in a capped tube for 2 h at 100 °C. The resulting solution was centrifuged at 2600xg for 10 min. The glucose concentration in the solution was determined using a commercial enzymatic kit (GAHK20-1 KT SigmaAldrich).

FISH was performed to study the population dynamics of PAOs (including Type I and Type II *Accumulibacter*) and GAOs in the reactor. Cell hybridization was performed as described by Amann *et al.* (1990). The rRNA oligonucleotide probes used for FISH are listed in table 4.1. Some probe associations were made for covering the adequate ranges: PAOm_{ix} (PAO462, PAO651, PAO846), DEFm_{ix} (TFO_DF218, TFO_DF618), DEF2m_{ix} (DF1020, DF988, H966, H1038) and EUB-

mix (EUB338, EUB338 II, and EUB338 III). All probes were used at a 35 % formamide concentration. Hybridized cells were enumerated by means of capturing images with a confocal microscope Leica TCS SP (for PAO Types I and II signal over EUBmix probe), and with an epifluorescence microscope Leica DM2500 and a Leica DFC420c digital camera (for PAOmix, GB, DEFmix and DEF2-mix signals over EUBmix signal), using the Matlab software for image analysis. A minimum of 20 randomly chosen microscopic fields were quantified from each sample. Each of the images was examined to determine the optimum threshold values for each fluorochrome. The countable pixel area of the specific probe-fluorochrome signal (Type I and Type II PAO, PAOmix, GB, DEFmix or DEF2mix probes) was expressed as a mean percentage of the pixel area count from the EUBmix probe signal. Error of the quantification was calculated by dividing the standard deviation by the square root of “n”, where “n” is the number of fields examined.

Table 4.1: Oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Sequence (5' → 3')	Specificity	Reference
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomyceetes</i>	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	
PAO 462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	<i>Rhodocyclus tenuis</i> sub-group	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
PAO 651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>	
PAO 846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	<i>Rhodocyclus tenuis</i> sub-group	
Acc-I-444	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	Clade IA and other Type I clades	Flowers <i>et al.</i> (2009)
Acc-II-444	CCCGTGCAATTTCTTCCCC		
GB	CGATCTCTAGCCCACT	<i>Gammaproteobacterial</i> GAO group	Kong <i>et al.</i> (2002)
TFO_DF218	GAAGCCTTTGCCCTCAG	<i>Deftuviicoccus</i> -related (cluster 1)	Wong <i>et al.</i> (2004)
TFO_DF618	GCCTCACTTGTCTAACCG	<i>Deftuviicoccus</i> -related (cluster 1)	
DF1020	CCGGCCGAACCGACTCCC	<i>Deftuviicoccus</i> -related (cluster 2)	Meyer <i>et al.</i> (2006)
DF988	GATACGACGCCATGTCAAGGG	<i>Deftuviicoccus</i> -related (cluster 2)	
H966	CTGGTAAGGTTCTGCGGTTGC	DF988 helper	
H1038	AGCAGCCATGCAGCACCTGTGTGGCGT	DF988 helper	

4.3 Results and discussion

The SBR was working in steady state and performing $> 99\%$ phosphorus removal when the batch experiments were carried out. The monitoring of the ratio $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ (Equation 4.1) provides valuable information for the EBPR process, because the amount of phosphorus released is highly related to the conductivity increase during the anaerobic stage (Aguado *et al.*, 2006). The conductivity monitoring has facilitated the operation of the SBR, and has permitted the detection of steady state conditions. Figure 4.2 shows a period (A) where the ratio $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ increased with time until it stabilized, which corresponds to stable phosphorus release conditions (P_{release}). In period (B), experiments were carried out under steady state conditions as indicated by the conductivity measurements. In the 4th and 5th experiments, it is observed that the ratio $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ decreased considerably, pointing out that there was a reduction of the poly-P content. All the experiments were carried out when the system recovered the initial conditions of phosphorus release. Figure 4.2 also shows that the value of pH at the beginning of the anaerobic phase was kept around 7.5 throughout the study. This pH value favors PAOs growth over GAOs (Filipe *et al.*, 2001c).

$$\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS} = (\text{final conductivity} - \text{initial conductivity})_{\text{anaerobic stage}}/\text{VSS} \quad (4.1)$$

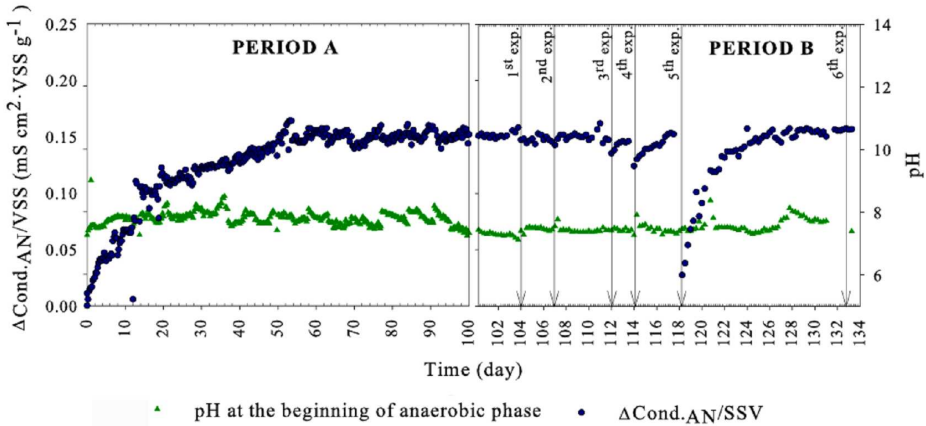


Figure 4.2: Monitoring of $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ and initial pH of the anaerobic phase. A: start up period, B: experimental period.

As previously indicated, the 1st and the 2nd experiments were carried out at the same operational conditions in order to characterize the steady state. The results were similar in both experiments. Figure 4.3 shows the evolution of HAC, GLY, PHA (including PHB and PHV) and phosphate in the 2nd experiment. During the anaerobic phase the HAC was fully taken up. Degradation of glycogen and

accumulation of PHA took place during the anaerobic phase. PHB was 95 % of all the PHA, a small amount of PHV was produced and the PH2MV production was not observed. This composition is usually observed in similar phosphorus removal systems fed with acetate (Oehmen *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). The stoichiometry obtained in the anaerobic phase from the 1st and 2nd experiments is summarized in table 4.2. During the aerobic phase, PHA was degraded forming glycogen, and phosphorus in the supernatant was totally eliminated.

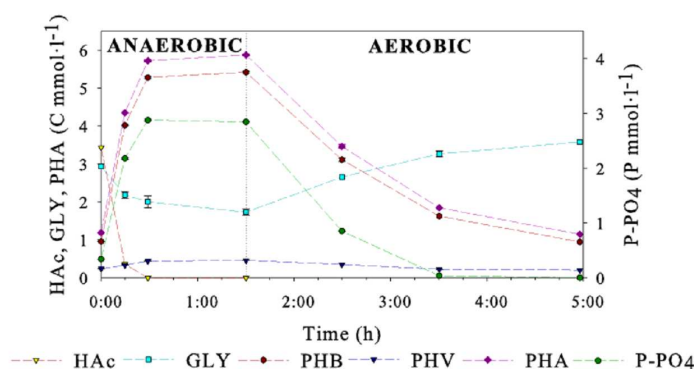


Figure 4.3: Evolution of carbon sources and phosphorus during the 2nd experiment. Each value is represented including its standard deviation.

The 3rd, 4th and 5th experiments were carried out under low intracellular poly-P content (see table 4.3). The measured results under these conditions are shown in table 4.4. The amount of phosphate released in the anaerobic phase decreased in each experiment from 2.28 Pmmol/l in the 3rd experiment to 0.23 Pmmol/l in the 5th experiment. These results indicated that the poly-P stored in PAOs was gradually decreasing in the biomass. HAc was fully taken up in the 3rd and 4th experiments; while in the 5th experiment, the HAc was not completely taken up in the anaerobic phase. The degradation of glycogen increased in each experiment from 2.02 Cmmol/l in the 3rd experiment to 2.98 Cmmol/l in the 5th experiment. The PHA accumulated in the anaerobic phase increased from 4.00 Cmmol/l in the 3rd experiment to 5.53 Cmmol/l in the 5th experiment. The experimental stoichiometry in the anaerobic phase for the experiments 3, 4 and 5 is shown in table 4.2.

The 6th experiment was carried out when the system was recovered after performing the experiments with low content of poly-P. With this study it was intended to clarify whether the system would reproduce similar features to those observed in experiments 1 and 2. This hypothesis was confirmed. As can be observed in figure 4.4 D, the HAc was fully consumed and the evolution of carbon and phosphorus was similar to that shown in the 1st and 2nd experiments. Stoichiometric values

Table 4.2: Stoichiometric parameters observed in this study and proposed in literature, for processes that use acetate as C source.

	$P_{rel}/$ HAc_{upt}^a	$Gly_{degrad}/$ HAc_{upt}^b	Anaerobic			Aerobic	
			$PHA_{synt}/$ HAc_{upt}^b	$PHB_{synt}/$ HAc_{upt}^b	$PHV_{synt}/$ HAc_{upt}^b	$Gly_{form}/$ PHA_{degrad}^b	$P_{upt}/$ PHA_{degrad}^a
This study PAO							
1st	0.70	0.38	1.36	1.31	0.05	— ^c	— ^c
2nd	0.73	0.35	1.36	1.30	0.06	0.39	0.60
3rd	0.66	0.51	1.46	1.37	0.09	0.48	0.47
4th	0.50	0.66	1.61	1.53	0.08	0.55	0.37
5th	0.08	1.08	2.02	1.74	0.28	0.61	0.10
6th	0.67	0.35	1.31	1.20	0.10	0.45	0.71
PAO metabolic models							
Comeau <i>et al.</i> (1986) and Wentzel <i>et al.</i> (1986)	0.50	-	0.89	0.89	-		
Smolders <i>et al.</i> (1994)	0.50 ^d	0.50	1.33	1.33	0.00	0.42	0.41
Pereira <i>et al.</i> (1996)	0.16	0.70	1.48	1.02	0.46		
Hesselmann <i>et al.</i> (2000)	0.37	0.61	1.40	1.11	0.29		
Experimental studies PAO							
Smolders <i>et al.</i> (1995)	0.48	0.34	1.30	1.20	0.14		
Kisoglu <i>et al.</i> (2000)	0.80	0.31	0.83	-	-		
Filipe <i>et al.</i> (2001c)	0.57	0.50	1.28	1.13	0.15		
Jeon <i>et al.</i> (2001)		0.45	1.75	1.40	0.27		
Yagci <i>et al.</i> (2003)		0.48	1.23	1.08	0.12		
Oehmen <i>et al.</i> (2005)		0.60	1.58	1.31	0.26		
Lu <i>et al.</i> (2006)		0.46	1.25	1.18	0.07		
Zhou <i>et al.</i> (2008)		0.45	1.22	1.15	0.07		
GAO metabolic models							
Satoh <i>et al.</i> (1994)	0.00	1.25	1.96	1.33	0.63		
Zeng <i>et al.</i> (2003)	0.00	1.12	1.86	1.36	0.46	0.65	0.00
Experimental studies GAO							
Liu <i>et al.</i> (1994)	0.01	1.20	1.51	1.10	0.41		
Jeon <i>et al.</i> (2001)	0.02	1.21	2.04	1.50	0.49		
Filipe <i>et al.</i> (2001a)	0.02	0.92	1.53	1.20	0.33		
Oehmen <i>et al.</i> (2005)		1.17	1.83	1.30	0.54		

^a Units Pmmol-Cmmol⁻¹

^b Units Cmmol-Cmmol⁻¹

^c No data.

^d Calculated with pH = 7.

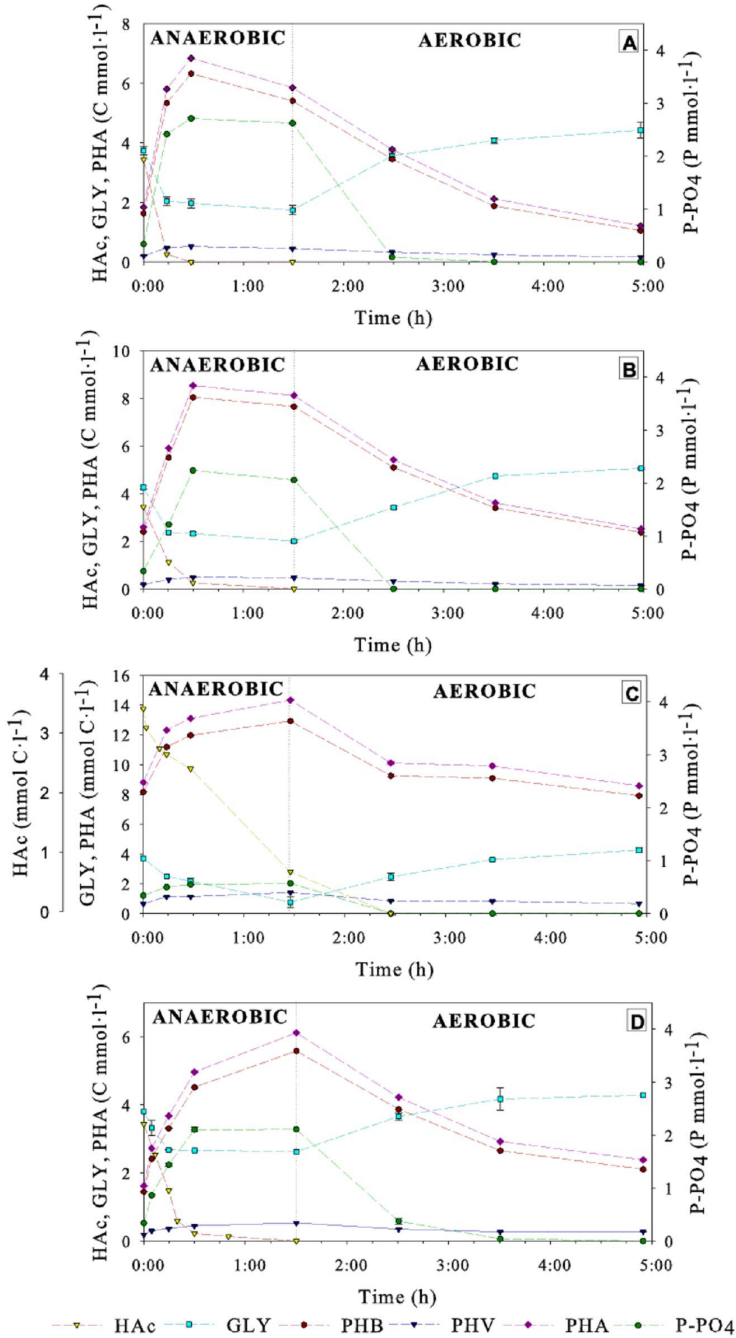


Figure 4.4: Evolution of carbon compounds and phosphorus during the 3rd (A), 4th (B), 5th (C) and 6th (D) experiment.

Table 4.3: Phosphorus, poly-P, TSS and VSS content in the biomass and microbiological results in all the experiments.

	Units	Experiment					
		1	2	3	4	5	6
P _T /VSS	P mg·VSS mg ⁻¹	0.3	0.32	0.21	0.09	0.03	0.25
poly-P/VSS	P mg·VSS mg ⁻¹	0.28	0.3	0.19	0.07	0.01	0.23
TSS	TSS mg l ⁻¹	2566	2262	2310	1558	1280	1560
VSS	%	45	42	46	58	92	44
Type I PAO	% ^a		66 ± 7	54 ± 9	32 ± 10	23 ± 5	73 ± 6
Type II PAO	% ^a		8 ± 3	27 ± 7	48 ± 12	36 ± 7	9 ± 6
PAO _{mix}	% ^a	88 ± 3	87 ± 2	90 ± 2	80 ± 4	86 ± 4	92 ± 1
GB + DEF _{mix} + DEF2 _{mix}	% ^a	0	0	0	0	0	0

^a Percentage of PAO_{mix} and GAOs (GB, DEF_{mix}, DEF2_{mix}) probes over the EUB_{mix} probes.

and content of poly-P obtained once the release of phosphorus was stabilized are shown in table 4.2 and table 4.3, respectively.

The poly-P content in each experiment was estimated mathematically by means of Equation 4.2. The P_T was measured at the end of the aerobic phase. We assume that at the end of the aerobic phase the P_T is the sum of poly-P and organic phosphorus (2% of VSS according to Tchobanoglous *et al.*, 1991). The results obtained are shown in table 4.3. As can be seen, the concentration of poly-P was reduced up to 98% in the 5th experiment.

$$\text{Poly-P} = P_T - 2\% \text{ VSS} \quad (4.2)$$

As will be discussed later, the FISH results showed that the biomass was highly enriched in *Accumulibacter* in all the experiments while GAOs were not detected in any of the experiments (see table 4.3).

The anaerobic metabolism of PAOs has been widely described in stoichiometric models (Comeau *et al.*, 1986; Wentzel *et al.*, 1986; Smolders *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1996; Hesselmann *et al.*, 2000) and experimental studies (Smolders *et al.*, 1995; Kisoglu *et al.*, 2000; Filipe *et al.*, 2001a; Jeon *et al.*, 2001; Yagci *et al.*, 2003; Oehmen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). The ratios of Gly_{degraded}/HAc_{uptake}, PHB_{synthesized}/HAc_{uptake} and PHV_{synthesized}/HAc_{uptake} obtained by these authors are shown in table 4.2. Also included in this table are the ratios proposed in literature for GAO enriched populations.

Under anaerobic conditions, PAOs release phosphate due to the hydrolysis of intracellular poly-P to obtain ATP and metabolize the HAc, while GAOs use glycolysis for the same purpose. For this reason, the P_{release}/HAc_{uptake} ratio is often used for indicating the PAM or GAM activity at a given pH in mixed PAO-GAO cultures (Filipe *et al.*, 2001b). Values between 0.48 and 0.80 Pmmol/Cmmol for PAO-enriched cultures and from 0 to 0.02 Pmmol/Cmmol for GAO enriched cultures can be found in the literature (see table 4.2).

The results obtained in this study show that cultures enriched in PAOs (without GAOs) could present $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratios below 0.16 Pmmol/Cmmol, which are commonly associated with mixed cultures with high presence of GAOs. Figure 4.5 A shows that the $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio to decreases from 0.73 Pmmol/Cmmol to 0.08 Pmmol/Cmmol. The low values of the ratio $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ obtained are due to the low amount of poly-P available, similar results were observed in Zhou *et al.* (2008) when the anaerobically produced phosphates were washed out. Barat *et al.* (2008) observed a significant calcium phosphate precipitation, which reduces the amount of poly-P available as an energy source. However, despite the decrease of poly-P, all the HAc added in each cycle was consumed by PAOs and transformed into PHA. Therefore, these results could suggest an increase in the use of the glycolytic pathway in order to compensate for the lack of ATP formed from poly-P hydrolysis. This hypothesis is confirmed by the values obtained for the ratio $Gly_{\text{degraded}}/HAc_{\text{uptake}}$ in the different experiments of this study (Figure 4.5 B).

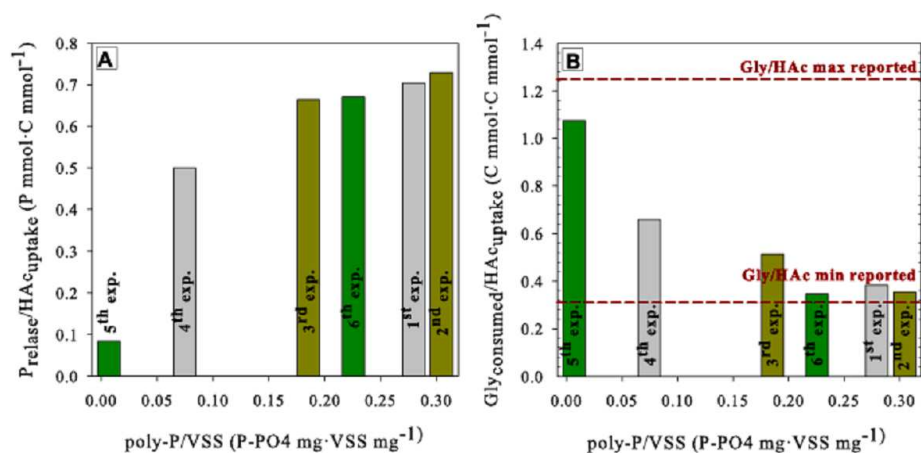


Figure 4.5: Ratios of: $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ (A) and $Gly_{\text{degraded}}/HAc_{\text{uptake}}$ (B) observed in the sludge with different amounts of poly-P.

In the literature, it can be found experimental and modeling values of the ratio $Gly_{\text{degraded}}/HAc_{\text{uptake}}$ between 0.31 and 0.5 Cmmol/Cmmol for PAOs and from 0.92 to 1.25 Cmmol/Cmmol for GAOs. In this study, using a culture enriched in PAOs, ratios of $Gly_{\text{degraded}}/HAc_{\text{uptake}}$ from 0.38 to 1.08 Cmmol/Cmmol were obtained and this ratio increased as the ratio of poly-P/VSS decreased, as can be seen in figure 4.5 B. The 5th experiment is clearly poly-P limited but HAc uptake is still observed and a $Gly_{\text{degraded}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio of 1.08 Cmmol/Cmmol was obtained. These results suggest that the energy required for the uptake of the HAc is not only derived from the poly-P degradation, but also from the glycogen degradation. The low amount of glycogen at the end of the anaerobic phase

could have caused HAC not to be completely taken up during the anaerobic phase (Figure 4.4 C).

The shift from PAM to GAM was also observed in the higher production of PHA as shown in figure 4.6. These results could be due to the increase in the use of the glycolytic pathway previously commented. The increase in the glycogen degradation to supply the extra energy implies a higher production of reducing equivalents and acetyl-CoA that will be reduced, resulting in more PHA production. Therefore, the increase of the glycolysis activity causes an increase of the amount of PHA produced. Furthermore, an important variation on the PHA composition was also observed as the poly-P availability decreased. The ratios of $\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ varied from 0.05 Cmmol/Cmmol in the 2nd experiment to 0.28 Cmmol/Cmmol in the 5th experiment. These results suggest that the PHV is obtained through propionyl-CoA produced by consuming excess reducing equivalents through pyruvate-succinate-propionate to balance the internal NADH. This is in accordance with the GAO metabolism.

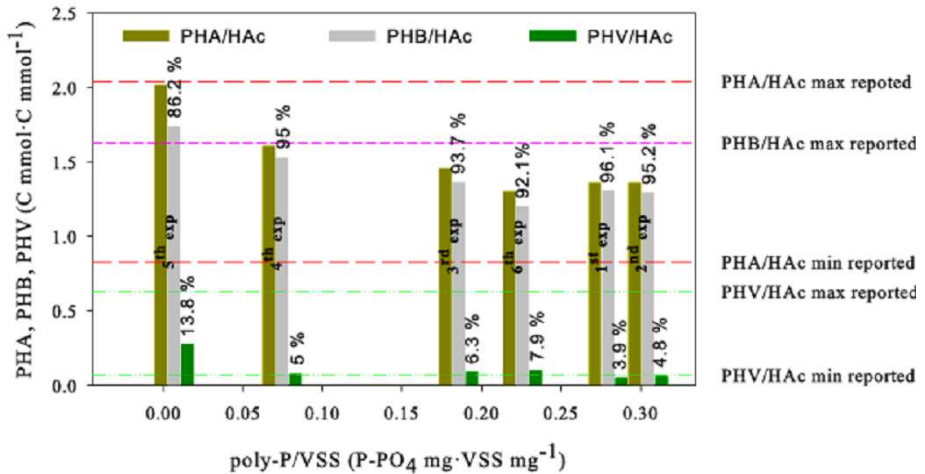


Figure 4.6: Experimental values obtained for the ratios $\text{PHA}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$, $\text{PHB}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ and $\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ at different amounts of intracellular poly-P.

It can be clearly noticed that the anaerobic ratios obtained in this study in the 1st, 2nd, 3rd and 6th experiment are within the ranges described in literature for PAO metabolism. However, in the 5th experiment, where the available poly-P was limited, the ratios obtained were close to those obtained for GAO metabolism (Table 4.2). The ratios obtained in 4th experiment are not in the range of PAO or GAO metabolisms but between them. Therefore, this 4th experiment can be described as a transition behavior between PAM and GAM.

The aerobic ratio $\text{Gly}_{\text{synthesis}}/\text{PHA}_{\text{degraded}}$ was also studied. For experiments 2, 3 and 6, the ratios obtained were between 0.38 and 0.48 Cmmol/Cmmol, which are similar to the values reported by Smolders *et al.* (1994) for PAO-enriched cultures (see table 4.2). However, in the 5th experiment the ratio $\text{Gly}_{\text{synthesis}}/\text{PHA}_{\text{degraded}}$ obtained was 0.61 Cmmol/Cmmol, which is similar to the ratio obtained by Zeng *et al.* (2003) for GAO enriched cultures. The $\text{Gly}_{\text{synthesis}}/\text{PHA}_{\text{degraded}}$ ratio obtained in the 4th experiment was between the values for PAO and GAO cultures reported in literature (Table 4.2). These results point out that the metabolic shift from PAM to GAM can be observed not only in the anaerobic phase but also in the aerobic phase. This metabolic change could be due the low phosphate concentration available during the aerobic phase.

As previously pointed out, FISH results showed that the biomass was highly enriched in *Accumulibacter* in all the experiments (Table 4.3). *Competibacter*, *Defluviicoccus*-cluster 1 and *Defluviicoccus*-cluster 2 were not detected in any of the experiments. However, there was an interesting change in the population dynamics of *Accumulibacter* species. In this study, it was observed the presence of two types of PAOs: Type I and Type II (Carvalho *et al.*, 2007). Notice also that, meanwhile in most of the experiments sum of both type of PAOs was close to the total amount of *Accumulibacter* detected with the PAOMix probe, the 5th experiment does not follow this trend. In this experiment there is a discrepancy that could be due to a partial growth of other PAO clades not included in the probes used in this study. It was observed that *Accumulibacter* Type I dominated the biomass when PAOs were highly enriched with poly-P. By decreasing the poly-P content, a shift in the population was observed: Type I PAO decreased while Type II PAO increased (Figure 4.7). Another important aspect to pay attention is that this population change between PAOs Type I and II took place within few operational cycles. For example, it was observed a clear increase in PAO Type II and a decrease in PAO Type I from experiment 2 to experiment 3. However, the difference between both experiments is that experiment 2 was performed at steady state in a highly enriched PAO culture with high poly-P content (0.3 Pg/VSSg) and experiment 3 was performed after one conditioning cycle in which poly-P content was reduced until 0.19 Pg/VSSg. Therefore, the FISH analysis confirms that only two cycles at low poly-P (the conditioning cycle plus the experiment cycle) are enough to significantly change the PAO population between experiment 2 and experiment 3. This trend is repeated along the experiments and, in the last experiment (experiment 6 carried out once the PAOs recovered the poly-P: 0.27 Pg/VSSg) it was observed that the PAOs distribution reverted to the population observed in the first experiments once the system was enriched again with poly-P. This work shows that not only does nitrate and anoxic phase length affect the Type I to Type II ratio (Oehmen *et al.*, 2010), but also the polyphosphate content and GAO-like metabolism influences this competition between different PAO Types. These results could explain why in some cases PAO cannot switch to a GAO-like

metabolism and other times they can (Brdjanovic *et al.*, 1998; López-Vázquez *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

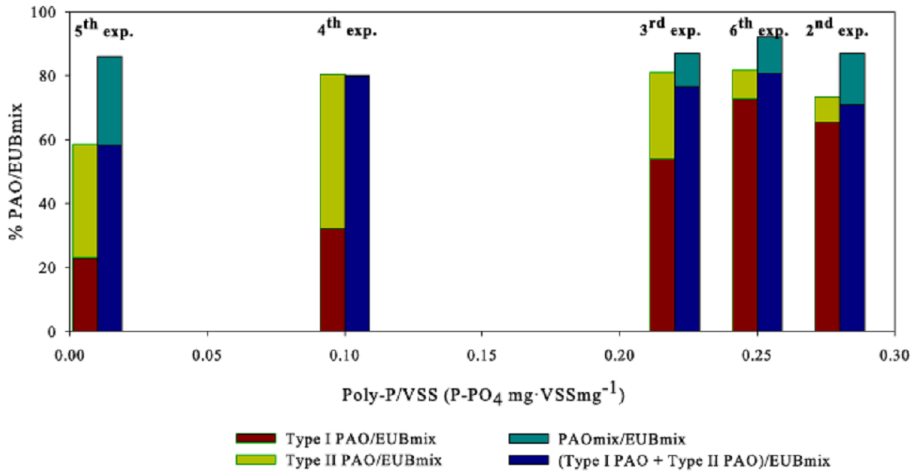


Figure 4.7: PAOs population dynamics: PAOmix, PAO Type I and PAO Type II.

PAOs and GAOs are different organisms; however, this research proved that similar metabolic behaviors can be observed when PAOs have low concentrations of poly-P, suggesting that both organisms use similar metabolic pathways. Figure 4.8 shows a scheme of PAO metabolism as proposed by different authors. PAOs use mainly glycolysis for the production of NADH. However, when they are low in poly-P, glycolysis is used to produce the ATP needed to take up HAc and synthesize PHA. It is possible that the use of the glycolytic pathway to supply the needs of ATP generates an excess of NADH. This NADH is used for the transformation of acetyl-CoA and propionyl-CoA to PHA, which comprises monomeric units of HV (hydroxyvalerate), 3H2MB (3-hydroxy-2-methylbutyrate) and 3H2MV (3-hydroxy-2-methylvalerate). The production of propionyl-CoA is carried out by the succinate-propionate pathway as suggested by Hesselmann *et al.* (2000), also consuming NADH. This scheme may represent the potential metabolic pathways that PAOs follow when their metabolic shift occurs.

The present research confirmed a metabolic change of a PAO-enriched culture at the macroscopic level, as other authors have observed under different operational conditions (Barat *et al.*, 2006; Barat *et al.*, 2008; Erdal *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). It was also observed, at the microscopic level, a population shift between PAO Type I and PAO Type II. These results suggest that PAO Type II have a greater ability to adapt to changes in poly-P storage conditions, possibly because they are able to use different metabolic pathways. However, it is not clear whether the metabolic change is due to a population shift in the biomass, or that PAO Type II are able to change their metabolism from PAM to GAM when they have

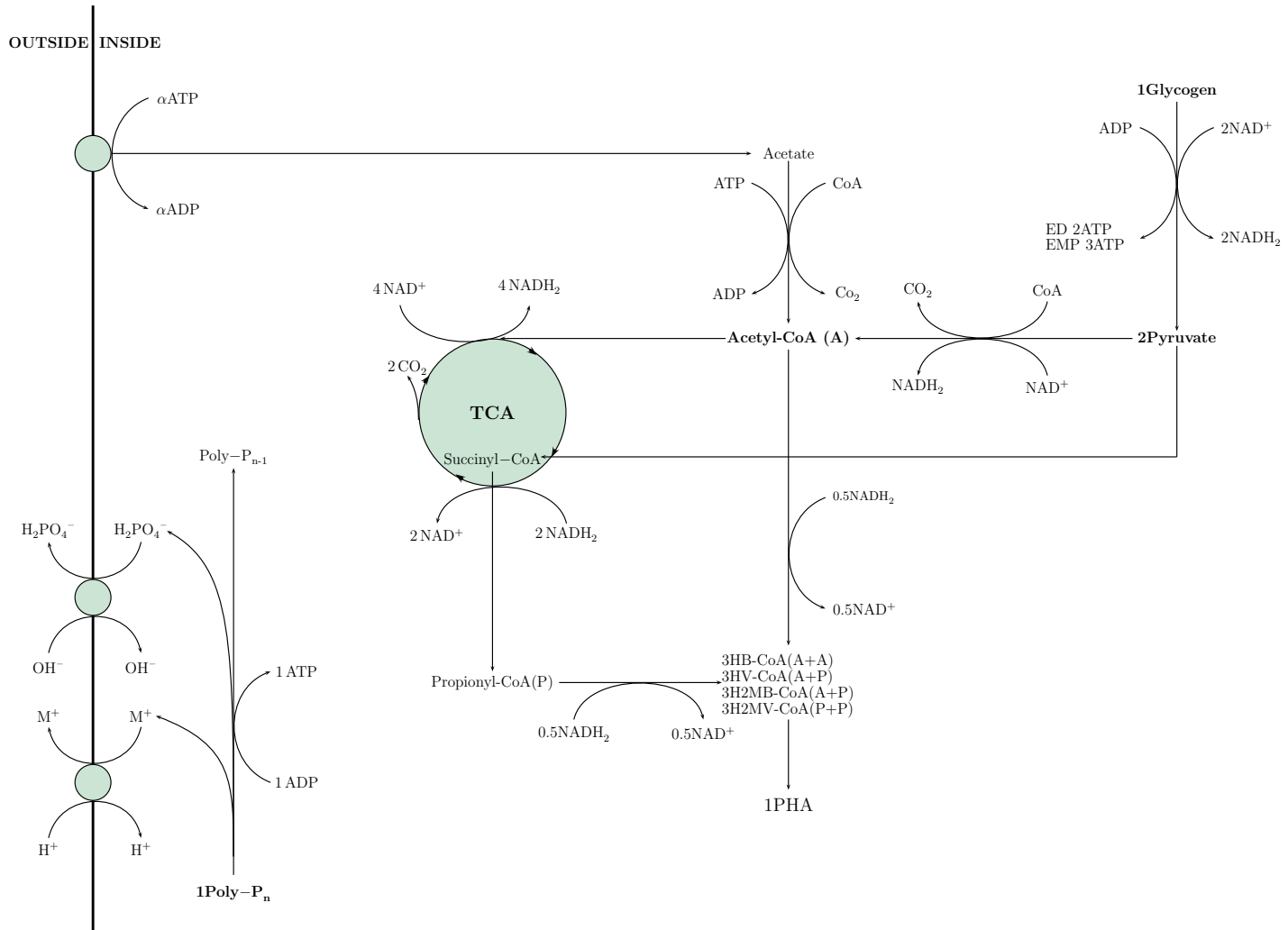


Figure 4.8: Schematic anaerobic metabolism for PAOs (Hesselmann *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009)

a low internal poly-P content, whereas Type I are unable to use the glycolytic and succinate-propionate pathways as efficiently. For this reason, future research is needed to study both PAOs (Type I and II) metabolism and its behavior at long term experiments under low poly-P content.

4.4 Conclusions

At a macroscopic level, the anaerobic and aerobic stoichiometric ratios of a biomass enriched in *Accumulibacter* presented a metabolic shift from PAM to GAM as the poly-P was gradually decreased and from GAM to PAM when the poly-P was recovered. The results observed showed that the decrease of poly-P stimulate an increase in the use of the glycolytic pathway in order to compensate for the lack of ATP formed from poly-P hydrolysis. The shift from PAM to GAM was also observed in the higher production of PHA due to the increase in the use of the glycolytic pathway. Furthermore, an important variation on the PHA composition ($\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$) was also observed as the poly-P availability decreased. These results suggest that the PHV is obtained by consuming excess reducing equivalents through the pyruvate-succinate-propionate pathway to balance the internal NADH, which is in accordance with the GAO metabolism.

At a microscopic level, FISH analyses revealed that *Accumulibacter* Type I dominated the biomass when PAOs were highly enriched with poly-P and that the population changed to *Accumulibacter* Type II when the poly-P was gradually decreased. These results suggest that Type II PAOs have a greater ability to adapt to changes in poly-P storage conditions, possibly because they are able to use different metabolic pathways, whereas Type I are unable to use the glycolytic and succinate-propionate pathways as efficiently. Furthermore, it was observed a shift from PAO Type II to PAO Type I when the poly-P was recovered. These observations suggested that not only does nitrate and anoxic phase length affect the PAO Type I to PAO Type II ratio, but also the polyphosphate content and GAO-like metabolism influences this competition between different PAO Types.

Acknowledgements

This research work has been supported by the Generalitat Valenciana (GVPRE/2008/044) and the Polytechnic University of Valencia (PAID-06-08-3227), which are gratefully acknowledged. Special acknowledgements to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Mexico (CONACYT) No. 207966. Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal is acknowledged through projects PTDC/AAC-AMB/120581/2011 and PEst-C/EQB/LA0006/2006.

References

- Aguado, D., T. Montoya, J. Ferrer, and A. Seco (2006). "Relating ions concentration variations to conductivity variations in a sequencing batch reactor operated for enhanced biological phosphorus removal". In: *Environmental Modelling & Software* 21.6, pp. 845–851 (cit. on p. 65).
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations". In: *Applied and Environmental Microbiology* 56.6, pp. 1919–1925 (cit. on pp. 63, 64).
- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, A. Seco, and J. Ferrer (2006). "Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal". In: *Water Science and Technology* 53.12, pp. 29–37 (cit. on pp. 61, 73).
- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, J. Ferrer, and A. Seco (2008). "Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism". In: *Water Research* 42.13, pp. 3415–3424 (cit. on pp. 61, 62, 70, 73).
- Bond, P.L., R. Erhart, M. Wagner, J. Keller, and L.L. Blackall (1999). "Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems". In: *Applied and Environmental Microbiology* 65.9, pp. 4077–4084 (cit. on p. 62).
- Brdjanovic, D., S. Logemann, M.C.M. van Loosdrecht, C. Hooijmans, G.J. Alaerts, and J.J. Heijnen (1998). "Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies". In: *Water Research* 32.4, pp. 1035–1048 (cit. on p. 73).
- Carvalho, G., P.C. Lemos, A. Oehmen, and M.A.M. Reis (2007). "Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure". In: *Water Research* 41.19, pp. 4383–4396 (cit. on pp. 61, 72).
- Comeau, Y., K.J. Hall, R.E.W. Hancock, and W.K. Oldham (1986). "Biochemical-model for enhanced biological phosphorus removal". In: *Water Research* 20, pp. 1511–1521 (cit. on pp. 60, 67, 69).
- Crocetti, G.R., P. Hugenholtz, P.L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L.L. Blackall (2000). "Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and design of 16 rRNA-directed probes for their detection and quantification". In: *Applied and Environmental Microbiology* 66, pp. 1175–1182 (cit. on p. 64).
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K-H. Schleifer, and M. Wagner (1999). "The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set". In: *Systematic and Applied Microbiology* 22, pp. 434–444 (cit. on p. 64).
- Eaton, A.D. and M.A.H. Franson, eds. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. APHA (American Public Health Association). American Public Health Association (cit. on p. 63).

- Erdal, U.G., Z.K. Erdal, G.T. Daigger, and C.W. Randall (2008). "Is it PAO-GAO competition or metabolic shift in EBPR system? Evidence from an experimental study". In: *Water science and technology* 58.6, pp. 1329–34 (cit. on pp. 61, 73).
- Erdal, Z.K., U.G. Erdal, and C.W. Randall (2005). "Biochemistry of enhanced biological phosphorus removal and anaerobic COD stabilization". In: *Water Science & Technology* 52.10-11, pp. 557–567 (cit. on p. 60).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001a). "A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH". In: *Biotechnology and Bioengineering* 76, pp. 17–31 (cit. on pp. 67, 69).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001b). "Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms". In: *Water Environmental Research* 73, pp. 213–222 (cit. on pp. 62, 69).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001c). "pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms". In: *Water Environmental Research* 73.2, pp. 223–232 (cit. on pp. 62, 65, 67).
- Flowers, J.J., S. He, S. Yilmaz, D.R. Noguera, and K.D. McMahon (2009). "Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different *Candidatus Accumulibacter* clades". In: *Environmental Microbiology Reports* 1.6, pp. 583–588 (cit. on pp. 61, 64).
- Hesselmann, R.P.X., R. Von Rummel, S.M. Resnickm, R. Hany, and A.J.B. Zehnder (2000). "Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal". In: *Water Research*. 34, pp. 3487–3494 (cit. on pp. 60, 67, 69, 73, 74).
- Jeon, C.O., D.S. Lee, M.W. Lee, and J.M. Park (2001). "Enhanced biological phosphorus removal in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor: effect of pH". In: *Water Environmental Research*. 73, pp. 301–306 (cit. on pp. 67, 69).
- Kisoglu, Z., U. Erdal, and C.W. Randall (2000). "The effect of CODTP ratio on intracellular storage materials, system performance and kinetic parameters in a BNR system". In: *Proceedings of the 73rd annual Water Environment Federation Technical Exposition and Conference*. Anaheim, California (cit. on pp. 67, 69).
- Kong, Y.H., S.L. Ong, W.J. Ng, and W.T. Liu (2002). "Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacteria group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes". In: *Environmental Microbiology* 11, pp. 753–757 (cit. on p. 64).
- Lemos, P.C., C. Viana, E.N. Salguero, A.M. Ramos, J.P.S.G. Crespo, and M.A.M. Reis (1998). "Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture". In: *Enzyme Microbial Technology* 22, pp. 662–671 (cit. on p. 60).
- Liu, W-T., T. Mino, T. Matsuo, and K. Nakamura (1996). "Biological phosphorus removal processes - Effect of pH on anaerobic substrate metabolism". In: *Water Science and Technology* 34.1-2. Water Quality International '96 Part 1:

- Nutrient Removal Selected Proceedings of the 18th Biennial Conference of the International Association on Water Quality, pp. 25–32 (cit. on p. 62).
- Liu, W.T., T. Mino, K. Nakamura, and T. Matsuo (1994). “Role of glycogen in acetate uptake and polyhydroxyalkanoate synthesis in anaerobic-aerobic activated sludge with a minimized polyphosphate content”. In: *Journal of fermentation and bioengineering* 77, pp. 535–540 (cit. on p. 67).
- López-Vázquez, C.M., C.M. Hooijmans, D. Brdjanovic, H.J. Gijzen, and M.C.M. van Loosdrecht (2008). “Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands”. In: *Water Research* 42.10-11, pp. 2349–2360 (cit. on p. 73).
- Lu, H., A. Oehmen, B. Virdis, J. Keller, and Z. Yuan (2006). “Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter* phosphates through alternating carbon sources”. In: *Water Research* 40.20, pp. 3838–3848 (cit. on pp. 67, 69).
- Martín, H.G., N. Ivanova, V. Kumin, F. Warnecke, K.W. Barry, C. McHardy A.C. and Yeates, S. He, A.A. Salamov, E. Szeto, E. Dalin, N.H. Putnam, H.J. Shapiro, Pangilinan J.L., I. Rigoutsos, N.C. Kyrpides, L.L. Blackall, K.D. McMahon, and P. Hugenholtz (2006). “Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities”. In: *Nature Biotechnology* 24, pp. 1263–1269 (cit. on pp. 60, 74).
- Meyer, R.L., A.M. Saunders, and L.L. Blackall (2006). “Putative glycogen accumulating organisms belonging to Alphaproteobacteria identified through rRNA-based stable isotope probing”. In: *Microbiology*. 152, pp. 419–429 (cit. on p. 64).
- Mino, T., V. Arun, Y. Tsuzuki, and T. Matsuo (1987). “Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphate removal processes”. In: *Advances in Water Pollution Control: Biological Phosphate Removal from Wastewater*. Oxford: Pergamon Press, pp. 27–38 (cit. on p. 60).
- Mino, T., M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1998). “Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process”. In: *Water Research* 32.11, pp. 3193–3207 (cit. on p. 62).
- Moosbrugger, R.E., M.C. Wentzel, G.A. Ekama, and G.v.R. Marais (1992). *Simple Titration Procedures to determine H₂CO₃ alkalinity and short-chain fatty Acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acids/bases*. Tech. rep. TT 57/93. UCT (cit. on p. 63).
- Oehmen, A., Z. Yuan, L.L. Blackall, and J. Keller (2005). “Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 91, pp. 162–168 (cit. on pp. 63, 67, 69).
- Oehmen, A., P.C. Lemos, G. Carvalho, Z.G. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, and M.A.M. Reis (2007). “Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale”. In: *Water Research* 41.11, pp. 2271–2300 (cit. on pp. 60, 62, 66).
- Oehmen, A., G. Carvalho, C.M. Lopez-Vazquez, M.C.M. van Loosdrecht, and M.A.M. Reis (2010). “Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating or-

- ganisms". In: *Water Research* 44.17. Microbial ecology of drinking water and waste water treatment processes, pp. 4992–5004 (cit. on p. 72).
- Pereira, H., P.C. Lemos, M.A.M. Reis, J.P.S.G. Crespo, M.J.T. Carrondo, and H. Santos (1996). "Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on in vivo¹³C-NMR labelling experiments". In: *Water Research* 30.9, pp. 2128–2138 (cit. on pp. 60, 67, 69).
- Reis, M.A.M., L.S. Serafim, P.C. Lemos, A.M. Ramos, F.R. Aguiar, and M.C.M. van Loosdrecht (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures". In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25.6, pp. 377–385 (cit. on p. 74).
- Satoh, H., T. Mino, and T. Matsuo (1994). "Deterioration of enhanced biological phosphorus removal by the domination of microorganisms without polyphosphate accumulation". In: *Water Science Technology* 30, pp. 203–211 (cit. on p. 67).
- Schuler, A.J. and D. Jenkins (2003a). "Enhanced Biological Phosphorus Removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, Part II: anaerobic adenosine triphosphate utilization and acetate uptake rates". In: *Water Environment Research* 75.6, pp. 499–511 (cit. on pp. 60, 61).
- Schuler, A.J. and D. Jenkins (2003b). "Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, Part III: Anaerobic sources of reducing equivalents". In: *Water Environmental Research* 75.6, pp. 512–522 (cit. on p. 60).
- Smolders, G.J.F., J.M. Klop, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1995). "A metabolic model of the biological phosphorus removal process: I. Effect of the sludge retention time". In: *Biotechnology and Bioengineering* 48.3, pp. 222–233 (cit. on pp. 67, 69).
- Smolders, G.J.F., J. Vandermeij, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1994). "Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence". In: *Biotechnology and Bioengineering* 43, pp. 461–470 (cit. on pp. 60, 62, 67, 69, 72).
- Tchobanoglous, G. and F.L. Burton (1991). *Wastewater Engineering: Treatment disposal and reuse*. Wastewater Engineering. New York: Metcalf and Eddy Incorporated (cit. on p. 69).
- Wentzel, M.C., L.H. Lotter, R.E. Loewenthal, and G.v.R. Marais (1986). "Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal—a biochemical model". In: *Water SA* 12, pp. 209–224 (cit. on pp. 60, 67, 69).
- Wong, M.T., F.M. Tan, W.J. Ng, and W.T. Liu (2004). "Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes". In: *Microbiology* 150, pp. 3741–3748 (cit. on p. 64).
- Yagci, N., N. Artan, E.w.U. Cokgor, C.W. Randall, and D. Orhon (2003). "Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate-and glycogen accumulating organisms under anaerobic conditions". In: *Biotechnology and Bioengineering* 84.3, pp. 359–373 (cit. on pp. 67, 69).

- Zeng, R. J., Z. Yuan, and J. Keller (2003). “Model-based analysis of anaerobic acetate uptake by a mixed culture of polyphosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 83.3, pp. 293–302 (cit. on pp. 67, 72).
- Zhou, Y., M. Pijuan, R.J. Zeng, L. Huabing, and Z. Yuan (2008). “Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)?” In: *Water Research* 42, pp. 2361–2368 (cit. on pp. 61, 66, 67, 69, 70, 73).
- Zhou, Y., M. Pijuan, R.J. Zeng, and Z. Yuan (2009). “Involvement of the TCA cycle in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs)”. In: *Water Research* 43.5, pp. 1330–1340 (cit. on pp. 60, 66, 74).

Chapter 5

Long term study of PAO metabolic behaviour under negligible Poly-P reserves

B. Acevedo^a, M. Murgui^b, Borrás^b, R. Barat^{a1}

^a Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022. Valencia. Spain (e-mail: breacju@posgrado.upv.es, momurmez@cam.upv.es, rababa@dihma.upv.es)

^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia. Doctor Moliner, 50. 46100 – Burjassot. Valencia. Spain (e-mail: luis-borras-falomir@uv.es)

ABSTRACT

In a previous study the authors confirmed the ability of PAOs to perform GAO metabolism in short-term experiments. However, what happens when PAOs are exposed to poly-P shortage for an extended period of time? The answer to this question was the aim of this work from a macroscopic and microscopic point of view. Therefore, the poly-P was removed from a PAO enriched SBR and maintained without poly-P during three solid retention time. The PAOs were found to quickly change their metabolism to a clear GAO performance and remained without GAO colonization for the entire experimental period, even though GAO was present (around 5%) at the beginning of the experiment. Unlike the results obtained in the short-term experiments, in this case PAO Type I performed the GAO metabolism at the end of the experimental period.

¹In: Submitted Water Research

5.1 Introduction

Polyphosphate accumulating organisms (PAOs) are responsible for enhanced biological phosphorus removal (EBPR). In order to promote the growth of these organisms and consequently remove phosphorus (P), anaerobic conditions are first required, followed by aerobic or anoxic conditions. Compared with chemical phosphorus removal, the EBPR process can be a very good choice when it comes to high levels of phosphorus removal and represents an opportunity for P recovery in the WWTP. However, under certain circumstances EBPR systems may deteriorate due to factors that are not completely understood (Oehmen *et al.*, 2007). Cech *et al.* (1993) observed EBPR deterioration attributed to changes in the microbial population. These authors detected groups of Gram-negative bacilli and gram-positive cocci, usually grouped in tetrads, which accumulated glycogen but not poly-P. This group is known as glycogen accumulating organisms (GAOs) (Erdal *et al.*, 2003). It is well known that the difference between PAO and GAO is the phosphate release due to the degradation of intracellular poly-P, under anaerobic conditions and the subsequent up-take of phosphates (stored as poly-P) under aerobic/anoxic conditions. Anaerobically, both microorganisms accumulate polyhydroxyalkanoates (PHA), which is used to synthesize glycogen under aerobic/anoxic conditions.

Several studies have focused on the factors that promote the growth of PAOs over GAOs to improve the efficiency of EBPR systems. Some of these factors are: pH (Oehmen *et al.*, 2005b; Zhang *et al.*, 2007), temperature (Brdjanovic *et al.*, 1997; Erdal *et al.*, 2003), sludge retention time (Whang *et al.*, 2002), oxygen concentration (Griffiths *et al.*, 2002; Carvalheira *et al.*, 2014) and C/P ratio in the influent (Liu *et al.*, 1996; Schuler *et al.*, 2003a).

The successful identification of the organisms present in activated sludge systems requires the combination of molecular and microscopic techniques (such as phylogenetic studies of the 16sRNA gene or measurements of *ppk1* gene expression levels, fluorescence in situ hybridization (FISH) and staining of poly-P). However, the FISH technique alone can give us a good approximation of the presence and the amount of a particular organism within the biomass. The GAO population quantified by FISH can also be reflected in the chemical analysis measuring the ratio $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ and other ratios such as $Gly_{\text{degraded}}/HAc_{\text{uptake}}$, $PHA_{\text{synthesized}}/HAc_{\text{uptake}}$, and $P_{\text{uptake}}/PHA_{\text{degraded}}$. When $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio is low it is correlated with a high GAO population and low *Acumulibacter* population. Incomplete removal of phosphorus is another indicator of low quantities of PAOs and it has been suggested that the relative activity between PAOs and GAOs can be estimated by analyzing the $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio (Saunders *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2003b). Later, Barat *et al.* (2006) and Barat *et al.* (2008) using a PAO-enriched culture detected a clear effect of influent Ca concentration on the $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio. The observations revealed a drop in the

$P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio as influent Ca concentration rose, without any changes in the PAO and GAO populations.

Short-term studies have postulated that PAOs are able to behave metabolically like GAOs, showing low ratios of $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ when intracellular poly-P content is reduced. This change was firstly studied by Liu *et al.* (1997), who found that the influent P mg/C mg ratio was a key factor influencing the competition between PAO and GAO. In their study, they showed that a reduction of the ratio to 2/100 caused the depletion of the polyphosphate content in PAO, leading to a replacement by GAO. Later, Schuler *et al.* (2003a) defined the concepts of PAM and GAM to refer to the metabolisms performed by PAO and GAO respectively. They found that low P/C ratios favour GAM metabolism, but not necessarily the growth of GAO. Results related with the metabolic change from PAM to GAM were also found by other authors (Erdal *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Acevedo *et al.*, 2012). In 2013, Tian *et al.* (2013) concluded that under P-limiting conditions, PAO Type I were unable to perform GAM, but it could not be discarded that PAO Type II could switch to a GAM as a survival strategy. Recently, Welles *et al.* (2015) found similar results, showing that under P-limiting conditions, both, PAO Type I and Type II, are able to shift their metabolism from PAM to GAM, but PAO Type II are more favored because of their higher HAc uptake rate.

However, what happens when PAOs are exposed to poly-P shortage for a long time? The answer to this question was the aim of this work from both macroscopic and microscopic points of view.

5.2 Materials and methods

A laboratory scale sequencing batch reactor (SBR) with a working volume of 7 l was set to carry out the phosphorus removal process under anaerobic-aerobic conditions and four 6 h cycles per day. Each cycle consisted of five phases: a 5-min filling period; 90 min anaerobic phase; 180 min aerobic phase; 80 min settling phase and 5 min withdrawing period. Hydraulic retention time was 12 h. Biomass was taken daily from the system to keep Sludge Retention Time (SRT) around 8 days. The reactor was equipped with conductivity, ORP, pH, temperature and dissolved oxygen electrodes. The dissolved oxygen (DO) concentration in the aerobic phase was controlled between 1.5 and 2.5 O₂mg/l. Temperature was maintained at 20 ± 1 °C. pH was not controlled; the initial pH for each cycle was kept around 7.5 and ranged from 7 to 9 during the different phases of each cycle. The synthetic wastewater used consisted of two separate solutions as follows: one solution contained mineral compounds, including K₂HPO₄, and the other contained acetate and NH₄Cl (see Barat *et al.* (2008) for a detailed description). Thiourea was added to the synthetic media (20 mg/l) to inhibit nitrification. Synthetic wastewater was used with a COD/P ratio of 15 CODmg/Pmg (150 CODmg/l and 10 Pmg/l).

5.2.1 Experimental design

The SBR was seeded with sludge from a wastewater treatment plant (WWTP) in Valencia (Spain) that removes phosphorus biologically. Different parameters were monitored throughout the experimental period in order to study the long term effect of poly-P shortage over the biological process. The experimentation was divided in two periods. The Period 1 corresponds to the PAO enrichment period in order to obtain a reactor highly enriched with PAO and Period 2 corresponds to the experimental period with low poly-P concentration. The first characterization of the process (C1) took place after stabilizing and enriching the biomass with PAOs at the end of Period 1. The poly-P concentration in the reactor was then drastically reduced at the beginning of Period 2. This consisted of removing the phosphate-enriched supernatant at the end of the anaerobic phase for 3 consecutive cycles. In each of the three cycles the supernatant removed at the end of the anaerobic phase was replaced with synthetic wastewater without phosphate (for further details of the P removal cycles see section 4.2.2 p.62).

After the poly-P extraction cycles, the biological process was again characterized (C2). The reactor was fed with synthetic wastewater with a low phosphate concentration (only enough to supply P requirements as nutrient) for a long period of time (40 days, equivalent to more than 3 SRT), at the end of which a third characterization (C3) was performed. Each characterization consisted of an intensive monitoring of: HAc, phosphate, ammonium, nitrate, PHA and glycogen during one operation cycle. P_T , TSS and VSS were also measured at the end of the aerobic phase in each characterization cycle. Between C2 and C3, HAc, phosphate, ammonium, nitrate, P_T , TSS, VSS, glycogen and PHA were regularly measured at the end of the aerobic and anaerobic phases.

5.2.2 Analytical methods and microbiological techniques

VFAs were measured by the method proposed by Moosbrugger *et al.* (1992) using a Metrom 716 DMS tritino. Phosphorus, ammonia and nitrite were measured by a Lachat QuikChem800 flow injection analyzer. COD, P_T , TSS and VSS were performed in accordance with Standard Methods (Eaton *et al.*, 2005). PHA was analyzed by the method proposed by Oehmen *et al.* (2005a). Glycogen determination was analyzed as described in section 4.2.3 p.63.

Microbiological analyses were carried out using FISH to identify the specific taxonomic group of bacteria found in the system. Cell hybridization was performed as described by Amann *et al.* (1990). The rRNA oligonucleotide probes used for FISH are those described in table 4.1 p.64. Some probe associations were made for covering the adequate ranges: PAOmix (PAO462, PAO651, PAO846), DEFmix (TFO_DF218, TFO_DF618), DEF2mix (DF1020, DF988, H966, H1038) and EUBmix (EUB338, EUB338 II, and EUB338 III). All probes were used at a

35 % formamide concentration. Hybridized cells were numbered by capturing images with a Leica TCS SP confocal microscope (for PAO Types I and II signal over EUBmix probe), a Leica DM2500 epifluorescence microscope and a Leica DFC420c digital camera (for PAOmix, GB, DEFmix and DEF2-mix signals over EUBmix signal), with Matlab software for image analysis. A minimum of 20 randomly chosen microscopic fields were quantified from each sample. Each of the images was examined to determine the optimum threshold values for each fluorochrome. The countable pixel area of the specific probe-fluorochrome signal (Type I and Type II PAO, PAOmix, GB, DEFmix or DEF2mix probes) was expressed as a mean percentage of the pixel area count from the EUBmix probe signal. The quantification error was calculated by dividing the standard deviation by the square root of “n”, where “n” was the number of fields examined (Borrás, 2008).

5.3 Results and discussion

The $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ ratio is a simple indicator of PAOs activity because the amount of phosphorus released is closely related to the rise in conductivity during the anaerobic phase (Acevedo *et al.*, 2012; Aguado *et al.*, 2006). Figure 5.1 shows the $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ ratio, percentage of phosphorus removal, pH and VFA concentrations at the beginning and end of the anaerobic phase of the experiment. The two periods studied can be distinguished according to the parameters monitored: (Period 1) the PAO enrichment period in which the $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ ratio increased with time until stabilization and (Period 2) the experimental stage without poly-P.

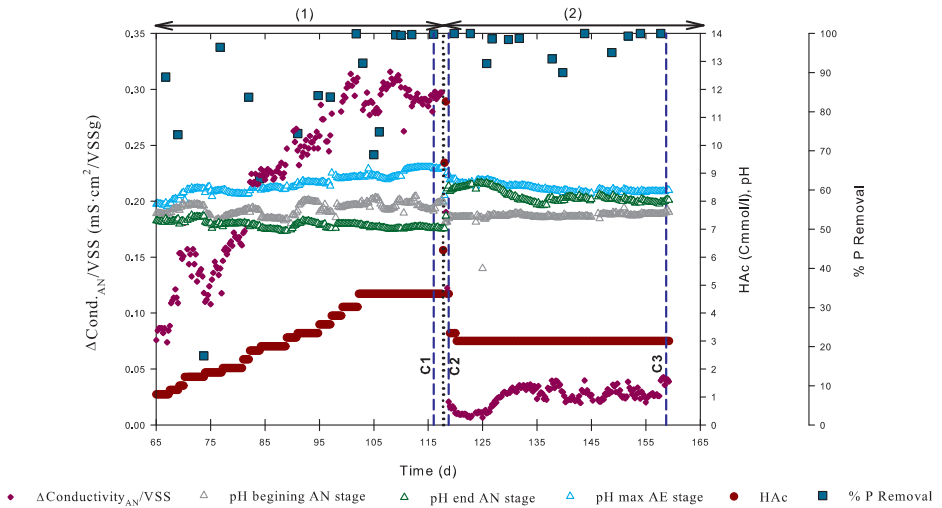


Figure 5.1: Profile of the $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ ratio, pH at the beginning and end of the anaerobic phase, pH max aerobic and VFA concentration at the beginning of the anaerobic stage.

As can be seen figure 5.1, the biological process achieved high P removal efficiencies ($> 90\%$) when the system were stabilization and during period 2. Furthermore, the pH was maintained above 7 during the whole experimental period in order to maintain pH conditions favouring PAO over GAO (Smolders *et al.*, 1994a; Liu *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 1999; Filipe *et al.*, 2001a; Filipe *et al.*, 2001b).

However, there were significant differences in the pH values at the end of the anaerobic phase between the non limited (Period 1) and limited (Period 2) poly-P periods, which could affect to the observed results regarding the population dynamics as will be discussed later. Before poly-P extraction (Period 1) the pH at the end of the anaerobic stage dropped to 7 due to the release of phosphate and its associated protons (around 3.42 Pmmol/l), inducing a significant pH decrease during the anaerobic stage. After poly-P extraction (Period 2) anaerobic phosphorus release was drastically reduced (concentrations $< 0.4 \text{ Pmmol/l}$) with no effect on pH. However, pH rose during the anaerobic phase due to acetate consumption. For a detailed description of the pH trend through one operation cycle of a SBR operated for EBPR see Serralta *et al.* (2004).

The high $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ ratio values achieved at the end of Period 1 (around $0.3 \text{ mS/cm}^2/\text{VSSg}$) indicate high phosphorus concentrations in the anaerobic phase. After poly-P extraction (Period 2), $\Delta\text{Cond}_{\text{AN}}/\text{VSS}$ values dropped drastically to $0.05 \text{ mS/cm}^2/\text{VSSg}$, indicating low phosphorus release during the anaerobic phase. Therefore, the pH variation during the anaerobic phase jointly the conductivity variation could be an indication of poly-P involvement in PAO metabolism.

The amount of poly-P was calculated mathematically by equation 5.1. P_{T} was measured at the end of the aerobic stage, when P_{T} is assumed to be the sum of poly-P and organic phosphorus. According to Metcalf (2003) around 2% of the VSS is considered organic phosphorus.

$$\text{Poly-P} = P_{\text{T}} - 2\% \text{ VSS} \quad (5.1)$$

In order to study the effect of poly-P shortage over PAO metabolism, different anaerobic ($P_{\text{release}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$, $\text{Gly}_{\text{degraded}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$, $\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$, $\text{PHB}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ and $\text{PHA}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$) and aerobic ($\text{Gly}_{\text{synthesized}}/\text{PHB}_{\text{degraded}}$ and $P_{\text{uptake}}/\text{PHB}_{\text{degraded}}$) ratios were calculated throughout the experimental period.

The first characterization (C1) was performed in the pseudo-steady state of the phosphorus removal process. In figure 5.2 (A) typical PAO phenotype profiles can be observed during the anaerobic (acetic acid uptake, phosphate release, glycogen degradation and PHA production) and aerobic (PHA degradation, glycogen synthesis and phosphate uptake) phases. Table 5.1 shows the main stoichiometric parameters of this study and the values proposed in the literature when using

acetate as carbon source. A $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio of 0.67 Pmmol/Cmmol and a poly-P content of 0.44 Pmg/VSSmg were obtained in C1. As can be seen in table 5.1, the stoichiometric ratios obtained in C1 are similar to those obtained by other authors using PAO enriched cultures. In this case the acetate uptake rate was 0.095 Cmg/h/VSSmg.

The second characterization (C2) was performed after extracting the poly-P content of the PAOs. Poly-P content was reduced from 0.44 to 0.03 Pmg/VSSmg. The cycle profiles obtained are shown in figure 5.2 (B). This poly-P extraction induced a drop in the $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio to 0.09 Pmmol/Cmmol in the anaerobic phase. These stoichiometric ratios are similar to those found in GAO enriched systems table 5.1. In the second characterization it was observed that the rate of acetic acid uptake dropped from 0.095 to 0.024 Cmg/h/VSSmg in relation to C1.

After reducing the poly-P content, phosphorus release dropped to almost zero. Figure 5.3 shows the evolution of poly-P content, total volatile and suspended solids and phosphorus in the influent. Initially the acetic acid concentration stayed around 150 CODmg/l, however, after poly-P removal some acetate began to remain at the end of the anaerobic phase. The influent acetic acid concentration was therefore reduced to 96 CODmg/l to ensure that it would be totally consumed and to avoid competition for VFA with other heterotrophic bacteria. As can be seen in figure 5.3, influent phosphate was drastically reduced after the poly-P extraction cycles and was maintained around 1 Pmg/l to ensure P nutrient requirements without significant poly-P accumulation. During this period of poly-P shortage the poly-P/VSS ratio stayed between 0.01 and 0.04 Pmg/VSSmg with a $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio of nearly 0.1 Pmmol/Cmmol.

After more than 3 SRT (40 days) with low poly-P content, the third characterization (C3) was performed (Figure 5.2 C). The $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio obtained was 0.12 Pmmol/Cmmol with a poly-P concentration of 0.04 Pmmol/VSSmg. The rate of acetic acid uptake remained low, at 0.03 Cmg/h/VSSmg.

As previously mentioned, the poly-P content of the biomass and the $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio in the supernatant decreased significantly from C1 to C2. The following changes in the anaerobic ratios were also observed (see table 5.1): $Gly_{\text{degraded}}/HAc_{\text{uptake}}$ increased from 0.34 to 0.88 Cmmol/Cmmol, $PHB_{\text{synthesized}}/HAc_{\text{uptake}}$ and $PHV_{\text{synthesized}}/HAc_{\text{uptake}}$ changed from 1.03 to 1.31 and 0.17 to 0.44 Cmmol/Cmmol respectively. It was also observed that when PAOs were enriched in poly-P, the PHB percentage was between 85 – 90 % and PHV was 10 – 15 %, while at low poly-P concentrations the PHB percentage was reduced to around 66 – 70 %, and PHV increased to 30 – 34 %. The aerobic ratios also showed changes: the $P_{\text{uptake}}/PHB_{\text{degraded}}$ ratio decreased from 0.6 Pmmol/Cmmol in C1 to 0.1 Pmmol/Cmmol in C2 and aerobically synthesized glycogen also increased ($Gly_{\text{synthesized}}/PHB_{\text{degraded}}$ 0.41 Cmmol/Cmmol in C1 and 1.18 Cmmol/Cmmol in C2).

Table 5.1: Stoichiometric parameters observed in this study and proposed in literature, for processes that use acetate as C source.

Description	Time	ANAEROBIC PARAMETERS						AEROBIC PARAMETERS	
		Poly-P/ VSS ^a	P _{rel} / HAc _{upt} ^b	GLY _{degrad} / HAc _{upt} ^c	PHB _{synt} / HAc _{upt} ^c	PHV _{synt} / HAc _{upt} ^c	PHA _{synt} / HAc _{upt} ^c	GLY _{synt} / PHB _{degrad} ^c	P _{upt} / PHB _{degrad} ^b
Acevedo <i>et al.</i> (2012)	2nd experiment	0.35	0.73	0.35	1.3	0.06	1.36	0.41	0.64
	4th experiment	0.09	0.5	0.66	1.53	0.08	1.61	0.58	0.39
	5th experiment	0.01	0.08	1.08	1.74	0.28	2.02	0.7	0.11
	6th experiment	0.25	0.67	0.35	1.2	0.1	1.31	0.48	0.76
Smolders <i>et al.</i> (1994a) and Smolders <i>et al.</i> (1994b)	Experimental (pH=7.4) PAOs	-	0.6	0.5	1.32	-	-	0.45	0.34
Zhou <i>et al.</i> (2008)	Experimental study with PAOs	-	0.58	0.45	1.15	0.07	1.22	-	-
Liu <i>et al.</i> (1994)	Experimental study with GAOs	-	0.01	1.2	1.1	0.41	1.51	-	-
Zeng <i>et al.</i> (2003)	Experimental study with GAOs	-	0	1.2	1.39	0.52	1.91	1.04	0
C1. Steady state with high content poly-P	116 d	0.44	0.67	0.34	1.03	0.17	1.2	0.41	0.6
Cycles of extraction poly-P	118 d	0.2	0.61	0.55	1.05	0.14	1.19	-	NA
	118 d	0.08	0.5	0.61	-	-	-	0.58	NA
	118 d	0.05	0.19	-	-	-	-	-	NA
C2. Start low content of poly-P	119 d	0.03	0.09	0.88	1.31	0.44	1.75	1.18	0.1
Period with negligible poly-P content	124 d	0	0.02	1.87	1.72	0.77	2.5	1.87	0.01
	127 d	0	0.01	1.51	1.39	0.77	2.17	-	0
	149 d	0.01	0.09	1.48	1.42	0.72	2.14	1.08	0.07
	151 d	0.01	0.05	1.19	1.31	0.63	1.94	0.98	0.04
	154 d	0.01	0.08	1.1	1.3	0.56	1.86	-	-
C3. Steady state with low poly-P content	159 d	0.04	0.12	0.71	0.98	0.43	1.41	0.85	0.13

^a Pmg/VSSmg^b Pmmol/Cmmol^c Cmmol/Cmmol

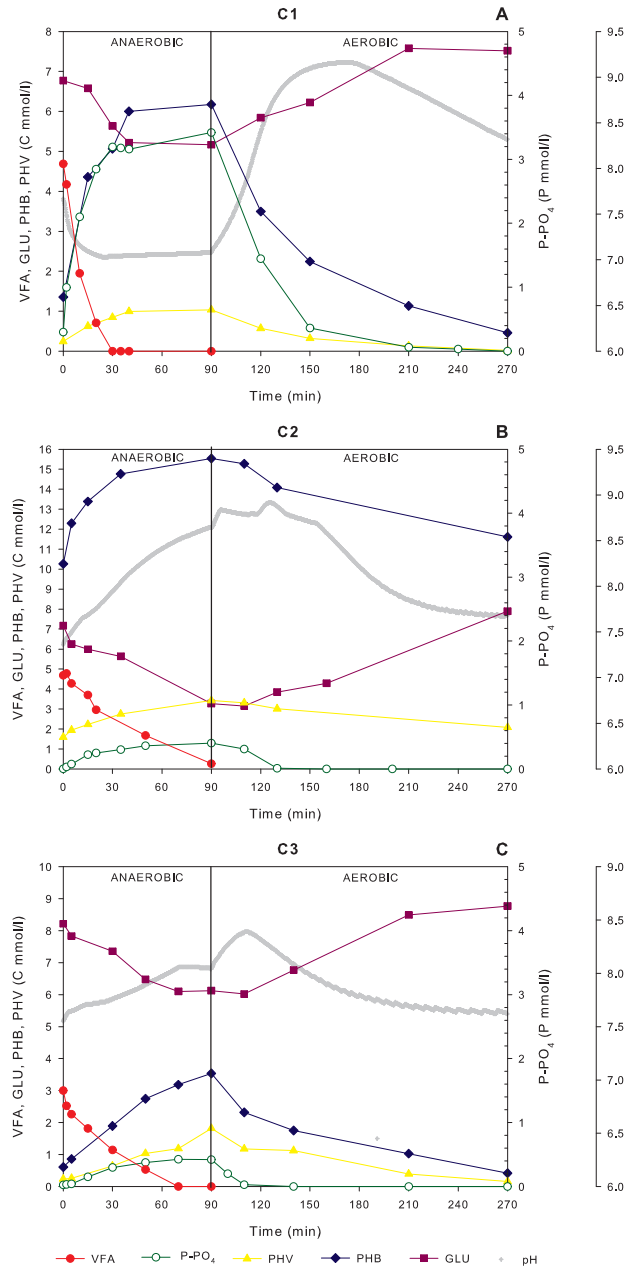


Figure 5.2: Evolution of the main sludge components in an SBR cycle. (A) C1: in pseudo-steady state. (B) C2: after poly-P removal. (C) C3: after 40 days at low levels of poly-P.

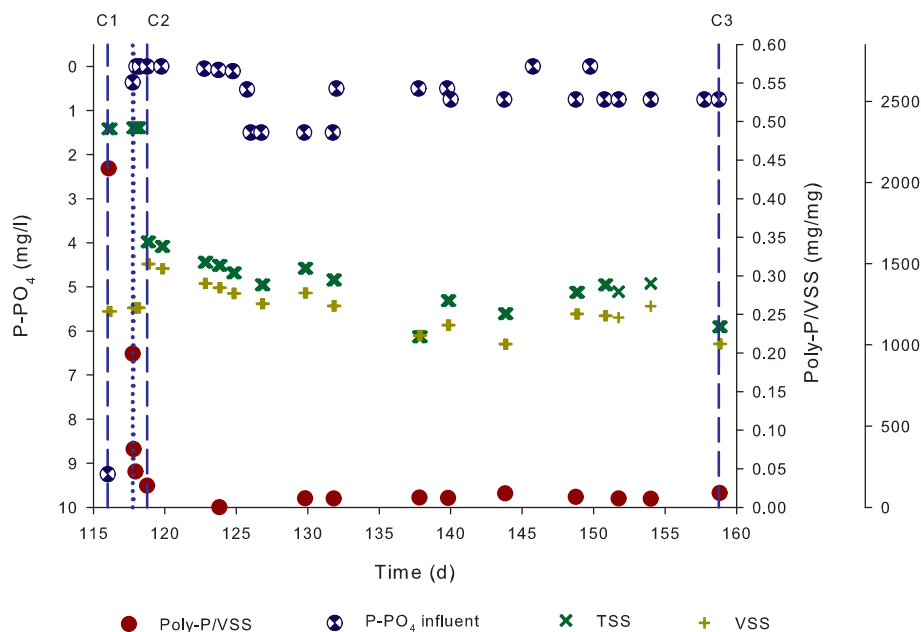


Figure 5.3: Concentration of poly-P, TSS, VSS and HAc at the beginning and end of the anaerobic phase.

Figure 5.4 gives the stoichiometric ratios obtained in the present study and those obtained in short term experiments (Acevedo *et al.*, 2012). It can be seen that the stoichiometric ratios obtained in this work follow the same trend as in the short-term experiments. These results showed a clear correlation of the stoichiometric ratios with poly-P concentration. The ratios commonly registered for PAO and GAO cultures are shown by red and green lines, respectively, in figure 5.4. With poly-P concentrations lower than 0.1 Pmg/VSSmg the ratios obtained tend towards those reported for GAO culture (Liu *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 2002), while at higher poly-P values the ratios are similar to those obtained for PAO culture (Smolders *et al.*, 1994b; Smolders *et al.*, 1994a; Zhou *et al.*, 2008). These results suggest that poly-P/VSS values lower than 0.1 Pmg/VSSmg indicate that there is not enough poly-P for ATP production, enhancing the glycolytic pathway to supply the energy deficit.

The FISH technique made it possible to identify as PAOs *Rhodocyclus tenuis* subgroup and *Candidatus Accumulibacter phosphatis* bacteria groups (Crocetti *et al.*, 2000) and their clades PAO Type I and PAO Type II (Flowers *et al.*, 2009). Figure 5.5 shows the results of the long-term microbial population monitoring in the SBR. At steady state (C1) the biomass in the reactor was composed of $82 \pm 3\%$ of PAOs and less than 5% of GAOs. During the poly-P shortage phase, the P/C

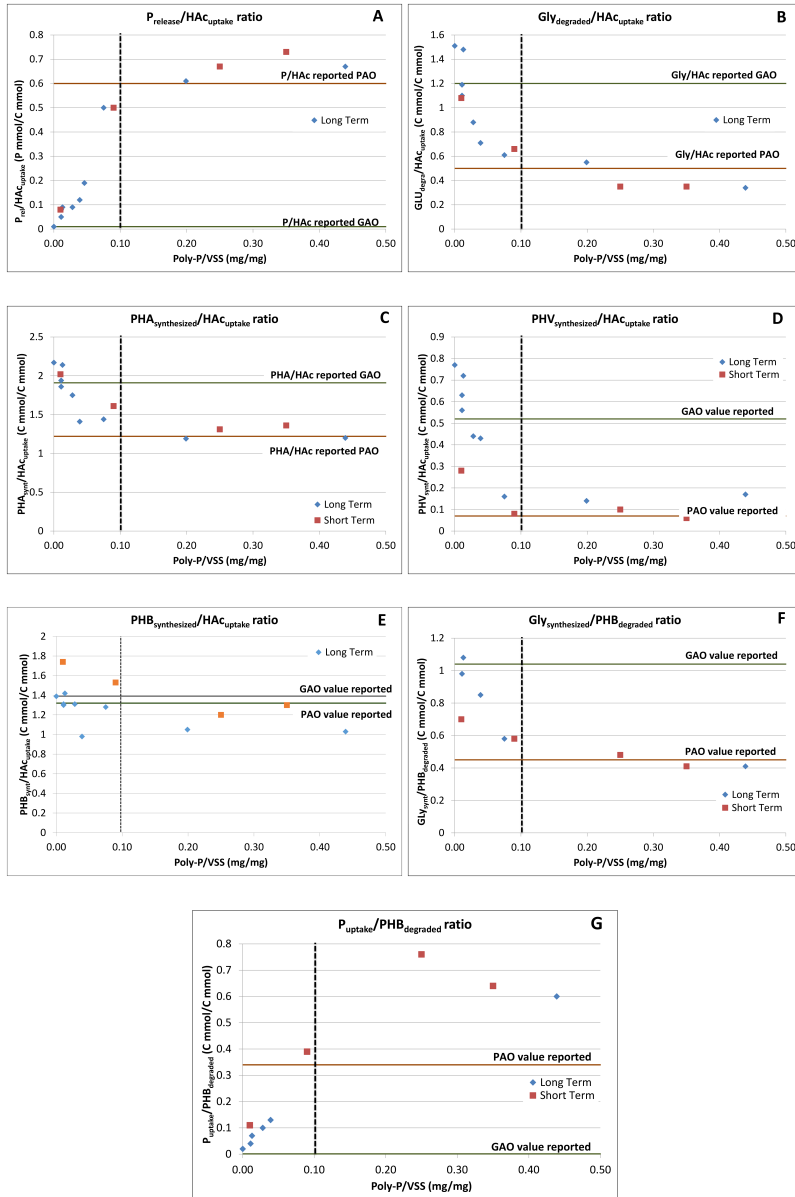


Figure 5.4: Anaerobic and aerobic ratios obtained in this long-term study compared to those reported in short-term experiments (Acevedo *et al.*, 2012). Anaerobic ratios: A) $P_{\text{release}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$; B) $\text{Gly}_{\text{degraded}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$; C) $\text{PHA}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$; D) $\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$; and E) $\text{PHB}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$. Aerobic ratios: F) $\text{Gly}_{\text{formed}}/\text{PHB}_{\text{degraded}}$ and G) $P_{\text{uptake}}/\text{PHB}_{\text{degraded}}$. Red and green lines indicate the typical values reported in the literature for PAO and GAO cultures.

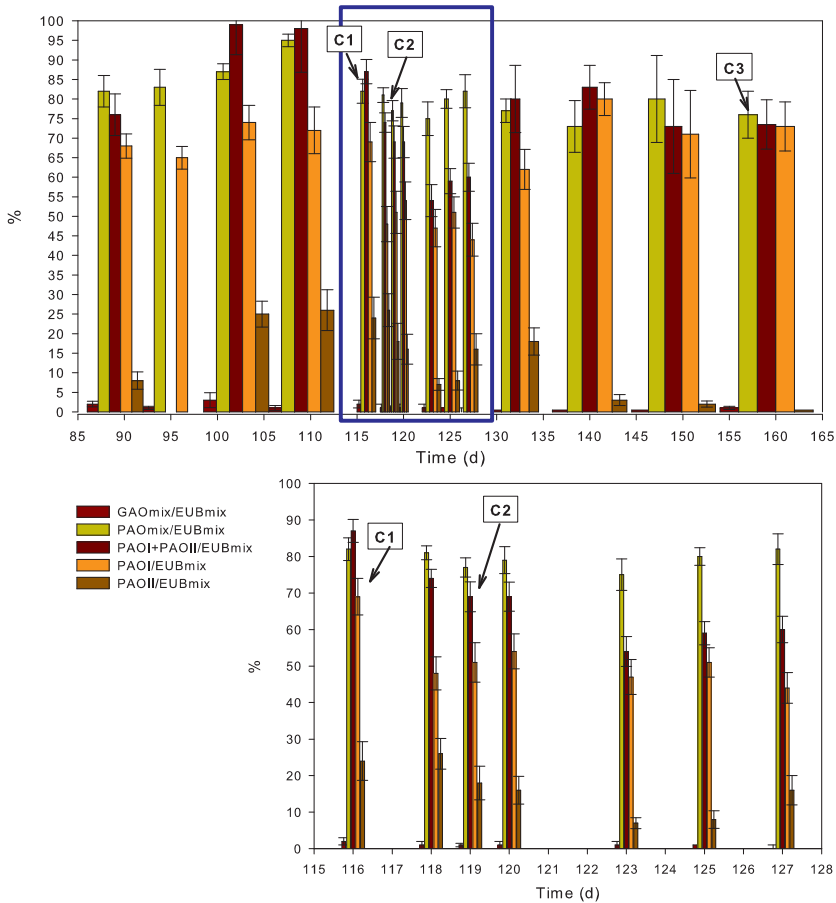


Figure 5.5: Microbial monitoring in the SBR: PAO Type I, PAO Type II, PAOmix and GAOmix over EUBmix

ratio in the influent was around 0.01 Pmmol/Cmmol. Despite this low P/C ratio, the population of GAOs did not increase, but remained below 5%, and the PAO population remained the same throughout the experiments (between 70 – 83%), both with and without poly-P. There were no significant changes in TSS or VSS (Figure 5.3). These results suggest that the metabolic versatility of PAO to use glycogen as the main energy source without poly-P, jointly with the high pH maintained during the Period 2 (between 7.5 and 8.5, see figure 5.1) are the main factors affecting the domination of PAO over GAO in the reactor.

Just after the extraction of poly-P (C2) the PAO Type I population remained at $72 \pm 5\%$ and PAO Type II at $25 \pm 5\%$. During the reduction of poly-P content (C1 to C2) a change in microbial populations occurred: Type I PAOs decreased

by 12% in relation to Type II PAOs (Figure 5.5). In the short-term experiments reported by Acevedo *et al.* (2012), Type II PAOs increased as poly-P content was reduced. However, in the present study, after maintaining a low P/C ratio (0.01 Pmmol/Cmmol) for a long period (132 to 169 day), the percentage of PAO Type II dropped below 5% and PAO Type I was the predominant group for this long-term experiment with low poly-P content.

Both results, the short-term study (Acevedo *et al.*, 2012) and the long-term study (the present study), are in accordance with Welles *et al.* (2015). These authors observed that when the poly-P content decreased, both *Candidatus Accumulibacter phosphatis* Type I and Type II could shift their metabolism from a PAO metabolism to a GAO metabolism and have the ability to solely rely on glycogen as energy source for HAc uptake.

However, the dominance of PAO Type I observed in the present study is apparently in contradiction with the results obtained by Welles *et al.* (2015). These authors observed that under poly-P depleted conditions, the kinetic rates of PAO Type II were four times higher than those of PAO Type I, suggesting that PAO Type II had a strong competitive advantage over PAO Type I. Comparing the results obtained in the present study and the ones obtained by Welles *et al.* (2015), there are some differences in both studies that could explain these results. The first one is related with the operation time of the system under the poly-P depleted conditions affecting to the acclimation period of bacteria to the new conditions. Welles *et al.* (2015) carried out experiments at short-term in contrast with the long-term of the present study where the reactor was operated during more than 3 SRT. Therefore, in this work the bacteria were acclimated to generate energy and reducing power without poly-P, meanwhile in Welles *et al.* (2015) the bacteria were not acclimated to work without poly-P. The second difference consists on the pH during the operation cycle, which it is well know its affection over the kinetics of the processes (Zhang *et al.*, 2007; Weissbrodt *et al.*, 2013). The experiments in Welles *et al.* (2015) were conducted at pH 7, meanwhile in the present study the pH was maintained between 7.5 and 8.5 during the anaerobic and aerobic phases (see figure 5.1). Therefore, the pH and the acclimation period could be factors that affect to the PAO Type performing the GAO metabolism and inducing the prevalence of PAO Type I in this study. However, further research is needed to confirm these hypotheses.

FISH also revealed that after extracting poly-P (C2), the sum of PAO Types I and PAO Type II was significantly lower than the PAOs detected with the PAOmix probe, suggesting the development of another type of PAO different of Types I and Type II. Therefore, it would be convenient to apply other molecular techniques, (e.g. phylogenetic studies of the 16sRNA gene or measurements of ppk1 gene expression levels) in order to study the whole microbial population and its changes. Although these techniques were not available when the experiments were carried out, Tu *et al.* (2013) found, using molecular techniques such as 454 pyrosequencing

combined with FISH, that *Dechloromonas* and *Tetrasphaera spp.* could be also PAOs. Although in our study the PAO (detected with PAOmix probe) ranged from 73 % to 82 % of all bacteria throughout the experiment, it would be interesting to see if *Dechloromonas* and *Tetrasphaera spp.* (or any other potential PAO) were present.

Liu *et al.* (1997) found that an influent with a low P/C ratio (2/100 w/w) could stimulate GAO growth because the phosphorus is insufficient to support a large PAO population. The results obtained in the present study regarding anaerobic ratios are similar to those obtained by Liu *et al.* (1997). In both studies it was observed that at very low levels of poly-P the $\text{Gly}_{\text{degraded}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ ratio increased, $\text{PHA}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ also increased and there was a considerable change in the PHB/PHV ratio, which promoted PHV synthesis. In the present study the GAO population was observed to remain below 5 %, so these organisms could not have been responsible for the metabolic change. Therefore, the conclusion reached by Liu *et al.* (1997) indicating a population change from PAO to GAO, was probably not completely accurate, due to the ability of PAOs to behave like GAOs without changing from one type to the other.

Differences were also found between the values of the $\text{PHV}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ and $\text{PHB}_{\text{synthesized}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ ratios obtained in the present study and those obtained in the short-term study (see figure 5.4, C and D). These differences could be due to variations in the PAO population (Types I and II) in both studies. Another important factor observed in the long-term experiments was the decrease in the acetic acid uptake rate when the poly-P content was reduced. This behaviour was also reported by Zhou *et al.* (2008) and Welles *et al.* (2015). However, despite the reduced acetate uptake rate, the GAO population in the reactor did not grow significantly, as expected.

To sum up, the results obtained in this study are in agreement with those obtained by (Acevedo *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008; Barat *et al.*, 2008) in short-term experiments, and confirm the ability of PAOs to behave like GAOs when poly-P is not available for energy production, even over long periods of time.

Regarding the population dynamics, the short term experiments (Acevedo *et al.*, 2012; Welles *et al.*, 2015) confirmed the ability of PAO Type II to quickly change to GAO metabolism. However, although apparently PAO Type I perform a slow transition from typical poly-P metabolism, once established the metabolic change, the Type I dominate the PAO culture at long term probably due to the acclimation period and the high pH maintained in the reactor. Nevertheless, further research is needed to confirm this hypothesis.

5.4 Conclusions

It can therefore be concluded that in the EPBR process organisms of the specie *Accumulibacter* have the ability to maintain the long-term metabolic behaviour of GAO (40 days equivalent to 3 SRT). The anaerobic and aerobic stoichiometric ratios were found to show the same metabolism change (from PAM to GAM) observed in short-term experiments when poly-P was extracted. These results suggest that when poly-P/VSS values are lower than 0.1 Pmg/VSSmg, poly-P content is not high enough to produce ATP, and the glycolytic pathway is enhanced in order to supply the energy deficit. Microbiological monitoring showed that PAOs remained in the system at high levels (around 80 %) and GAOs were almost negligible (below 5%), demonstrating that there was a metabolic shift in the PAOs with no population change from PAO to GAO. Regarding PAO population dynamics, short-term experiments in previous studies confirmed the ability of PAO Type II to perform a quick change to GAO metabolism. However, although PAO Type I apparently slowly transition from typical poly-P metabolism, once the metabolic change has been established PAO Type I are more efficient than Type II and therefore dominate the long-term PAO culture.

Acknowledgements

This research work has been supported by the Generalitat Valenciana (GVPRE /2008/044) and the Polytechnic University of Valencia (PAID-06-08-3227), which are gratefully acknowledged. Special acknowledgements to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) No. 207966.

References

- Acevedo, B., A. Oehmen, G. Carvalho, A. Seco, L. Borrás, and R. Barat (2012). “Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage”. In: *Water Research* 46.6, pp. 1889–1900 (cit. on pp. 83, 85, 88, 90, 91, 93, 94).
- Aguado, D., T. Montoya, J. Ferrer, and A. Seco (2006). “Relating ions concentration variations to conductivity variations in a sequencing batch reactor operated for enhanced biological phosphorus removal”. In: *Environmental Modelling & Software* 21.6, pp. 845–851 (cit. on p. 85).
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl (1990). “Combination of 16S rRNAtargeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations”. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56.6, pp. 1919–1925 (cit. on p. 84).
- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, A. Seco, and J. Ferrer (2006). “Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal”. In: *Water Science and Technology* 53.12, pp. 29–37 (cit. on p. 82).
- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, J. Ferrer, and A. Seco (2008). “Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism”. In: *Water Research* 42.13, pp. 3415–3424 (cit. on pp. 82, 83, 94).
- Bond, P.L., R. Erhart, M. Wagner, J. Keller, and L.L. Blackall (1999). “Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biologicalphosphorus removal activated sludge systems”. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65.9, pp. 4077–4084 (cit. on p. 86).
- Borrás, L. (2008). «Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR». Tesis doct. Universidad Politécnica de Valencia (vid. pág. 85).
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht M.C.M., C.M. Hooijmans, and J.J. Alaerts G.J. and Heijnen (1997). «Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal». In: *Journal of environmental engineering* 123.2, pp. 144–153 (cit. on p. 82).
- Carvalho, M., A. Oehmen, G. Carvalho, M. Eusébio, and M. A. M. Reis (2014). “The impact of aeration on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms”. In: *Water research* 66, pp. 296–307 (cit. on p. 82).
- Cech, J.S. and P. Hartman (1993). “Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems”. In: *Water Research* 27, pp. 1219–1225 (cit. on p. 82).
- Crocetti, G.R., P. Hugenholtz, P.L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L.L. Blackall (2000). “Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and design of 16 rRNA-directed probes for their detection and quantification”. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66, pp. 1175–1182 (cit. on p. 90).

- Eaton, A.D. and M.A.H. Franson, eds. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. APHA (American Public Health Association). American Public Health Association (cit. on p. 84).
- Erdal, U.G., Z.K. Erdal, and C.W. Randall (2003). «The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance». In: *Water Science & Technology* 47.11, pp. 1–8 (cit. on p. 82).
- Erdal, U.G., Z.K. Erdal, G.T. Daigger, and C.W. Randall (2008). “Is it PAO-GAO competition or metabolic shift in EBPR system? Evidence from an experimental study”. In: *Water science and technology* 58.6, pp. 1329–34 (cit. on p. 83).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001a). “Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms”. In: *Water Environmental Research* 73, pp. 213–222 (cit. on p. 86).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001b). “pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms”. In: *Water Environmental Research* 73.2, pp. 223–232 (cit. on p. 86).
- Flowers, J.J., S. He, S. Yilmaz, D.R. Noguera, and K.D. McMahon (2009). “Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different *Candidatus Accumulibacter* clades”. In: *Environmental Microbiology Reports* 1.6, pp. 583–588 (cit. on p. 90).
- Griffiths, P.C., H.M. Stratton, and R.J. Seviour (2002). “Environmental factors contributing to the G bacteria population in full-scale EBP plants”. In: *Water Science and Technology* 46, pp. 185–192 (cit. on p. 82).
- Liu, W-T., T. Mino, K. Nakamura, and T. Matsuo (1996). “Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphate removal”. In: *Water Research* 30, pp. 75–82 (cit. on pp. 82, 86).
- Liu, W-T., K. Nakamura, T. Matsuo, and T. Mino (1997). “Internal energy-based competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating bacteria in biological phosphorus removal reactors-Effect of P/C feeding ratio”. In: *Water Research* 31.6, pp. 1430–1438 (cit. on pp. 83, 94).
- Liu, W.T., T. Mino, K. Nakamura, and T. Matsuo (1994). “Role of glycogen in acetate uptake and polyhydroxyalkanoate synthesis in anaerobic-aerobic activated sludge with a minimized polyphosphate content”. In: *Journal of fermentation and bioengineering* 77, pp. 535–540 (cit. on pp. 88, 90).
- Metcalf, Eddy (2003). «Inc., Wastewater Engineering, Treatment and Reuse». In: *New York: McGraw-Hill* (cit. on p. 86).
- Moosbrugger, R.E., M.C. Wentzel, G.A. Ekama, and G.v.R. Marais (1992). *Simple Titration Procedures to determine H₂CO₃ alkalinity and short-chain fatty Acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acids/bases*. Tech. rep. TT 57/93. UCT (cit. on p. 84).

- Oehmen, A., Z. Yuan, L.L. Blackall, and J. Keller (2005a). “Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 91, pp. 162–168 (cit. on p. 84).
- Oehmen, A., M. T. Vives, H. Lu, Z. Yuan, and J. Keller (2005b). “The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms”. In: *Water Research* 39.15, pp. 3727–3737 (cit. on p. 82).
- Oehmen, A., P.C. Lemos, G. Carvalho, Z.G. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, and M.A.M. Reis (2007). “Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale”. In: *Water Research* 41.11, pp. 2271–2300 (cit. on p. 82).
- Saunders, A.M., A. Oehmen, L.L. Blackall, Z. Yuan, and J. Keller (2003). «The effect of GAOs on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR plants». In: *Water Science Technology* 47.11, pp. 37–43 (cit. on p. 82).
- Schuler, A.J. and D. Jenkins (2003a). “Enhanced Biological Phosphorus Removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, Part I: Experimental results and comparison with metabolic models”. In: *Water Environment Research* 75.6, pp. 485–498 (cit. on pp. 82, 83).
- Schuler, A.J. and D. Jenkins (2003b). “Enhanced Biological Phosphorus Removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, Part II: anaerobic adenosine triphosphate utilization and acetate uptake rates”. In: *Water Environment Research* 75.6, pp. 499–511 (cit. on p. 82).
- Serralta, J., L. Borrás, C. Blanco, R. Barat, and A. Seco (2004). “Monitoring pH and electric conductivity in an EBPR sequencing batch reactor”. In: *Water Science Technology* 50, pp. 145–152 (cit. on p. 86).
- Smolders, G.J.F., J. Vandermeij, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1994a). “Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 43, pp. 461–470 (cit. on pp. 86, 88, 90).
- Smolders, G.J.F., J. van der Meij, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1994b). “Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 44, pp. 837–848 (cit. on pp. 88, 90).
- Tian, W.-D., C.M. Lopez-Vazquez, W.-G. Li, D. Brdjanovic, and M.C.M. Van Loosdrecht (2013). «Occurrence of PAOI in a low temperature EBPR system». In: *Chemosphere* 92.10, pp. 1314–1320 (cit. on p. 83).
- Tu, Y. and A. J. Schuler (2013). «Low acetate concentrations favor polyphosphate-accumulating organisms over glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal from wastewater». In: *Environmental science & technology* 47.8, pp. 3816–3824 (cit. on p. 93).
- Weissbrodt, D. G., G. S. Schneiter, J.-M. Fürbringer, and C. Holliger (2013). «Identification of trigger factors selecting for polyphosphate- and glycogen-accumulating

- organisms in aerobic granular sludge sequencing batch reactors». In: *Water research* 47.19, pp. 7006–7018 (cit. on p. 93).
- Welles, L., W.D. Tian, S. Saad, B. Abbas, C.M. Lopez-Vazquez, C.M. Hooijmans, M.C.M van Loosdrecht, and D. Brdjanovic (2015). “Accumulibacter clades Type I and II performing kinetically different glycogen-accumulating organisms metabolisms for anaerobic substrate uptake”. In: *Water research* 83, pp. 354–366 (cit. on pp. 83, 93, 94).
- Wang, L.M. and J.K. Park (2002). “Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in biological phosphorus removal systems- effect of temperature”. In: *Water Science and Technology* 46, pp. 191–194 (cit. on p. 82).
- Zeng, R., Z. Yuan, M.C.M. van Loosdrecht, and J. Keller (2002). “Proposed modifications to metabolic model for glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 80.3, pp. 277–279 (cit. on p. 90).
- Zeng, R. J., Z. Yuan, and J. Keller (2003). “Model-based analysis of anaerobic acetate uptake by a mixed culture of polyphosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 83.3, pp. 293–302 (cit. on p. 88).
- Zhang, C., Y. Chen, and Y. Liu (2007). “The long-term effect of initial pH control on the enrichment culture of phosphorus-and glycogen-accumulating organisms with a mixture of propionic and acetic acids as carbon sources”. In: *Chemosphere* 69.11, pp. 1713–1721 (cit. on pp. 82, 93).
- Zhou, Y., M. Pijuan, R.J. Zeng, L. Huabing, and Z. Yuan (2008). “Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)?” In: *Water Research* 42, pp. 2361–2368 (cit. on pp. 83, 88, 90, 94).

Chapter 6

Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms

B. Acevedo^a, L. Borrás^b, A. Oehmen^c, R. Barat^{a1}

^a Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022. Valencia. Spain (e-mail: breaclu@posgrado.upv.es, rababa@dihma.upv.es)

^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia. Doctor Moliner, 50. 46100 – Burjassot. Valencia. Spain (e-mail: luis-borras-falomir@uv.es)

^c REQUIMTE/CQFB, Chemistry Department, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal (e-mail: adriano@dq.fct.unl.pt)

ABSTRACT

Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) is one of the most important methods of phosphorus removal in municipal wastewater treatment plants, having been described by different modelling approaches. In this process, the PAOs (polyphosphate accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) compete for volatile fatty acids uptake under anaerobic conditions. Recent studies have revealed that the metabolic pathways used by PAOs in order to obtain the energy and the reducing power needed for polyhydroxyalkanoates synthesis could change depending on the amount of polyphosphate stored in the cells. The model presented in this paper extends beyond previously developed metabolic

¹In: *Water Research* 65(2014) pp. 235-244. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.028>

models by including the ability of PAO to change their metabolic pathways according to the content of poly-P available. The processes of the PAO metabolic model were adapted to new formulations enabling the change from P-driven VFA uptake to glycogen-driven VFA uptake using the same process equations. The stoichiometric parameters were changed from a typical PAO coefficient to a typical GAO coefficient depending on the internal poly-P with Monod-type expressions. The model was calibrated and validated with seven experiments under different internal poly-P concentrations, showing the ability to correctly represent the PAO metabolic shift at low poly-P concentrations. The sensitivity and error analysis showed that the model is robust and has the ability to describe satisfactorily the change from one metabolic pathway to the other one, thereby encompassing a wider range of process conditions found in EBPR plants.

6.1 Introduction

One of the main methods for phosphorus (P) removal in municipal activated sludge wastewater treatment systems is a biological process known as enhanced biological phosphorus removal (EBPR). This process consists of alternating anaerobic and aerobic zones, where organic matter uptake and phosphorus release take place under anaerobic conditions while phosphorus uptake takes place under aerobic and/or anoxic conditions.

In this process a group of microorganisms known as polyphosphate accumulating organisms (PAO) accumulate large amounts of P in the form of intracellular polyphosphate (poly-P). The accumulated P is then removed from the system by wasting P-rich sludge. PAOs are equipped with a polyphosphate-accumulating metabolism (PAM) under alternating anaerobic-aerobic/anoxic conditions. PAM is defined as anaerobic VFA uptake through poly-P hydrolysis and phosphate release, glycogen degradation and poly-hydroxyalkanoate (PHA) production, followed by aerobic and/or anoxic PHA degradation for P uptake and poly-P formation, glycogen production and biomass growth.

In EBPR processes, the glycogen accumulating organisms (GAO) compete with PAO for volatile fatty acids (VFA) uptake under anaerobic conditions. GAOs have a glycogen-accumulating metabolism (GAM), which is similar to PAM, but without phosphorus release and phosphorus uptake; therefore, GAOs do not remove phosphorus from wastewater. GAOs use glycolysis to obtain energy and reducing equivalents for VFA uptake and PHA storage. Under aerobic conditions, glycogen is regenerated from PHAs. Therefore, the main difference between PAM and GAM is that phosphorus is the main driving force for VFA uptake in PAM and glycogen is the driving force for VFA uptake in GAM.

The EBPR process has been typically described by two basic types of mathematical models, namely the metabolic models and the activated sludge models (ASM). Both of these models are composed of sets of stoichiometric and kinetic expressions that describe the biochemical transformations of the EBPR process and other relevant biological nutrient removal processes (Oehmen *et al.*, 2007). Several models, such as: ASM2 (Henze *et al.*, 1995), ASM2d (Henze *et al.*, 1999), the Technical University of Delft Phosphorus model (TUDP model) (Meijer, 2004; Veldhuizen *et al.*, 1999), ASM3-bioP model (Rieger *et al.*, 2001), UCTPHO⁺ (Hu *et al.*, 2007) are appropriate for the mathematical description of the EBPR processes. According to ASM models, PAOs take up acetate as the sole carbon source, and PHA is the sole carbon storage polymer cycled by PAOs. Although the existence of GAOs is not considered in these models, some modified versions of ASM2 and the metabolic models incorporate the glycogen as a storage polymer in addition to PHA, as well as the growth and activity of GAOs (Mino *et al.*, 1995; Oehmen *et al.*, 2007). However, the application of these models has yet to yield results that completely describe the observed behaviour of EBPR processes (Zuthi *et al.*, 2013).

Although microbiological studies have identified PAOs and GAOs as different microorganisms, recent studies revealed that PAOs are able to behave as GAOs under different conditions (Barat *et al.*, 2006; Erdal *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Acevedo *et al.*, 2012). These studies have observed that the metabolic pathways used by PAOs in order to obtain the energy and the reducing power needed for PHA synthesis could change depending on the amount of poly-P cleavage. Furthermore, Martín *et al.* (2006) reported the existence of genes in *Accumulibacter* PAOs that could explain the existence of GAM in PAOs. These new insights have revealed the need to update the PAO models in order to incorporate this feature. Therefore, the aim of this paper is to extend upon the previously developed PAO metabolic model (Smolders *et al.*, 1994; Murnleitner *et al.*, 1997; López-Vázquez *et al.*, 2009), and include the ability of PAO to change their metabolic pathways according to the available polyphosphate. This was performed through the addition of new stoichiometric and kinetic parameters into the PAO metabolic model, which were subsequently calibrated and validated, and the robustness of the model was assessed through sensitivity and error analysis.

6.2 Materials and methods

The model developed in this study was based on previously developed models describing the metabolism of PAOs and/or GAOs (Smolders *et al.*, 1994; Murnleitner *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 2003; López-Vázquez *et al.*, 2009). The developed model covers the processes carried out by PAO: two anaerobic processes (acetate uptake and anaerobic maintenance) and four aerobic processes (PHA degradation, poly-P formation, glycogen accumulation and aerobic maintenance). The intracellular

components of the active biomass are defined as: polyhydroxyalkanoates ($X_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$), described as a mixture of different fractions such as PHB, PHV and PH2MV), glycogen ($X_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$) and intracellular polyphosphates ($X_{\text{PP}}^{\text{PAO}}$). The soluble components are: oxygen (S_{O_2}), phosphate (S_{PO_4}) and acetic acid (S_{HAc}).

This model extension was implemented in the AQUASIM software (Reichert, 1994) in order to be calibrated and validated with the experimental results obtained by Acevedo *et al.* (2012) in a SBR operated for EBPR with acetate as a sole carbon source. This work was carried out at stable conditions at 21 °C with a SRT of 8 d and a HRT of 12 h. Six experiments were performed at different poly-P/PAO ($f_{\text{PP_PAO}}$) ratios: 0, 0.05, 0.17, 0.20, 0.23, and 0.25 Pmmol/Cmmol. In each experiment, the concentrations of HAc, phosphorus, PHA and glycogen were intensively monitored during the anaerobic/aerobic SBR cycle. These poly-P/PAO ratios were obtained for each experiment after a specific batch operation cycle to release poly-P and remove it in order to reduce the $f_{\text{PP_PAO}}$ ratio. FISH results showed that the biomass was highly enriched in PAOs in all the experiments and GAOs were not detected (for a detailed description of the experiments see Acevedo *et al.* (2012)).

In order to validate the model, sensitivity analysis was performed using the absolute-relative function (Equation 6.1), which measures the absolute change in each model component (y) for a 100 % change in each parameter (p) with a standard deviation of 10 %. Through this analysis, the parameters which have the greatest influence on the model predictions are identified. In addition, the calculation of the global model error was performed by normalized root-mean-square deviation (NRMSD, equation 6.2), which quantifies the agreement between model predictions and experimental data (Oehmen *et al.*, 2010).

$$\delta_{y,p}^{a,r} = p \times \frac{\partial y}{\partial p} \quad (6.1)$$

$$NRMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{\text{meas},i} - X_{\text{pred},i})^2}{X_{\text{meas},\text{max}} - X_{\text{meas},\text{min}}}} \quad (6.2)$$

6.3 Model extension

As previously pointed out, the concept behind the proposed model extension is derived from the experimental observations that the PAO anaerobic metabolism is not necessarily poly-P dependent (Acevedo *et al.*, 2012). These bacteria have demonstrated that they are quite versatile organisms, being able to switch from one metabolic pathway to another depending on different variables, such as internal

poly-P content. It was demonstrated that PAOs can use only glycogen for energy and reducing power production under low levels of poly-P, behaving as GAOs.

When translating these observations into a mathematical formulation, the current model processes of PAO were adapted to new formulations that enable the change from PAM to GAM using the same process equations.

6.3.1 Stoichiometry

The experimental results obtained in Acevedo *et al.* (2012) regarding the stoichiometric parameters of PAO anaerobic acetate uptake at different poly-P contents are shown in figure 6.1. These results demonstrate the ability of PAO to change their metabolic pathway when the internal reserves of poly-P decrease. Figure 6.1 also displays the estimation of the yield coefficients as a function of the poly-P content, as explained below.

Figure 6.1 shows the following stoichiometric ratios: PHA synthesized per unit of acetate consumed ($Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$) (Figure 6.1A); glycogen consumed per unit of acetate consumed ($Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$) (Figure 6.1B); and phosphate released per unit of acetate consumed ($Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}$) (Figure 6.1C). Figure 6.1 shows that PAO bacteria display different stoichiometric ratios that are directly related with the amount of internal poly-P (poly-P per PAO ratio: $f_{\text{PP,PAO}}$). Furthermore, the values of these stoichiometric parameters vary from a typical PAM to a typical GAM. Therefore the previously proposed PAO stoichiometry was modified according to these experimental results. These modifications are based on a transition between the anaerobic metabolic pathways used by PAOs (Equation 6.3, proposed by Smolders *et al.* (1994)) to the ones described for GAOs (Equation 6.4, proposed by Zeng *et al.* (2003)). In this metabolic pathways α_{PAO} and α_{GAO} represent the ATP necessary to transport 1 C-mmol of acetate through the cell membrane through PAM and GAM, respectively (see also Appendix A). These parameters are pH dependent, and were estimated experimentally as presented by Smolders *et al.* (1994) and Filipe *et al.* (2001), respectively.

In order to mathematically model this metabolic transition, the stoichiometry of the anaerobic acetate uptake process was changed from PAM to GAM depending on the internal poly-P. Figure 6.1 show the Monod type expressions adjusted to the experimental values that best fit to the experimental results for the Y_{PHA} parameter (Equation 6.5), Y_{GLY} parameter (Equation 6.6) and Y_{PO_4} parameter (Equation 6.7) respectively. As can be seen in all cases, the stoichiometric parameters were changed from a typical PAM coefficient to a typical GAM coefficient depending on the internal poly-P. Small discrepancies were observed between the experimental and estimated values of the parameters Y_{GLY} and Y_{PO_4} that suggest that a slightly higher quantity of ATP for VFA uptake was generated by polyphosphate degradation, and a slightly lower amount produced by glycogen degradation

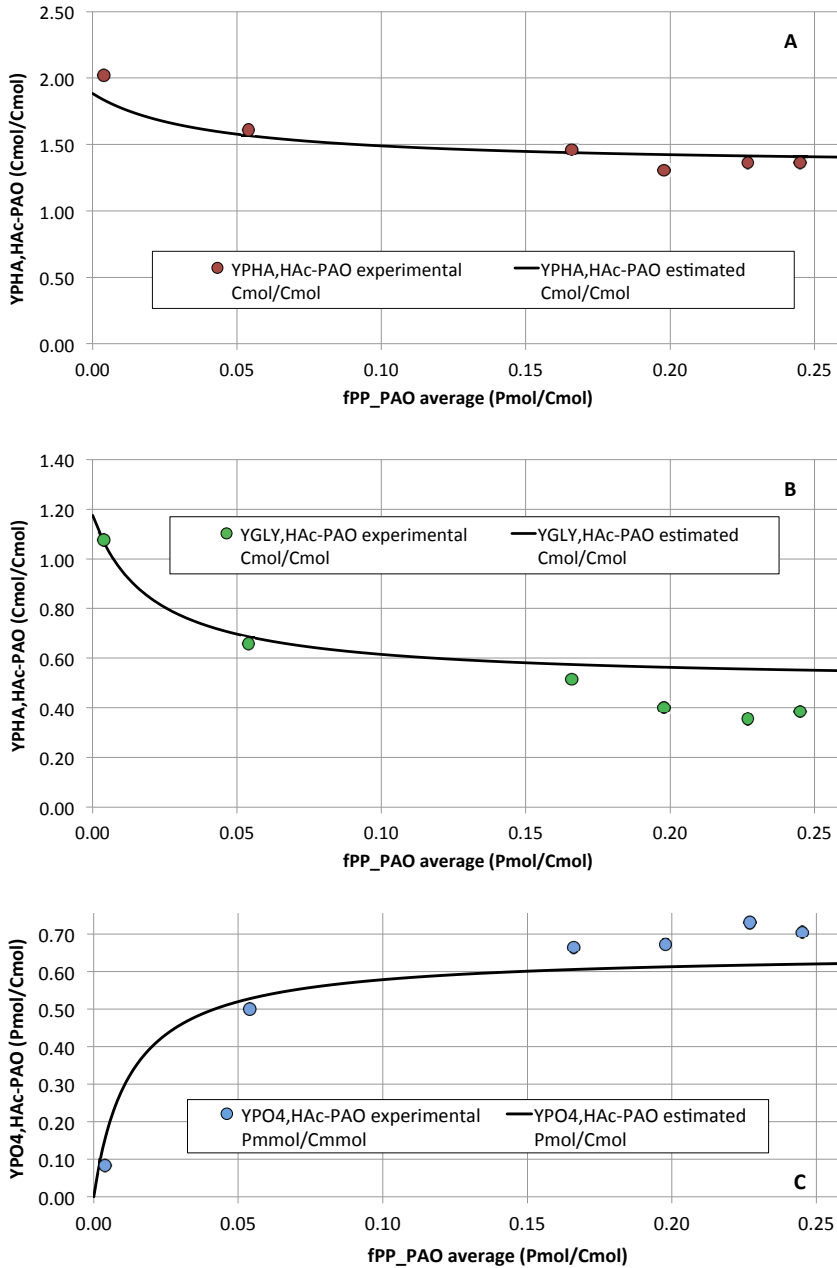


Figure 6.1: Experimental data of the stoichiometric parameters obtained by Acevedo *et al.* (2012) at different ratios of polyphosphate/PAO (dots) and the stoichiometric model proposed (solid line): A) Y_{PHA}^{PAO} , B) Y_{GLY}^{PAO} and C) $Y_{PO_4}^{PAO}$.

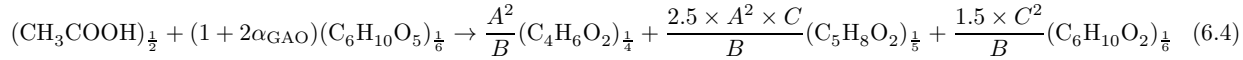
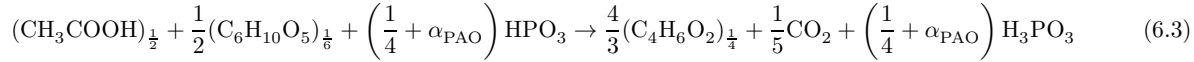
than was predicted for the typical PAM. A similar effect was previously observed in studies investigating PAO metabolism in full-scale EBPR plants (Pijuan *et al.*, 2008; Lanham *et al.*, 2013) and suggests the partial involvement of the TCA cycle in the anaerobic generation of NADH.

In equations 6.5, 6.6 and 6.7 the terms are $Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$, $Y_{\text{PHA}}^{\text{GAO}}$, $Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$, $Y_{\text{GLY}}^{\text{GAO}}$, $Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}$ are the typical stoichiometric parameters for PAO (Equation 6.3) and GAO (Equation 6.4) for the anaerobic acetate uptake process and $K_{\text{S},Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}}$, $K_{\text{S},Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}$, $K_{\text{S},Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}}$ are the half saturation constants used to model the transition between both metabolisms.

All these stoichiometric parameters are described in Appendix A. The values of the stoichiometric parameters for PAO and GAO were fixed according to those proposed by Smolders *et al.* (1994) and Zeng *et al.* (2003), respectively, and calculated at $\text{pH} = 7.5$ (Table 6.1). Regarding the values of the half saturation constants, initially they were adjusted individually in order to minimize the sum of the squared errors between the experimental values and the calculated ones with the proposed model. These values were 0.02, 0.06 and 0.02 Pmmol/Cmmol for $K_{\text{S},Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}}$, $K_{\text{S},Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}}$ and $K_{\text{S},Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}$ respectively. However, in order to maintain the mass, energy and redox balance in the proposed model at all polyphosphate levels, it was necessary to fix an identical value for all of the half saturation constants. The normalized root-mean-square deviation (NRMSD) was used to measure the differences between the values predicted under three different scenarios and the values actually observed. The three scenarios studied were: different half saturation constant for each stoichiometric parameter (0.02, 0.06 and 0.02 Pmmol/Cmmol for $K_{\text{S},Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}}$, $K_{\text{S},Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}}$ and $K_{\text{S},Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}$ respectively), 0.02 Pmmol/Cmmol for all the half saturation constants and 0.03 Pmmol/Cmmol for all the half saturation constants. As can be seen in figure 6.2, there were no significant differences between the three scenarios tested. Therefore, it was adopted the mean of the values initially obtained (0.03 Pmmol/Cmmol) for all the half saturation constants.

Table 6.1 shows the values of the stoichiometric parameters used to fit the experimental values with the proposed model.

Table 6.2 shows the stoichiometry of the model extension for the anaerobic acetate uptake and anaerobic maintenance processes. The anaerobic acetate uptake process was modified according to the stoichiometric yield coefficients in table 6.1. Regarding the anaerobic maintenance process, the different energy source used for PAM (poly-P) and GAM (glycogen) (Smolders *et al.*, 1995) requires a transition between both metabolisms with a polyP-Monod type expression similar to the one included in the anaerobic acetate uptake process. The aerobic phase model (not shown in table 6.2) was the same to the one described for *Accumulibacter* in López-Vázquez *et al.* (2009). The whole PAO model is shown in the supplementary information (Appendix A).



where :

$$A : \left(\frac{9}{6} + \frac{2}{3}\alpha_{\text{GAO}}\right) \quad B : \left(\frac{5}{3} + \frac{4}{3}\alpha_{\text{GAO}}\right) \quad C : \left(\frac{1}{6} + \frac{2}{3}\alpha_{\text{GAO}}\right) \quad \alpha_{\text{PAO}} : 0.057 \times \text{pH}_{\text{out}} - 0.34 \quad \alpha_{\text{GAO}} : 0.16 \times \text{pH}_{\text{out}} - 0.7985$$

$$Y_{\text{PHA}} = Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}} + (Y_{\text{PHA}}^{\text{GAO}} - Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}) \times \frac{K_{\text{S}, Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}}}{f_{\text{PP_PAO}} + K_{\text{S}, Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}}} \quad (6.5)$$

$$Y_{\text{GLY}} = -Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}} - (Y_{\text{GLY}}^{\text{GAO}} - Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}) \times \frac{K_{\text{S}, Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}}{f_{\text{PP_PAO}} + K_{\text{S}, Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}} \quad (6.6)$$

$$Y_{\text{PO}_4} = Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}} \times \frac{f_{\text{PP_PAO}}}{f_{\text{PP_PAO}} + K_{\text{S}, Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}}} \quad (6.7)$$

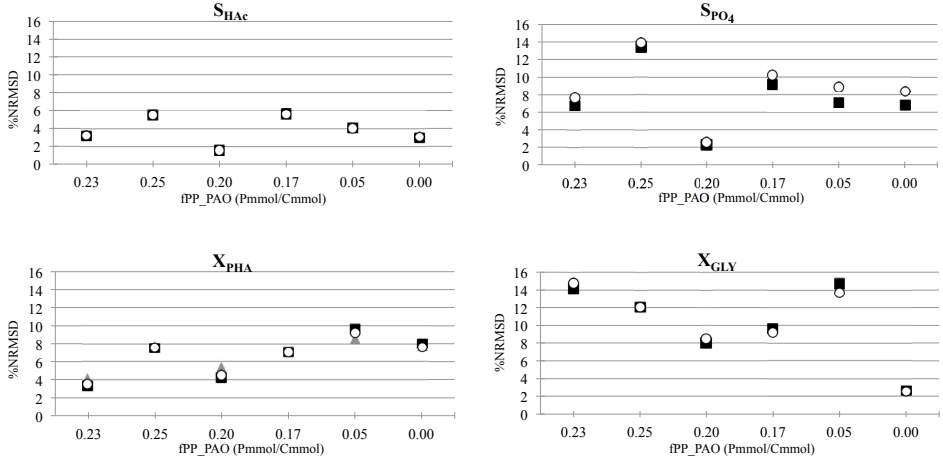


Figure 6.2: Error analysis for different combination of half saturation constants for the predictions of acetate, phosphate, PHA and glycogen in the experiments obtained by Acevedo *et al.* (2012). Grey triangles: $K_{S,Y_{PAO}} = 0.02$, $K_{S,Y_{PO_4}} = 0.06$ and $K_{S,Y_{GLY}} = 0.02$; Black squares: $K_{S,Y_{PAO}} = 0.02$, $K_{S,Y_{PO_4}} = 0.02$ and $K_{S,Y_{GLY}} = 0.02$; White dots: $K_{S,Y_{PAO}} = 0.03$, $K_{S,Y_{PO_4}} = 0.03$ and $K_{S,Y_{GLY}} = 0.03$.

Table 6.1: Stoichiometric parameters of the proposed model.

Parameter	Value	Units	References
Y_{PHA}^{PAO}	1.33	Cmmol/Cmmol	Smolders <i>et al.</i> (1994) (pH=7.5)
Y_{PHA}^{GAO}	1.88	Cmmol/Cmmol	Zeng <i>et al.</i> (2003) (pH=7.5)
Y_{GLY}^{PAO}	0.50	Cmmol/Cmmol	Smolders <i>et al.</i> (1994) (pH=7.5)
Y_{GLY}^{GAO}	1.18	Cmmol/Cmmol	Zeng <i>et al.</i> (2003) (pH=7.5)
$Y_{PO_4}^{PAO}$	0.65	Cmmol/Cmmol	Smolders <i>et al.</i> (1994) (pH=7.5)
$K_{S,Y_{PHA}}^{PAO}$	0.03	Cmmol/Cmmol	This study
$K_{S,Y_{GLY}}^{PAO}$	0.03	Cmmol/Cmmol	
$K_{S,Y_{PO_4}}^{PAO}$	0.03	Cmmol/Cmmol	

6.3.2 Kinetic

The kinetic processes are similar to the ones described by López-Vázquez *et al.* (2009), with some modifications that will be described in this section. The kinetic process of anaerobic acetate uptake was modified according to the experimental observations (Acevedo *et al.*, 2012) in order to describe PAO performing GAM, i.e. taking up acetate without polyphosphate as energy source but at a lower rate than with polyphosphate. Therefore, in equation 6.8 the polyphosphate dependency

Table 6.2: Stoichiometric matrix.

(a)

Process	Components			
	1	2	3	4
	S_{O_2}	S_{CO_2}	S_{HAc}	S_{PO_4}
Anaerobic acetate uptake	-	$Y_{CO_2}^{PAO} + (Y_{CO_2}^{GAO} - Y_{CO_2}^{PAO}) \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$	-1	$Y_{PO_4}^{PAO} \times \frac{f_{PP,PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$
Anaerobic maintenance	-	$Y_{CO_2}^{GAO} \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$		$1 \times \frac{f_{PP,PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$

(b)

Process	Components			
	5	6	7	8
	X_{PHA}^{PAO}	X_{GLY}^{PAO}	X_{PP}^{PAO}	X_{PAO}
Anaerobic acetate uptake	$Y_{PHA}^{PAO} + (Y_{PHA}^{GAO} - Y_{PHA}^{PAO}) \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$	$-Y_{GLY}^{PAO} - (Y_{GLY}^{GAO} - Y_{GLY}^{PAO}) \times \frac{K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}$	$-Y_{PO_4}^{PAO} \times \frac{f_{PP,PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$	-
Anaerobic maintenance	$Y_{PHA}^{GAO} \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$	$-1 \times \frac{K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}$	$-1 \times \frac{f_{PP,PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$	-

(f_{PP_PAO}) was removed and a switching function was included in the glycogen dependent term, in order to reduce the acetate uptake rate at low poly-P content. Furthermore, the experimental results showed a clear reduction in the aerobic PHA degradation rate at low poly-P content. This observation was mathematically included by adding a switching function to change the half saturation constant for PHA consumption from PAM to a typical GAM at low poly-P (Equation 6.9). The kinetic parameters shown in equation 6.8 and equation 6.9 are described in Appendix A.

6.4 Results and discussion

The proposed model was applied to describe the six experiments reported in Acevedo *et al.* (2012) as well as the study carried out by Zhou *et al.* (2008). Table 6.3 shows the experiments considered for model calibration and validation and the ratio of f_{PP_PAO} for each case. Specifically, two experiments were used for model calibration: one experiment with high poly-P storage (f_{PP_PAO} ratio of 0.23 Pmmol/Cmmol) and the other one without poly-P (f_{PP_PAO} ratio of 0 Pmmol/Cmmol). These two experiments were considered for calibration because both experiments comprise the two metabolic pathways considered in the model: typical PAM with a highly enriched PAO population filled with poly-P, and the typical GAM performed also by a highly enriched PAO culture, but in this case without poly-P. On the other hand, the five experiments considered for model validation (see table 6.3) range over all possible metabolic PAO behaviour: typical PAM (f_{PP_PAO} ratio of 0.25 and 0.20 Pmmol/Cmmol) transition between PAM and GAM metabolism (f_{PP_PAO} ratio of 0.17 and 0.05 Pmmol/Cmmol) and typical GAM (f_{PP_PAO} ratio of 0 Pmmol/Cmmol).

The calibration and validation of the experiments were carried out by simulating the anaerobic and the aerobic phases separately in order to assess the capacity of the model to characterise each phase using an appropriate initial estimate of the storage polymer compounds in each case.

6.4.1 Model calibration: kinetic parameters

The kinetic parameters calibrated in the anaerobic processes were: the anaerobic acetate uptake rate ($q_{S,HAc}^{max}$), the half-saturation constant for acetic acid $K_{S,HAc}$, the half-saturation constant for glycogen $K_{S,GLY}^{PAO}$ and the new half saturation constants included in the glycogen switching function to PAM and GAM ($K_{S,GLY}^{PAM}$ and $K_{S,GLY}^{GAM}$). On the other hand, the kinetic parameters calibrated in the aerobic processes were: the new half saturation constants included in the PHA consumption process to describe the shift from PAM to GAM ($K_{S,PHA_{aer}}^{GAM}$ and $K_{S,PHA_{aer}}^{PAM}$) and the glycogen accumulation rate (q_{GLY}^{PAO}). All the kinetic parameters were estimated

$$q_{S,HAc}^{max} \times M_{S,HAc} \times \frac{f_{GLY,PAO}}{f_{GLY,PAO} + E} \times \frac{f_{PHA,PAO}^{max} - f_{PHA,PAO}}{f_{PHA,PAO}^{max} - f_{PHA,PAO} + K_{S,PHA}} \times (1 - M_{O_2}) \times X_{PAO} \quad (6.8)$$

$$q_{PHA}^{PAO} \times (f_{PHA,PAO})^{\frac{2}{3}} \times \frac{f_{PHA,PAO}}{f_{PHA,PAO} + \left(K_{S,PHA,aer}^{PAM} + (K_{S,PHA,aer}^{GAM} - K_{S,PHA,aer}^{PAM}) \times \frac{K_{S,PHA,aer}^{PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,PHA,aer}^{PAO}} \right)} \times M_{O_2} \times X_{PAO} \quad (6.9)$$

where :

$$M_{S,HAc} : \frac{S_{HAc}}{S_{HAc} + K_{S,HAc}} \quad E : \left(K_{S,GLY}^{PAM} + (K_{S,GLY}^{GAM} - K_{S,GLY}^{PAM}) \times \frac{K_{S,GLY}^{PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,GLY}^{PAO}} \right) \quad M_{O_2} : \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{S,O_2}}$$

Table 6.3: Experiments used for model calibration and validation.

Experiment	f_{PP_PAO} (Pmmol/Cmmol)	Model use	Reference
1	0.23	Calibration	Acevedo <i>et al.</i> (2012)
2	0.25	Validation	
3	0.20	Validation	
4	0.17	Validation	
5	0.05	Validation	
6	0.01	Calibration	
7	0.005	Validation	Zhou <i>et al.</i> (2008)

with AQUASIM by minimizing the sum of the squares of the weighted deviations between measurements and calculated model results. Table 6.4 shows the values of the kinetic parameters used in the calibration.

The results of the predictions of the calibrated model for experiments 1 and 6 are shown in figure 6.3. As can be observed, the calibrated model was able to simulate accurately the performance of PAOs with its classical metabolism (Exp.1: high poly-P concentration 0.23 Pmmol/Cmmol) and PAOs behaving as GAOs performing GAM (Exp.6: low poly-P concentration 0 Pmmol/Cmmol) under anaerobic and aerobic conditions with the same model and parameter values.

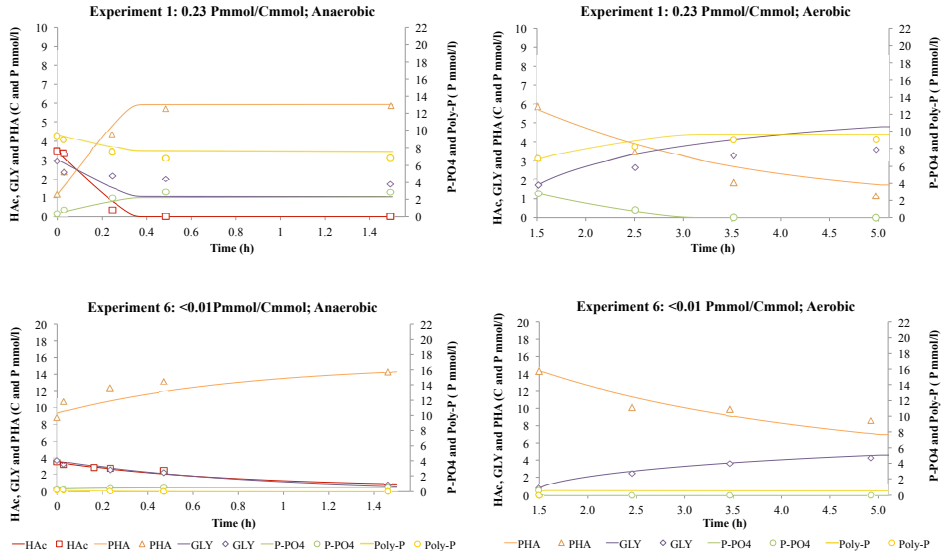
**Figure 6.3:** Model calibration results for experiments 1 and 6. Dots are experimental results and solid lines are simulation results.

Table 6.4: Kinetic parameters implemented in this study.

Parameter		Value	Units	Reference
Maximum anaerobic acetate uptake rate	$q_{S,HAc}^{max}$	0.37	Cmmol/(Cmmol/h)	
Acetate half saturation constant in the anaerobic acetate uptake process	$K_{S,HAc}$	0.1	Cmmol/Cmmol	
Glycogen half saturation constant for PAM in the anaerobic acetate uptake process	$K_{S,GLY}^{PAM}$	0.001	Cmmol/Cmmol	This study
Glycogen half saturation constant for GAM in the anaerobic acetate uptake process	$K_{S,GLY}^{GAM}$	0.3	Cmmol/Cmmol	
Glycogen half saturation constant in the anaerobic acetate uptake process	$K_{S,GLY}^{PAO}$	0.005	Cmmol/Cmmol	
Anaerobic maintenance rate	m_{ana}	2.35×10^{-3}	ATP-mmol/(Cmmol/h)	López-Vázquez <i>et al.</i> (2009)
Aerobic PHA degradation rate	q_{PHA}^{PAO}	0.8	Cmmol/(Cmmol/h)	
PHA half saturation constant for PAM in the aerobic PHA degradation process	$K_{S,PHAaer}^{PAM}$	0.01	Cmmol/Cmmol	
PHA half saturation constant for GAM in the aerobic PHA degradation process	$K_{S,PHAaer}^{GAM}$	8	Cmmol/Cmmol	This study
Aerobic glycogen production rate	q_{GLY}^{PAO}	0.17	Cmmol/(Cmmol/h)	
Aerobic Poly-P formation rate	q_{pP}^{PAO}	0.02	Pmmol/(Cmmol/h)	
Aerobic maintenance rate	m_{aer}	^a	Cmmol/(Cmmol/h)	López-Vázquez <i>et al.</i> (2009)

$$^a \frac{0.228}{6 \left(\frac{X_{PHB}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}} + \frac{2 \frac{X_{PHV}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}}}{5} \right) + 27 \left(\frac{X_{PHB}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}} + \frac{2 \frac{X_{PHV}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}}}{5} \right) \times 1.85 + 2 \left(\frac{X_{PH2MV}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}} + \frac{3 \frac{X_{PHV}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}}}{5} \right) + 4 \left(\frac{X_{PH2MV}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}} + \frac{3 \frac{X_{PHV}^{PAO}}{X_{PHA}^{PAO}}}{5} \right) 1.85}$$

6.4.2 Model validation

Figure 6.4 shows the results of the predictions of the validated model for experiments 2, 3, 4, 5 and 7 (see table 6.3). As can be seen in figure 6.4, the previously calibrated model was able to reproduce satisfactorily the performance of the reactor under different scenarios: two experiments with a high poly-P concentration performing the PAM (experiments 2 and 3 with 0.25 and 0.2 Pmmol/Cmmol respectively); two experiments with a lower poly-P concentration in a transition between PAM and GAM (experiments 4 and 5 with 0.17 and 0.05 Pmmol/Cmmol respectively) and the Zhou *et al.* (2008) experiment (experiment 7) with negligible poly-P concentration performing GAM.

The sensitivity analysis performed for each data set used for calibration and validation of the model is shown in the supplementary information (Appendix B). In order to prevent error propagation, the sensitivity analysis and the calculation of the global error was performed separately for the aerobic and anaerobic phases. The components considered were: S_{HAc} (anaerobic), S_{PO_4} , $X_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$, $X_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$ and $X_{\text{PP}}^{\text{PAO}}$. The sensitivity analysis measures the absolute change in the components considered for a 100 % change in each parameter analyzed with a standard deviation of 10 % (see equation 6.1).

The results of the sensitivity analysis show the dependence of the component concentrations to each of the parameters analyzed. As shown in Appendix B, the model is most sensitive to the parameter $q_{\text{s,HAc}}^{\text{max}}$ in all experiments and for all components. These results are in accordance with the fact that the components $X_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$, $X_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$, $X_{\text{PP}}^{\text{PAO}}$ and S_{PO_4} are highly dependent on the concentration of S_{HAc} and therefore the speed of its consumption. On the other hand, the model is sensitive to the new model parameter $K_{\text{S,GLY}}^{\text{GAM}}$ in the experiments with a low poly-P concentration. With regard to the sensitivity analysis of the half saturation constants included in the proposed stoichiometry of the anaerobic processes ($K_{\text{S},Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}}$, $K_{\text{S},Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}$, and $K_{\text{S},Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}}$), the results obtained (see Appendix B) clearly showed the model parameters to only be sensitive to either the $X_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$, $X_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$, or S_{PO_4} (and $X_{\text{PP}}^{\text{PAO}}$), respectively. Furthermore, the model is sensitive to the $K_{\text{S,PHA}_{\text{aer}}}^{\text{GAM}}$ parameter once the internal poly-P concentration decreases.

The error calculation was performed in the anaerobic phase for the following stoichiometric and kinetic parameters: $K_{\text{S},Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}}$, $K_{\text{S},Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}$, $K_{\text{S},Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}}$, $q_{\text{s,HAc}}^{\text{max}}$, $K_{\text{S,HAc}}$, $K_{\text{S,GLY}}^{\text{PAM}}$, $K_{\text{S,GLY}}^{\text{GAM}}$, and in the aerobic phase for $K_{\text{S,PHA}_{\text{aer}}}^{\text{PAM}}$, $K_{\text{S,PHA}_{\text{aer}}}^{\text{GAM}}$ and $q_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$. The results are shown in the supplementary information (Appendix C). In order to carry out the calculation of the error, the experimental data of HAc, GLY, PHA, PHB and PHV were compared to the model predictions using the NRMSD relation shown in equation 6.2. For these parameters, the results of this analysis show that the error does not represent significant variations with changes in the parameter values of $\pm 10\%$ and $\pm 50\%$. A very low error ($< 10\%$) was maintained

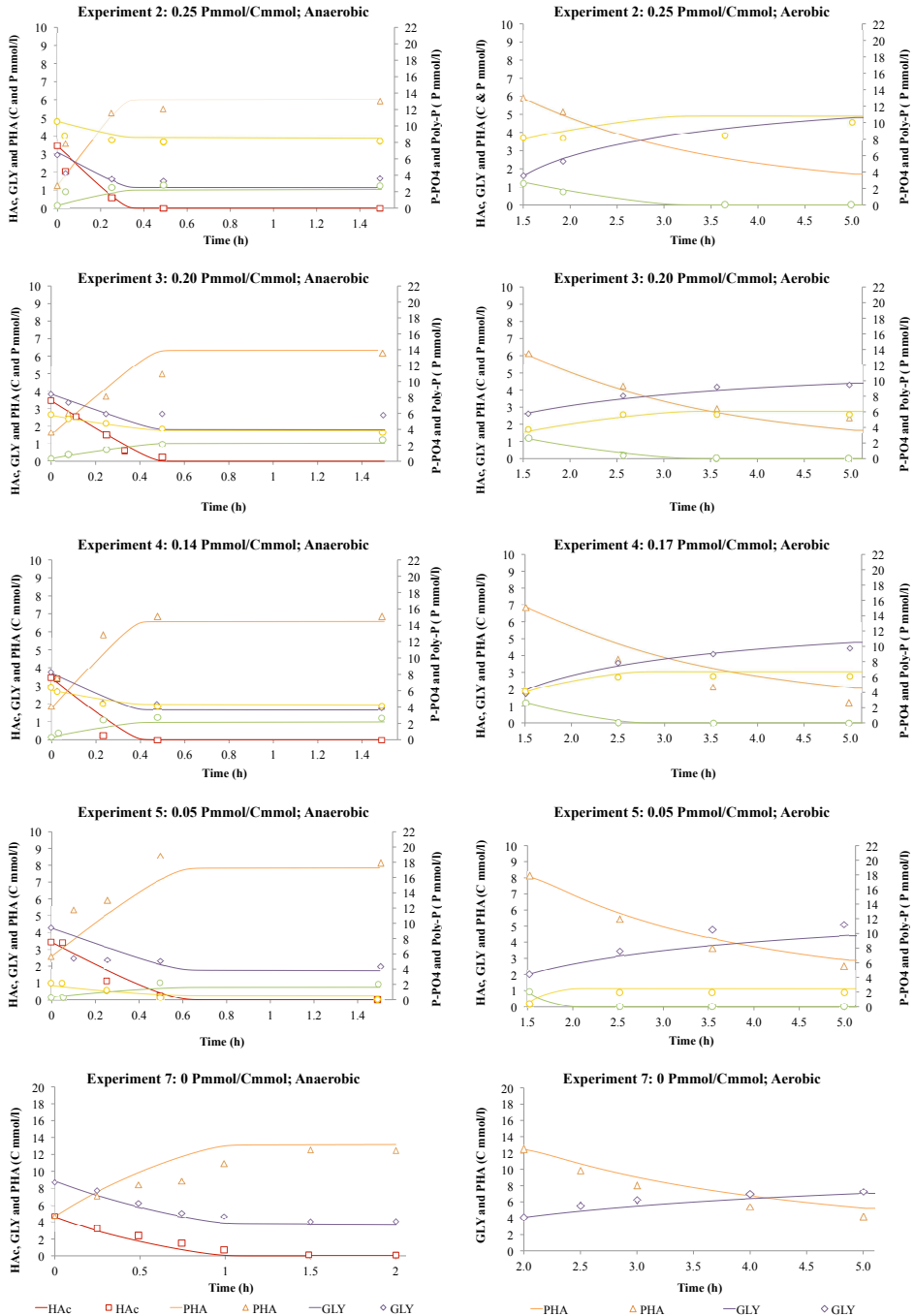


Figure 6.4: Model validation results for the experiments 2, 3, 4, 5 and 7. Dots are the experimental results and solid lines are the simulation results.

during both the calibration and validation of the model. Furthermore, it was observed that the error regarding the glycogen is higher in the experiments with high poly-P, because the concentrations of glycogen are lower in the experiments with a high content of poly-P. This can be attributed to the measurement difficulties of glycogen as observed in other studies (Oehmen *et al.*, 2010; Murnleitner *et al.*, 1997; López-Vázquez *et al.*, 2009). While the sensitivity analysis performed in Appendix B pointed out the parameters that displayed the highest sensitivity relative to one another, it is noteworthy that the model continues to describe very well the experimental data even after changing model parameters by 50 %. Therefore, a change in the new stoichiometric or kinetic parameters in the anaerobic or aerobic phase has no significant impact on the ability of the model to describe the change from PAM to GAM. This supports the transferability of the model to describe the metabolism of PAOs under a wider range of situations that are encountered in EBPR plants (i.e. varying poly-P levels). Finally, it can be concluded that the model is robust, because a similarly good fit was achieved during both the calibration and validation of the model.

6.5 Conclusions

This paper presents an extension of the PAO metabolic model that simulates the ability of PAOs to switch from one metabolic pathway to another depending on the internal poly-P content. This pathway shift was modelled by introducing different Monod-type expressions in the stoichiometric and kinetic expressions to allow variation between different stoichiometric values ($Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}} - Y_{\text{PHA}}^{\text{GAO}}$, $Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}} - Y_{\text{GLY}}^{\text{GAO}}$ and $Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}$) and process kinetics, which describes the change from PAM to GAM. The model was calibrated and validated with seven experiments under different internal poly-P concentrations, and showed the ability to correctly predict the PAO metabolic shift at low poly-P concentrations. The sensitivity and error analysis showed that the model is robust and has the ability to describe satisfactorily the change from PAM to GAM, and thus, the EBPR process under a wider range of conditions.

Acknowledgements

This research work has been supported by the Generalitat Valenciana (GVPRE /2008/044) and the Polytechnic University of Valencia (PAID-06-08-3227), which are gratefully acknowledged. Special acknowledgements to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Mexico (CONACYT) No. 207966. Fundacao para a Ciencia e Tecnologia, Portugal is acknowledged through projects PTDC/AAC-AMB/120581/2010 and PEst-C/EQB/LA0006 /2013.

References

- Acevedo, B., A. Oehmen, G. Carvalho, A. Seco, L. Borrás, and R. Barat (2012). “Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage”. In: *Water Research* 46.6, pp. 1889–1900 (cit. on pp. 103–106, 109, 111, 113).
- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, A. Seco, and J. Ferrer (2006). “Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal”. In: *Water Science and Technology* 53.12, pp. 29–37 (cit. on p. 103).
- Erdal, U.G., Z.K. Erdal, G.T. Daigger, and C.W. Randall (2008). “Is it PAO-GAO competition or metabolic shift in EBPR system? Evidence from an experimental study”. In: *Water science and technology* 58.6, pp. 1329–34 (cit. on p. 103).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001). “A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 76, pp. 17–31 (cit. on p. 105).
- Henze, M., W. Gujer, T. Mino, T. Matsuo, M.C.M. Wentzel, and G.v.R. Marais (1995). *Activated Sludge Model No. 2. Scientific and Technical Report No. 3*. Tech. rep. IAWQ, London, UK. (cit. on p. 103).
- Henze, M., W. Gujer, T. Mino, T. Matsuo, M.C. Wentzel, G.v.R. Marais, and M.C.M. van Loosdrecht (1999). “Activated Sludge Model No.2d, ASM2d”. In: *Water Science and Technology* 39.1, pp. 165–182 (cit. on p. 103).
- Hu, Z., M.C. Wentzel, and G.A. Ekama (2007). “A general kinetic model for biological nutrient removal activated sludge systems: Model development”. In: *Biotechnology and bioengineering* 98.6, pp. 1242–1258 (cit. on p. 103).
- Lanham, A.B., A. Oehmen, A.M. Saunders, G. Carvalho, P.H. Nielsen, and M.A.M. Reis (2013). “Metabolic versatility in full-scale wastewater treatment plants performing enhanced biological phosphorus removal”. In: *Water Research* 47.19. Microbial ecology of drinking water and wastewater treatment, pp. 7032–7041 (cit. on p. 107).
- López-Vázquez, C.M., A. Oehmen, C.M. Hooijmans, D. Brdjanovic, H.J. Gijzen, Z. Yuan, and M.C.M. van Loosdrecht (2009). “Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature”. In: *Water Research* 43.2, pp. 450–462 (cit. on pp. 103, 107, 109, 114, 117).
- Martín, H.G., N. Ivanova, V. Kunin, F. Warnecke, K.W. Barry, C. McHardy A.C. and Yeates, S. He, A.A. Salamov, E. Szeto, E. Dalin, N.H. Putnam, H.J. Shapiro, Pangilinan J.L., I. Rigoutsos, N.C. Kyrpides, L.L. Blackall, K.D. McMahon, and P. Hugenholtz (2006). “Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities”. In: *Nature Biotechnology* 24, pp. 1263–1269 (cit. on p. 103).
- Meijer, S.C.F. (2004). “Theoretical and practical aspects of modelling activated sludge processes”. PhD thesis. Delf University of Technology (cit. on p. 103).
- Mino, T., W.T. Liu, F. Kurisu, and T. Matsuo (1995). “Modeling glycogen-storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phos-

- phate removal processes". In: *Water Science Technology* 31, pp. 25–34 (cit. on p. 103).
- Murnleitner, E., T. Kuba, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1997). "An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal". In: *Biotechnology and Bioengineering* 54.5, pp. 434–450 (cit. on pp. 103, 117).
- Oehmen, A., P.C. Lemos, G. Carvalho, Z.G. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, and M.A.M. Reis (2007). "Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale". In: *Water Research* 41.11, pp. 2271–2300 (cit. on p. 103).
- Oehmen, A., C.M. Lopez-Vazquez, G. Carvalho, M.A.M. Reis, and M.C.M. van Loosdrecht (2010). "Modelling the population dynamics and metabolic diversity of organisms relevant in anaerobic/anoxic/aerobic enhanced biological phosphorus removal processes". In: *water research* 44.15, pp. 4473–4486 (cit. on pp. 104, 117).
- Pijuan, M., A. Oehmen, J.A. Baeza, C. Casas, and Z. Yuan (2008). "Characterizing the biochemical activity of full-scale enhanced biological phosphorus removal systems: A comparison with metabolic models". In: *Biotechnology and Bioengineering* 99.1, pp. 170–179 (cit. on p. 107).
- Reichert, P. (1994). "AQUASIM - A tool for simulation and data analysis of aquatic systems". In: *Water Science and Technology* 30.2, pp. 21–30 (cit. on p. 104).
- Rieger, L., G. Koch, M. Kühni, W. Gujer, and H. Siegrist (2001). "The EAWAG Bio-P module for activated sludge model No. 3". In: *Water research* 35.16, pp. 3887–3903 (cit. on p. 103).
- Smolders, G.J.F., J. Vandermeij, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1994). "Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence". In: *Biotechnology and Bioengineering* 43, pp. 461–470 (cit. on pp. 103, 105, 107, 109).
- Smolders, G.J.F., M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1995). "A metabolic model for the biological phosphorus removal process". In: *Water Science and Technology* 31.2. Modelling and Control of Activated Sludge Processes, pp. 79–93 (cit. on p. 107).
- Veldhuizen, H.M. van, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1999). "Modelling biological phosphorus and nitrogen removal in a full scale activated sludge process". In: *Water Research* 33.16, pp. 3459–3468 (cit. on p. 103).
- Zeng, R. J., Z. Yuan, and J. Keller (2003). "Model-based analysis of anaerobic acetate uptake by a mixed culture of polyphosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms". In: *Biotechnology and Bioengineering* 83.3, pp. 293–302 (cit. on pp. 103, 105, 107, 109).
- Zhou, Y., M. Pijuan, R.J. Zeng, L. Huabing, and Z. Yuan (2008). "Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)?" In: *Water Research* 42, pp. 2361–2368 (cit. on pp. 103, 111, 113, 115).

Zuthi, M.F.R., W.S. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem, and F.I. Hai (2013). “Enhanced biological phosphorus removal and its modeling for the activated sludge and membrane bioreactor processes”. In: *Bioresource Technology* 139, pp. 363–374 (cit. on p. 103).

Chapter 7

The metabolic versatility of PAOs as an opportunity to obtain a highly P-enriched stream for further P-recovery

B. Acevedo^a, C. Camiña^a, J.E. Corona^a, L. Borrás^b, R. Barat^{a1}

^a Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022. Valencia. Spain (e-mail: brecju@posgrado.upv.es, carcaur@etsid.upv.es, jecomen@posgrado.upv.es, rababa@dihma.upv.es)

^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia. Doctor Moliner, 50. 46100 – Burjassot. Valencia. Spain (e-mail: luis-borras-falomir@uv.es)

ABSTRACT

The effects of two sequencing batch reactor operation strategies for phosphorus stream enrichment over the biological phosphorus removal performance have been studied. The objective of both strategies is of performing an extraction cycle in order to obtain a new stream highly enriched with phosphorus. In the 1st strategy the amount of influent volatile fatty acids (VFAs) is the same in each cycle; while in the 2nd strategy the influent VFAs concentration is increased during phosphorus extraction experiments. Despite the strong decrease of the stored poly-P inside

¹In: *Chemical Engineering Journal* 270(2015) pp. 459-467. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.063>

the cells in both strategies after the recovery cycles, the ability of the systems to remove phosphorus was not affected. The $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio (changing from 0.73 to 0.21 Pmmol/Cmmol) together with FISH analyses (around 85 % of *Accumulibacter* through the experimental period) confirmed that a shift from PAM to GAM occurred after phosphorus enrichment in the 2nd strategy experiments. These results suggest that energy required for VFA uptake by polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) was not only derived from polyphosphates degradation, but also from glycogen degradation. FISH also revealed that Type II *Accumulibacter* species are responsible of the metabolic shift. The strategy based on increasing influent VFAs concentration during phosphorus extraction experiments showed a higher extraction efficiency (from 46 % to 76 %), as higher phosphorus concentration within supernatant can be achieved (from 113.9 to 198.7 Pmg/l). Following this strategy, it is possible to concentrate up to 81 % of the incoming phosphorus in a single enriched stream. This suggests that, despite the extra addition of carbon source needed (9 %), this strategy is more appropriate if phosphorus recovery for reuse purposes is required.

7.1 Introduction

Phosphorus (P) is essential for all life and is a key element in fertilizers to increase crop yields not existing any other component that can substitute P in food production. Yet the world's main source of P (phosphate rock) is non-renewable and is becoming increasingly scarce and expensive. Phosphorus peak was estimated to occur by 2035, after which its demand would outstrip supply (Cordell *et al.*, 2009).

Approximately 17 % of the total P in phosphate rock mined specifically for food production is lost in human excreta via wastewater (approximately 3 million tonnes of elemental phosphorus per year), which should be removed before its final disposal in inland and coastal waters in order to prevent eutrophication (Cordell, 2010). The classical biological P removal technology (Mino *et al.*, 1998) currently is presented as an opportunity not only for P removal but also for P recovery and therefore provides a possible solution for the phosphate rock scarcity in a near future. PAOs are the group of microorganisms primarily responsible for the P removal process. PAOs are equipped with a polyphosphate accumulating metabolism under alternating anaerobic-aerobic/anoxic conditions. Under these operational conditions PAOs are able to internally store the soluble P present in the raw wastewater as polyphosphate (poly-P). All the P-recovery technologies from PAOs pass through a previous P extraction before its final recovery mainly as struvite.

According to Yuan *et al.*, 2012 there are a number of ways to recover P from sludge including: (a) direct application of dewatered biosolids to the soil; (b) release of

P from Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) sludge by biological methods followed by recovery through chemical methods; and (c) release of P from EBPR sludge by thermal-chemical methods, followed by either utilization of residue, or further processing for recovery. However, these methods are focused on recovering P in the sludge line of the wastewater treatment plants (WWTP) after the anaerobic digestion. This operation mode entails some disadvantages such as not being able to prevent an uncontrolled precipitation inside the digester and the downstream sludge management devices due to an important P release and pH increase during digestion (Doyle *et al.*, 2002). Other processes based on P recovery in the water line are the Phostrip process (Levin *et al.*, 1987) and the BCFS process (Loosdrecht *et al.*, 1998). The Phostrip and BCFS process are technologies that besides achieving the phosphate effluent standards also recovers P from wastewater in the water line. However, this technology requires a phosphate stripping and further separation in a specific settler. One of the bottlenecks of this technology is that the phosphate concentration achieved in the stripper stream is not high enough to assure a high P recovery efficiency in a later crystallization process (around 25 Pmg/l in the anaerobic phase, see (Barat *et al.*, 2006)). Other studies, recently published, studied the feasibility of the P recovery as P enriched stream in the water line using different configurations (Hiroya *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014).

On the other hand, different studies (Acevedo *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008) showed that the stripping of P in a Sequencing Batch Reactor (SBR) operated for EBPR could provide a highly enriched stream with soluble P after a decanting period and withdrawal at the end of the anaerobic stage. As the key point of these operation mode consists in achieving a very high P extraction during the SBR operation cycle, polyphosphate (poly-P) was expected to reach low level concentrations and therefore to reduce considerably the main PAOs energy source. Under these conditions, traditionally deterioration of P removal process was expected to occur due to the upgrowth of GAOs which use glycogen as energy source instead of poly-P (Oehmen *et al.*, 2007). While GAO metabolism is based on the use of glycolysis to produce ATP for HAc consumption under anaerobic conditions, PAOs use the hydrolysis of intracellular poly-P and the consequent release of phosphate for the same purpose. However, the same studies (Acevedo *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008) demonstrated the versatility of PAOs metabolism when these bacteria are starved for poly-P due to the P extraction. These authors observed that PAOs are able to resist under extreme conditions without poly-P during short periods when this component is removed from the bacteria.

Therefore, a new SBR-EBPR operation performance, consisting on the stripping of P in a SBR operated for EBPR, would provide a P recovery stream with low cost and high potential P recovery.

However, it is necessary to experimentally evaluate this potential P recovery and the effect of this new operation mode over the biological P removal process over

time. Therefore, the aim of this paper is to carry out P extraction cycles following two different strategies (keeping influent VFAs concentrations constant or increasing them) with a SBR operated for EBPR, in order to: know the potential P recovery of the proposed new SBR operation mode and to study its effect over the biological P removal performance: process efficiency and microbial population dynamics.

7.2 Materials and methods

7.2.1 Experimental device

A laboratory scale SBR (total volume of 7 l) was operated under anaerobic-aerobic conditions for biological phosphorus removal. The SBR was operated with four 6-h cycle per day: filling period 4 min; anaerobic phase 1.5 h; aerobic phase 3.5 h; settling phase 52 min and withdrawing period 4 min. The phase length during some extraction cycles was modified as will be shown later.

The SBR was equipped with conductivity, ORP, pH, temperature and dissolved oxygen electrodes. The temperature was maintained at 20 ± 1 °C. Dissolved oxygen (DO) concentration in the aerobic phase was controlled between 1.5 and 2.5 O₂mg/l. Initial pH of the cycle was kept around 7.5 and it was not controlled but did vary from 7 to 8.5 during the different phases of the cycle. Synthetic wastewater was used during the experimental period with a COD/P ratio of 13.3 CODmg/Pmg (100 CODmg/l and 7.5 Pmg/l). Synthetic wastewater used consisted of two solutions: the first one contained mineral compounds including K₂HPO₄ whilst the other one contained acetate and NH₄Cl (for detailed description of the SBR configuration and wastewater see (Barat *et al.*, 2008)). Allylthiourea was added in a concentration of 2 mg/l in order to inhibit nitrification. The Solid Retention Time (SRT) and Hydraulic Retention Time (HRT) were kept constant around 10 d and 12 h, respectively.

In both strategies, the reactor was seeded with sludge from a real WWTP with biological phosphorus removal by means of an A/O scheme located in Valencia (Spain). The WWTP treated 33785 m³ per day, and it was operated at a SRT of 10 days. The SBR was operated for approximately two months for each strategy of the study to obtain a sludge enriched in PAO bacteria. Operational conditions during the first strategy were maintained with no change. During some experiments of the second strategy, however, increases in length of anaerobic and aerobic phases were implemented aiming to achieve either complete VFAs uptake and glycogen regeneration.

7.2.2 Experimental design

During the experiments, an extraction cycle (hereafter known as recovery cycle) was made in order to obtain a new stream highly enriched with P. The different stages of this cycle are shown in figure 7.1. The SBR was filled with synthetic wastewater and operated under anaerobic conditions. The sludge was settled in order to obtain an effluent highly enriched in phosphate after achieving complete VFAs uptake and consequently an increase in the amount of soluble phosphate. Then, the maximum volume of the effluent was extracted and replaced with synthetic wastewater without acetate, following with aerobic conditions. Finally, the sludge was settled and the effluent was discharged.

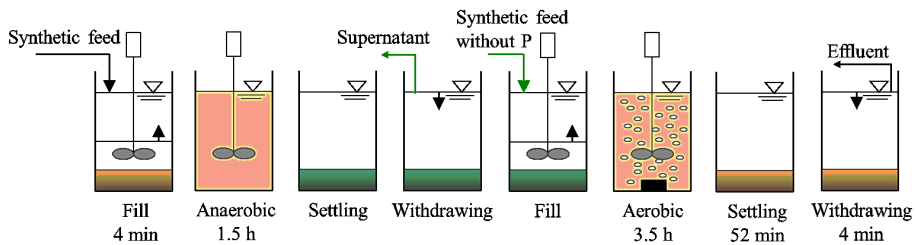


Figure 7.1: Stages implemented during the phosphorus recovery cycle.

The study was performed in two periods following different operation strategies:

- Slight and frequently P extraction (around 2 extractions per week): The first one involved adding the same amount of influent VFAs in each cycle (initial concentration in the reactor was equivalent to 100 HAcmg/l in each experiment). The goal of the experiments was to accomplish simple P extractions so as to obtain supernatant with high P concentration as frequently as possible.
- Strong and less frequently P extraction (1 extraction per week): The second one involved increasing influent VFAs concentration during P extraction experiment (initial concentration in the reactor was equivalent to 150, 250, 350, 350, 350 HAcmg/l in each experiment). The purpose of the experiments was to accomplish single P extraction in order to maximize P concentration within supernatant produced by the rise in VFAs concentration.

The experimental procedure of the study is presented in figure 7.2. During the first strategy, four experiments were accomplished during 15 days. A recovery time of 6 days was necessary after completion of the first experiment due to a failure in temperature control. For the remaining experiments the recovery time was roughly 2 days. In contrast, during the second strategy 5 experiments were completed with a recovery time of approximately 7 days.

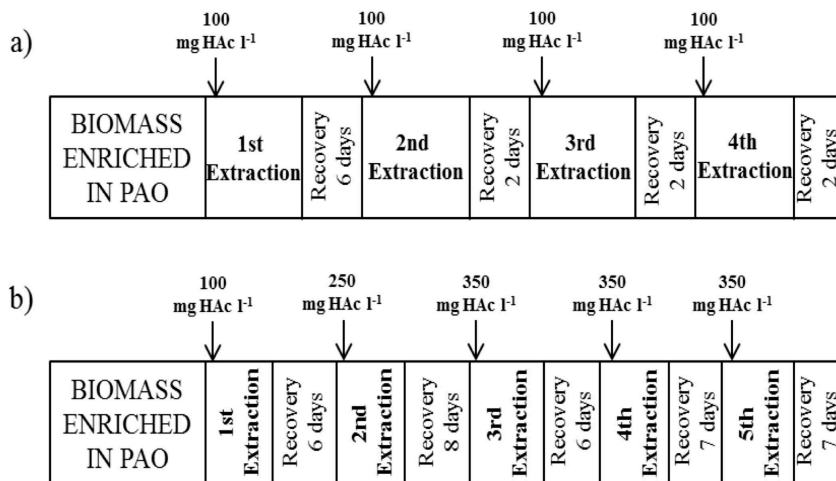


Figure 7.2: Experimental design for (a) first strategy and (b) second strategy of the study.

7.2.3 Analytical methods and microbial techniques

Experimental analysis was structured in 3 parts where phosphorus recovery cycle and cycles before and after recovery cycle were studied. A monitoring of the concentrations of VFAs and phosphate was made at least at the start of the cycle, end of anaerobic and aerobic phases. Samples were filtered through a $0.45\ \mu\text{m}$ filter for these analyses. Moreover total phosphorous (P_T), total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were also measured at the end of the anaerobic and aerobic phase. Samples for fluorescence in situ hybridization (FISH) were collected during aerobic phases.

VFAs were measured as proposed by Moosbrugger *et al.*, 1992 using a Metrom 716 DMS tritino. Phosphorus analyses were carried out according to Standard Methods (Eaton *et al.*, 2005) using a Lachat QuikChem800 flow injection analyzer. P_T , TSS and VSS were performed in accordance with Standard Methods (Eaton *et al.*, 2005).

FISH technique was applied in order to study the population dynamics of PAOs as: PAOmix, Type I PAO and Type II PAO; and GAOs in the reactors. Cell hybridization was performed as described by Amann *et al.*, 1990. The rRNA oligonucleotide probes used for FISH are listed in table 7.1. Some probe associations were made for covering the adequate ranges: PAOmix (PAO462, PAO651, PAO846), DEFmix (TFO_DF218, TFO_DF618), DEF2mix (DF1020, DF988, H966, H1038) and EUBmix (EUB338, EUB338 II, and EUB338 III). EUBmix probes were labelled with FAM while the rest of the probes were labelled with TAMRA. All probes were used at a 35% formamide concentration. Hybridized cells were enumerated by means

of capturing images with an epifluorescence microscope Leica DM2500 and a Leica DFC420c digital camera, using a software for image analysis (Borrás, 2008). A minimum of 20 randomly chosen microscopic fields were quantified from each sample. Each of the images was examined to determine the optimum threshold values for each fluorochrome. The countable pixel area of the specific probe-fluorochrome signal (Type I and Type II PAO, PAOmix, GB, DEFmix or DEF2mix probes) was then expressed as a mean percentage of the pixel area count from the EUBmix probe signal. Error of the quantification was calculated by dividing the standard deviation by the square root of “n”, where “n” is the number of fields examined.

Table 7.1: Oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Sequence (5' → 3')	Specificity	Reference
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetes</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	
PAO 462	CCGTCACTACWCAGGGTATTAAC	<i>Rhodocyclus tenuis</i> subgroup	Crocetti <i>et al.</i> , 2000
PAO 651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>	
PAO 846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	<i>Rhodocyclus tenuis</i> subgroup	
Acc-I-444	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	Clade IA and other Type I clades	Flowers <i>et al.</i> , 2009
Acc-II-444	CCCGTGCAATTTCTTCCCC	Clade IIA, IIC and IID as Type II clades	
GB	CGATCCTCTAGCCCACT	<i>Gammaproteobacterial</i> GAO group	Kong <i>et al.</i> , 2002
TFO_DF218	GAAGCCTTTGCCCTCAG	<i>Deftuviococcus</i> -related (cluster 1)	Wong <i>et al.</i> , 2004
TFO_DF618	GCCTCACTTGTCTAACCG	<i>Deftuviococcus</i> -related (cluster 1)	
DF1020	CCGGCCGAACCGACTCCC	<i>Deftuviococcus</i> -related (cluster 2)	Meyer <i>et al.</i> , 2006
DF988	GATACCAGCCCATGTCAAGGG	<i>Deftuviococcus</i> -related (cluster 2)	
H966	CTGTAAAGGTTCTGCGCGTTGC	DF988 helper	
H1038	AGCAGCCATGCAGCACCTGTGTGGCGT	DF988 helper	

7.3 Results and discussion

An example of the resulting profiles for conductivity, pH, VFAs and orthophosphates ($P-PO_4$) obtained for the recovery cycle and the cycles before and after this one during both strategies of the study are shown in figure 7.3. As can be seen from these figures, there is a reduction in P after the extraction of supernatant with high P concentration during the recovery cycle. Moreover, extraction itself apparently did not affect the EBPR processes due to the fact that profile's trend of cycles before and after the recovery cycle are similar. When comparing results obtained for both strategies, it was noted that the higher the initial VFAs concentration (100 CODmg/l and 350 CDOmg/l in the 1st and 2nd strategy respectively), the higher P concentration could be obtained and therefore potentially recovered (70 $P-PO_4$ mg/l and 170 $P-PO_4$ mg/l in the 1st and 2nd strategy respectively).

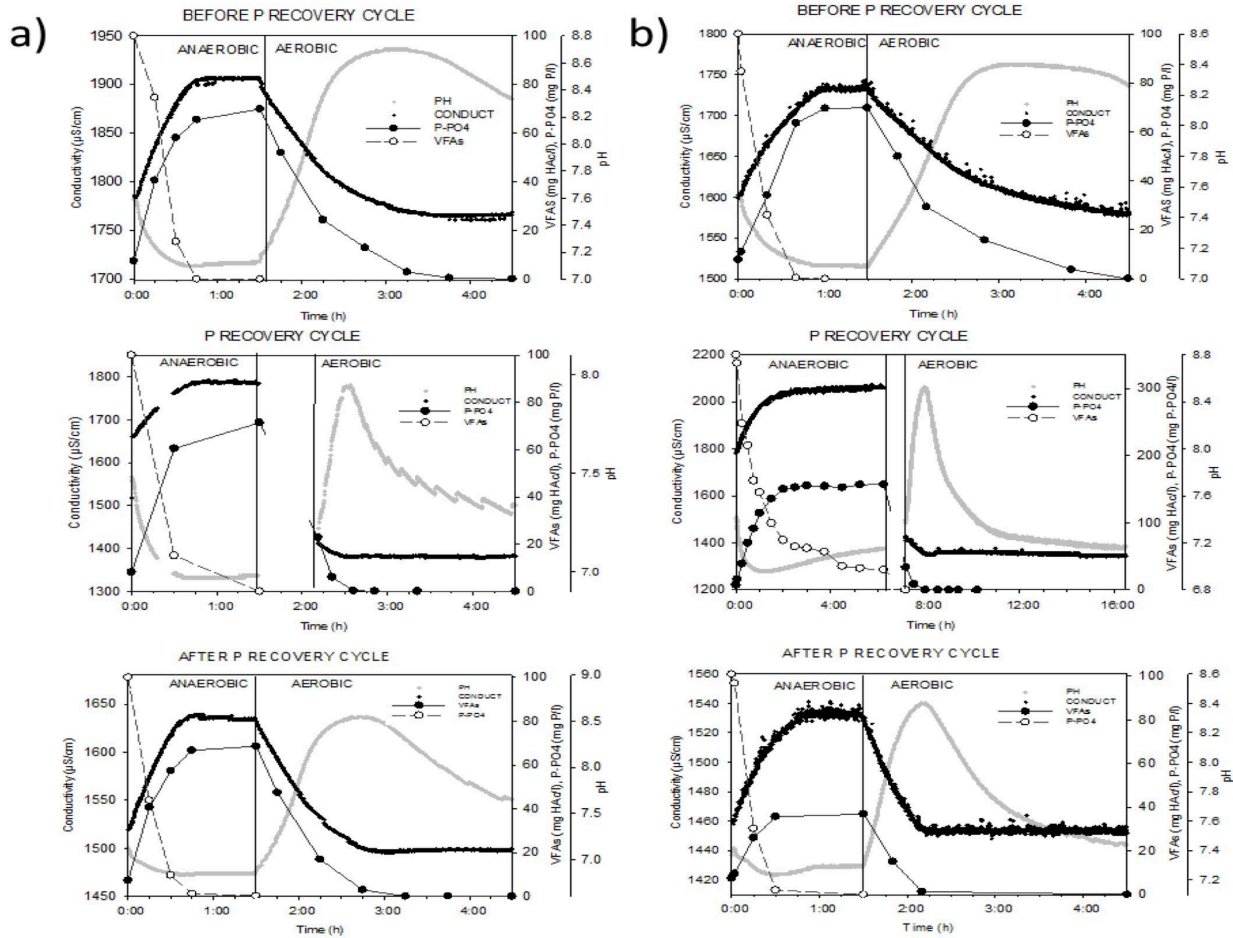


Figure 7.3: VFAs, P-PO₄, pH, and conductivity variations during P recovery cycle and the cycles before and after this for a) the first strategy, b) the second strategy of the study.

7.3.1 Biological process performance

As previously mentioned, the effect of the new SBR-EBPR operation mode over biological process performance has been studied.

Commonly the $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio is used in order to indicate the presence of poly-P or glycogen accumulating metabolism. In this study, $P_{\text{release}}/HAc_{\text{uptake}}$ ratio and the evolution of phosphorus during the experimental phase have been determined to evaluate the biological process performance. Moreover, it is highly interesting to identify and quantify PAOs and GAOs by means of FISH analysis to verify the effect of the P extraction over the microbial population dynamics. These results are shown in the following sections.

7.3.1.1 Phosphorus analysis

Results for phosphate ($P-PO_4$), total phosphorus (P_T) and VSS were used to make the phosphorus balance. Organic phosphorus (P_{org}) was estimated as 2% of the VSS (Inc., 2002). Poly-P in the system was calculated given the value for P_T and then subtracting $P-PO_4$ and P_{org} . Figure 7.4 shows trends in P_T , poly-P and $P-PO_4$ at the end of either anaerobic or aerobic phases during both strategies of the study. As can be seen in figure 7.4, P_T concentrations remarkably decreased due to extraction of phosphorus in enriched supernatant during the recovery cycles. In the first strategy, reductions of P_T are constant, while in the second strategy P_T reductions increased along the experiments, as expected by increasing the concentration of HAc. The concentrations of P_T before each extraction remained largely constant during the second strategy but not for the first one due to operational problems (mechanical failures with the electromagnetic valve of the waste sludge). Poly-P concentrations remarkably decreased when the recovery experiments were held (see table 7.2). As can be seen, phosphate at the end of aerobic phase remained under 0.5 Pmg/l during both strategies. Hence, the ability of the systems to remove P did not changed with the P extraction. Moreover, variations in poly-P due to extraction in the second strategy of the study were greater than those in the first one. Thus, P extraction was more aggressive during the second strategy. Poly-P concentration values after the extraction during last three experiments of this strategy were found to be less than 10 Pmg/l (almost 0 Pmg/VSSmg). Furthermore as can be seen in figure 7.4 b, seven days were enough in the second operation strategy to recover PAOs with poly-P between two consecutive extractions.

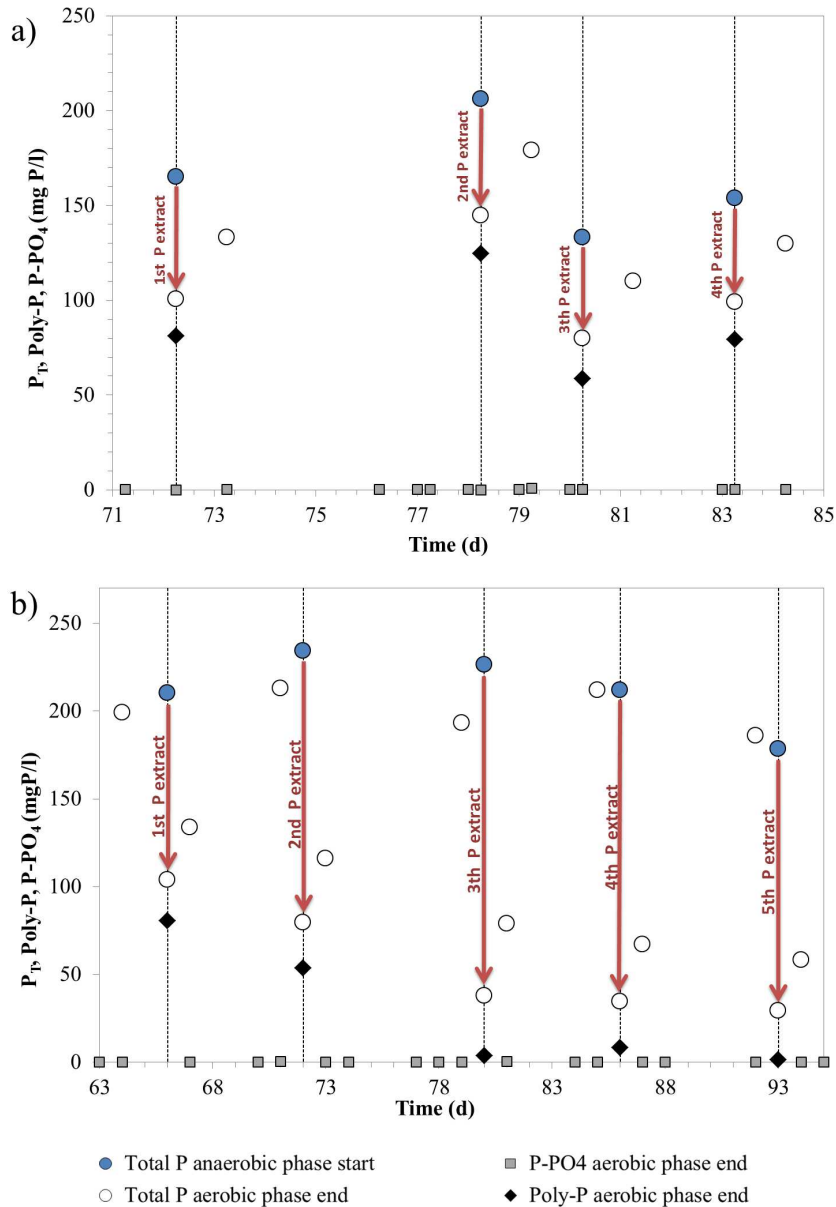


Figure 7.4: Evolution of phosphorus compounds during a) first strategy and b) second strategy of the study. The arrow indicates the phosphorus recovery ($-\Delta P_T$) for each extraction cycle.

Table 7.2: Efficiency of phosphorus extraction and poly-P reduction during experiments.

Strategy	Experiment	Start	P-PO ₄ (mg P/l)	End anaerobic	Poly-P (mg P/l)	Extraction efficiency ^a	
		Poly-P (mg P/l)		P _{org} (mg P/l)		% P extracted ^b	% Poly-P reduction ^c
1	1	145.5	72.4	15.4	81.1	38	37
	2	183.7	67.7	13.7	124.6	29	21
	3	111.5	60.5	14.1	58.6	39	36
	4	132	60.3	12.4	71.6	35	31
2	1	187.0	113.9	15.6	80.65	46	57
	2	208.5	162.5	18.2	53.69	59	74
	3	192	198.7	23.9	3.74	75	98
	4	185.6	184.8	19.1	8.17	75	96
	5	150.8	156.8	20.4	1.39	76	99

^a These values are referred to a normalized extraction volume of 85% of the total volume.

^b % P extracted = $\frac{P-PO_4 \text{ end anaerobic} \cdot 0.85 \cdot V_T}{P_T \text{ end anaerobic} \cdot V_T} \cdot 100$, where $P_T \text{ end anaerobic} = (P-PO_4 + P_{org} + Poly-P)_{\text{end anaerobic}}$.

^c % Poly-P reduction = $\left(1 - \frac{Poly-P_{\text{end anaerobic}}}{Poly-P_{\text{start}}}\right) \cdot 100$.

7.3.1.2 Yield for phosphorus release per HA_c consumption

Trends in $P_{\text{release}}/HA_{c\text{uptake}}$ ratio and $P-PO_4$ concentration at the end of an anaerobic phase for both strategies of the study are shown in figure 7.5. $P_{\text{release}}/HA_{c\text{uptake}}$ ratio and $P-PO_4$ did not change during the experimental phase of the first strategy despite the P extractions. However, in the second strategy, the trend of these parameters was to decrease after each extraction cycle. Then, progressive recovery of these values was achieved during successive days. Acevedo *et al.*, 2012, used the $P_{\text{release}}/HA_{c\text{uptake}}$ ratio to indicate the variations between PAM and GAM activities. Values between 0.48 and 0.80 Pmmol/l correspond to PAO enriched cultures (Smolders *et al.*, 1995; Kisoglu *et al.*, 2000). In contrast, values below 0.02 Pmmol/Cmmol are related to GAO enriched cultures. In the first strategy, the ratio was found to be above 0.52 Pmmol/Cmmol, thus, PAM was predominant. It is believed that a significant metabolic shift in PAOs did not take place during this strategy due to the fact that poly-P reduction was not high enough after P extraction. Nevertheless, as can be seen in figure 7.5 b corresponding to the second strategy, values for $P_{\text{release}}/HA_{c\text{uptake}}$ in the last three experiments decreased from approximately 0.64 Pmmol/Cmmol to 0.21 Pmmol/Cmmol confirming a clear and quick variation between PAM and GAM. These low ratio values obtained are not due to the presence of GAOs as FISH results showed (discussed later), but to the fact that almost all the poly-P storage was depleted during the extraction.

These observations are in accordance with other studies which showed that PAOs are able to behave like GAOs under different conditions. Zhou *et al.*, 2008 and Acevedo *et al.*, 2012 observed that PAOs could shift from PAM to GAM when poly-P depletion was imposed on the culture. Therefore, findings in the present work suggest that a shift from PAM to GAM occurred after P recovery experiments.

7.3.1.3 Microbial population dynamics

In order to verify that the P recovery experiments did not favor the growth of GAOs, the microbial dynamics population was studied using FISH. As can be seen in figure 7.6, biomass was highly enriched in *Accumulibacter* during experimental phase with approximately 70 % of total bacteria in the first strategy and 85 % in the second. In the first strategy of this study (Figure 7.6 a), *Competibacter* probes were used to determine percentage of GAO bacteria, whose value fell below 2 % of total bacteria. FISH results for the second one (Figure 7.6 b) showed that *Competibacter*, *Deftuvicoccus*-cluster 1 and *Deftuvicoccus*-cluster 2 were not present.

PAO Type I and Type II clades were also studied during both strategies. It was observed that initial predominant PAO species was Type II in both cases. In the first strategy, variations between Type I and Type II populations were not detected (data not shown), suggesting that slight and frequently P extraction does not

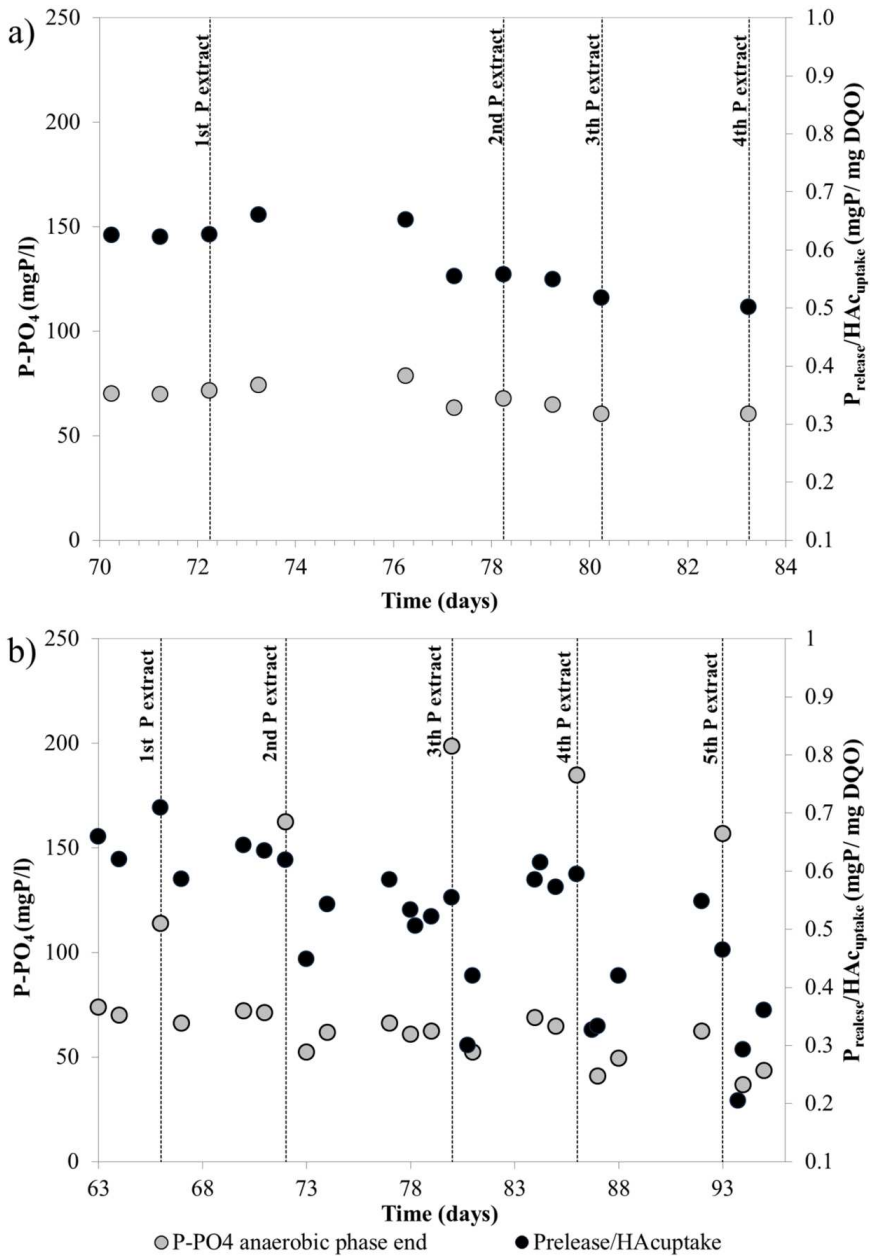


Figure 7.5: Evolution of YPO₄ and phosphate at the end of anaerobic phase for a) the first strategy, b) the second strategy of the study.

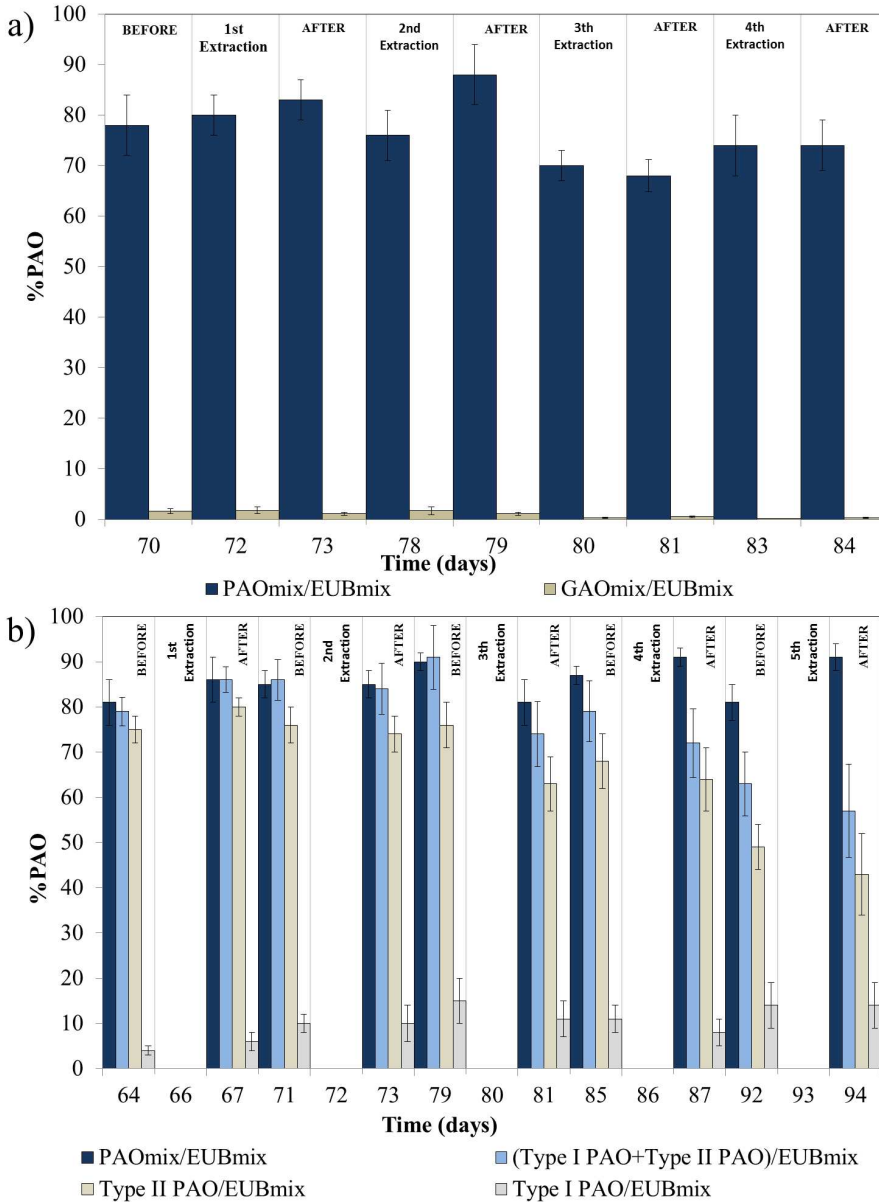


Figure 7.6: Population dynamics for a) PAOmix and GAOmix during first strategy, b) PAOmix, PAO Type I and PAO Type II during second strategy of the study.

affect PAO type population dynamic. Results for the second strategy (Figure 7.6 b) show that there was a change in the population dynamics of *Accumulibacter* species. Percentage for Type I remained constant whereas Type II decreased after the third experiment, which was the first of the series of high-efficiency extractions. Besides, sum of both types of PAOs was found to be lower than the total amount of *Accumulibacter* detected with PAOmix probe.

Previous studies showed an increase in PAO Type II as the poly-P content decreased (Acevedo *et al.*, 2012), suggesting that PAO Type II were the main responsible for the metabolic change. In Acevedo *et al.*, 2012 the initial biomass at the beginning of the experiments was: a high content of PAO Type I and a low content of PAO Type II (66 % and 8 %, respectively). Under strong P extraction conditions PAO Type II increased up to 36–48 % while Type I decreased up to 23 %. However, in the present study it was not observed a similar PAO behavior between Type I and Type II, probably because the PAO population distribution at the beginning of the experiments was clearly different between both studies. In the present study the starting point consisted on a biomass with a low content of PAO Type I and a high content of PAO Type II (4 % and 75 %, respectively). Regarding the Type I population, it remains quite stable at low levels during the whole experimental period (below 15 %) which agrees with the results obtained by Acevedo *et al.*, 2012, which suggested that the PAO Type I were not involved in the metabolic change at low Poly-P levels. On the other hand, PAO Type II decreased as poly-P content decreased due to the P extraction in the recovery cycles. However despite the PAO Type II reduction over the experiments with strong P extraction, its proportion was quite high (43 % in the strongest P extraction) which is in the range of the highest abundances found in Acevedo *et al.* (36–49 %). This suggests again, as in Acevedo *et al.*, 2012, that PAO Type II were responsible of the observed metabolic change. But its reduction along the experiments also suggested that a subgroup of PAO within PAO Type II group could be the responsible of the metabolic change while other PAO Type II disappeared as the poly-P content decreased.

Another aspect to be highlighted is that the sum of both types of PAOs was lower than the total amount of *Accumulibacter* detected with PAOmix probe specially during the last three experiments with complete poly-P extraction. These results are in accordance with Acevedo *et al.*, 2012 which suggested a growth of other PAO clades not included in the probes used in this study since percentage for PAOmix remained almost constant.

In conclusion, not only have both extraction strategies of this study proved not to affect P removal, but they also have evidenced not to promote GAO bacteria growth in EBPR system.

7.3.1.4 Potential P recovery

In order to evaluate the potential P extraction of the proposed new SBR operation mode, process efficiency for both strategies were studied and then compared to each other. Table 7.2 shows the percentages of P extraction and poly-P reduction followed in this study during both strategies. The average efficiency of extraction for the first strategy was approximately 35 % of total P at the start of cycle. During the last three extractions in the second strategy, roughly 75 % P was extracted from initial total P. Moreover, poly-P reduction was close to 99 % of initial poly-P in this experiments which evidence that phosphorus recovery was maximized (see table 7.2).

As can be seen in figure 7.7, an estimation of the overall result would be that recovery of 59 % of incoming P could be achieved when accomplishing two experiments per week following the first strategy. In contrast, when implementing the second strategy, 81 % recovery of incoming P in only one experiment could be attained weekly. However, this strategy entails an increment of the carbon source requirements of around 9 % per week. Despite the extra cost of carbon source, the second strategy showed having higher extraction efficiency due to the fact that a higher P concentration within supernatant can be achieved. Consequently, results obtained suggested that this strategy is more appropriate if phosphorus recovery for reuse purposes is required. Nevertheless, further research is needed in order to assess the long-term effect of the P extraction step and the economic feasibility of the second strategy. On the other hand, other authors obtained lower P recovery efficiencies, around 79 % (Xia *et al.*, 2014), 60 % (Barat *et al.*, 2006) and 70.2 % (Zou *et al.*, 2014) using a side stream system in the water line.

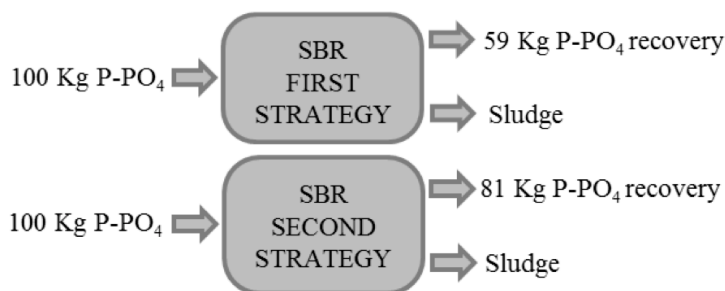


Figure 7.7: Weekly phosphate input and output from both strategies.

The next step for the application of this new operation mode in a SBR-WWTP aiming the final P-recovery will imply the treatment of the P enriched stream in a crystallization reactor for P recovery as struvite (Pastor *et al.*, 2008a). The struvite precipitation requires the presence of N, P and Mg in a molar ratio of 1:1:1. Despite the high P concentration in the supernatant obtained from the SBR, it will be necessary to increase the N and Mg concentration in order to achieve the

optimum molar ratio for its precipitation. The nitrogen source can be found from other streams present in the WWTP such as the supernatant obtained from the anaerobic sludge process, which is highly enriched in NH_4 and PO_4 also (Pastor *et al.*, 2008b). On the other hand, the Mg could be added as an external Mg source such as MgCl_2 or seawater (Martí *et al.*, 2010; Rubio-Rincón *et al.*, 2014).

7.4 Conclusions

Taking into account the results from this study, it can be concluded that none of the strategies used for P recovery had a negative impact on the biological process performance. Although a deterioration of the P removal process was expected to occur due to the poly-P reduction as well as an upgrowth of GAOs, the ability of the systems to remove P did not change with the extraction strategies even during the second strategy where P extraction was more aggressive. Microbiological observations confirmed that the low $\text{P}_{\text{release}}/\text{HAc}_{\text{uptake}}$ ratios obtained in the second strategy were due to the effect of low amount of poly-P available. This suggests that a shift from PAM to GAM occurred after P recovery experiments as the PAO energy required for the uptake of the VFA was necessarily not only derived from poly-P degradation, but also from glycogen degradation. FISH results for the second strategy also show that there was a change in the population dynamics of *Accumulibacter* species.

Comparing both strategies for P enrichment, the second one showed to have higher extraction efficiency. Following this strategy it is possible to recover up to 81% of the incoming P per week. Consequently, results obtained suggested that this strategy is more appropriate if P recovery for reuse purposes is required despite the extra cost of carbon source. However, further research is needed in order to assess the long-term effect of the P extraction step and the economic feasibility of the second strategy.

Acknowledgements

This research work has been supported by the Generalitat Valenciana (GVPRE/2008/044) and the Polytechnic University of Valencia (PAID-06-08-3227), which are gratefully acknowledged. Special acknowledgements to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) No. 207966.

References

- Acevedo, B., A. Oehmen, G. Carvalho, A. Seco, L. Borrás, and R. Barat (2012). “Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage”. In: *Water Research* 46.6, pp. 1889–1900 (cit. on pp. 123, 132, 135).
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl (1990). “Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations”. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56.6, pp. 1919–1925 (cit. on pp. 126, 127).
- Barat, R. and M.C.M. van Loosdrecht (2006). “Potential phosphorus recovery in a WWTP with the BCFS® process: Interactions with the biological process”. In: *Water Research* 40.19, pp. 3507–3516 (cit. on pp. 123, 136).
- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, J. Ferrer, and A. Seco (2008). “Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism”. In: *Water Research* 42.13, pp. 3415–3424 (cit. on p. 124).
- Borrás, L. (2008). «Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR». Tesis doct. Universidad Politécnica de Valencia (vid. pág. 127).
- Cordell, D. (2010). “The story of phosphorus: Sustainability implications of global phosphorus scarcity for food security”. PhD thesis. Linköping University Electronic Press (cit. on p. 122).
- Cordell, D., J.O. Drangert, and S. White (2009). “The story of phosphorus: Global food security and food for thought”. In: *Global environmental change* 19.2, pp. 292–305 (cit. on p. 122).
- Crocetti, G.R., P. Hugenholtz, P.L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L.L. Blackall (2000). “Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and design of 16 rRNA-directed probes for their detection and quantification”. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66, pp. 1175–1182 (cit. on p. 127).
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K-H. Schleifer, and M. Wagner (1999). “The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set”. In: *Systematic and Applied Microbiology* 22, pp. 434–444 (cit. on p. 127).
- Doyle, J.D. and S.A. Parsons (2002). “Struvite formation, control and recovery”. In: *Water Research* 36.16, pp. 3925–3940 (cit. on p. 123).
- Eaton, A.D. and M.A.H. Franson, eds. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. APHA (American Public Health Association). American Public Health Association (cit. on p. 126).
- Flowers, J.J., S. He, S. Yilmaz, D.R. Noguera, and K.D. McMahon (2009). “Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different *Candidatus Accumulibacter* clades”. In: *Environmental Microbiology Reports* 1.6, pp. 583–588 (cit. on p. 127).
- Hiroya, K., H. Masashi, Kenichi A., Tomonori K., Noriatsu O., and Akiyoshi O. (2013). “Phosphate recovery as concentrated solution from treated wastewater

- by a PAO-enriched biofilm reactor”. In: *Water Research* 47.6, pp. 2025–2032 (cit. on p. 123).
- Inc., Metcalf & Eddy (2002). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. Fourth. McGraw-Hill (cit. on p. 129).
- Kisoglu, Z., U. Erdal, and C.W. Randall (2000). “The effect of CODTP ratio on intracellular storage materials, system performance and kinetic parameters in a BNR system”. In: *Proceedings of the 73rd annual Water Environment Federation Technical Exposition and Conference*. Anaheim, California (cit. on p. 132).
- Kong, Y.H., S.L. Ong, W.J. Ng, and W.T. Liu (2002). “Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacteria group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes”. In: *Environmental Microbiology* 11, pp. 753–757 (cit. on p. 127).
- Levin, G.V. and U. Della Sala (1987). “Phostrip process viable answer to eutrophication of lakes and coastal sea waters in Italy”. In: *Biological Phosphate Removal from Wastewaters*. Pergamon Press Oxford, pp. 249–259 (cit. on p. 123).
- Loosdrecht, M.C.M. van, F.A. Brandse, and A.C. De Vries (1998). “Upgrading of waste water treatment processes for integrated nutrient removal-The BCFSS process”. In: *Water science and technology* 37.9, pp. 209–217 (cit. on p. 123).
- Martí, N., L. Pastor, A. Bouzas, J. Ferrer, and A. Seco (2010). “Phosphorus recovery by struvite crystallization in WWTPs: Influence of the sludge treatment line operation”. In: *Water Research* 44.7, pp. 2371–2379 (cit. on p. 137).
- Meyer, R.L., A.M. Saunders, and L.L. Blackall (2006). “Putative glycogen accumulating organisms belonging to Alphaproteobacteria identified through rRNA-based stable isotope probing”. In: *Microbiology*. 152, pp. 419–429 (cit. on p. 127).
- Mino, T., M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1998). “Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process”. In: *Water Research* 32.11, pp. 3193–3207 (cit. on p. 122).
- Moosbrugger, R.E., M.C. Wentzel, G.A. Ekama, and G.v.R. Marais (1992). *Simple Titration Procedures to determine H₂CO₃ alkalinity and short-chain fatty Acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acids/bases*. Tech. rep. TT 57/93. UCT (cit. on p. 126).
- Oehmen, A., P.C. Lemos, G. Carvalho, Z.G. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, and M.A.M. Reis (2007). “Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale”. In: *Water Research* 41.11, pp. 2271–2300 (cit. on p. 123).
- Pastor, L., D. Mangin, R. Barat, and A. Seco (2008a). “A pilot-scale study of struvite precipitation in a stirred tank reactor: Conditions influencing the process”. In: *Bioresource Technology* 99.14, pp. 6285–6291 (cit. on p. 136).
- Pastor, L., N. Marti, A. Bouzas, and A. Seco (2008b). “Sewage sludge management for phosphorus recovery as struvite in {EBPR} wastewater treatment plants”. In: *Bioresource Technology* 99.11. Exploring Horizons in Biotechnology: A Global Venture, pp. 4817–4824 (cit. on p. 137).

- Rubio-Rincón, F.J., C.M. Lopez-Vazquez, M. Ronteltap, and D. Brdjanovic (2014). “Seawater for phosphorus recovery from urine”. In: *Desalination* 348, pp. 49–56 (cit. on p. 137).
- Shi, J., X. Lu, R. Yu, and W. Zhu (2012). “Nutrient removal and phosphorus recovery performances of a novel anaerobic-anoxic/nitrifying/induced crystallization process”. In: *Bioresource Technology* 121.0, pp. 183–189 (cit. on p. 123).
- Smolders, G.J.F., M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1995). “A metabolic model for the biological phosphorus removal process”. In: *Water Science and Technology* 31.2. Modelling and Control of Activated Sludge Processes, pp. 79–93 (cit. on p. 132).
- Wong, M.T., F.M. Tan, W.J. Ng, and W.T. Liu (2004). “Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes”. In: *Microbiology* 150, pp. 3741–3748 (cit. on p. 127).
- Wong, P.Y., K.Y. Cheng, A.H. Kaksonen, D.C. Sutton, and M.P. Ginige (2013). “A novel post denitrification configuration for phosphorus recovery using polyphosphate accumulating organisms”. In: *Water Research* 47.17, pp. 6488–6495 (cit. on p. 123).
- Xia, C.-W., Y.-J. Ma, F. Zhang, Y.-Z. Lu, and R.J. Zeng (2014). “A Novel approach for phosphorus recovery and no wasted sludge in enhanced biological phosphorus removal process with external COD addition”. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172.2, pp. 820–828 (cit. on pp. 123, 136).
- Yuan, Z., S. Pratt, and D.J. Batstone (2012). “Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes”. In: *Current opinion in biotechnology* 23.6, pp. 878–883 (cit. on p. 122).
- Zhou, Y., M. Pijuan, R.J. Zeng, L. Huabing, and Z. Yuan (2008). “Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)?” In: *Water Research* 42, pp. 2361–2368 (cit. on pp. 123, 132).
- Zou, H., H. Lu, and W.-G. Li (2014). “A novel process for nutrients removal and phosphorus recovery from domestic wastewater by combining BNR with induced crystallization”. In: *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 22.4, pp. 274–283. eprint: <http://dx.doi.org/10.3846/16486897.2014.931284> (cit. on p. 136).

Capítulo 8

Discusión general de resultados

El éxito del proceso EBPR en las EDAR consiste en que exista una población de bacterias acumuladoras de fósforo. Estas bacterias llamadas PAOs e identificadas en su mayoría dentro de la especie *Candidatus Accumulibacter phosphatis* se ven favorecidas cuando se alternan condiciones anaerobias aerobias/anóxicas. Las PAOs en condiciones anaerobias toman AGV del medio y liberan fosfatos, después en la fase aerobia/anóxica capturan más fósforo del que liberaron. Sin embargo, en estas condiciones también es favorecido otro grupo de bacterias, las cuales fueron llamadas GAOs e identificadas como la especie *Candidatus Competibacter phosphatis*. Las GAOs en condiciones anaerobias toman los AGV del medio pero sin soltar fósforo y en condiciones aerobias/anóxicas no son capaces de tomar fósforo. Es por esto, que las GAOs son competidoras de las PAOs por los AGV e indeseables en el sistema, su crecimiento excesivo provoca el deterioro del proceso de eliminación de fósforo.

En la búsqueda del desarrollo sostenible, el proceso de EBPR es preferible antes que el proceso de eliminación de fósforo por precipitación química. Sin embargo, aunque la eliminación de fósforo por precipitación química es un proceso más costoso y menos sostenible es el más usado en el tratamiento de aguas residuales. Esto se debe a que el proceso de eliminación de fósforo por precipitación química tiene la ventaja de asegurar concentraciones bajas de fósforo en el efluente lo que en un proceso con fangos activados puede ser algunas veces complicado conseguir. Es por esto que muchos estudios (Wentzel *y col.*, 1989b; Smolders *y col.*, 1994a; Meinhold *y col.*, 1999; Filipe *y col.*, 2001a; Pijuan *y col.*, 2005; Griffiths *y col.*, 2002; Whang *y col.*, 2002) se han centrado en la búsqueda de condiciones que favorezcan al desarrollo de las PAOs sobre sus principales competidoras las GAOs en los procesos de EBPR.

En la literatura se encontraron indicios de que las PAOs y las GAOs usan rutas metabólicas similares (Reis *y col.*, 2003; Schuler *y col.*, 2003b). Varios estudios demostraron que ambos microorganismos requerían de energía (ATP) para transportar los AGV del medio al interior de la célula. Smolders *y col.* (1994a) sugirieron que las PAOs obtenían esta energía principalmente de la degradación de poli-P. Por otra parte, Zeng *y col.* (2003) sugirieron que las GAOs obtienen la energía de la degradación de glucógeno. Ambos microorganismos emplean el carbono capturado del medio para el mantenimiento celular y para almacenarlo intracelular como PHA. La síntesis de PHA requiere de poder reductor (NADH) para su formación (Mino *y col.*, 1987; Comeau *y col.*, 1986). Las GAOs obtienen el poder reductor de la degradación del glucógeno, mientras que las PAOs, se consideró podían obtener el poder reductor por dos vías: a partir de la degradación de glucógeno o por el ciclo del TCA (Mino *y col.*, 1987; Smolders *y col.*, 1994a). Estudios realizados con C¹³ concluyeron que las PAOs utilizaban parte del TCA en condiciones anaerobias (Martín *y col.*, 2006). Sin embargo, no se tenía claro la participación del glucógeno y el poli-P en la toma de AGV y la síntesis de PHA. En condiciones aerobias o anóxicas, Smolders *y col.* (1994a) y Zeng *y col.* (2003) sugirieron que tanto las PAOs como las GAOs, empleaban el ciclo del TCA y la cadena respiratoria para la obtención de energía y poder reductor. En el caso de las PAOs la energía la empleaban para capturar los fosfatos del medio y almacenarlos como poli-P intracelular; y tanto las PAOs como las GAOs empleaban el poder reductor y energía para la síntesis de glucógeno, el crecimiento y mantenimiento celular a partir de las reservas de PHA.

Las PAOs y GAOs son microorganismos muy parecidos metabólicamente por lo que algunos autores llegaron a pensar que tal vez las PAOs y las GAOs pudieran ser el mismo microorganismos (Mino *y col.*, 1998; Bond *y col.*, 1999; Jeon *y col.*, 2001). La única diferencia que observaron a nivel metabólico entre estos microorganismo había sido que las PAOs degradaban sus reservas intracelulares de poli-P en condiciones anaerobias provocando una suelta de fosfatos al medio, y tomaban el fósforo del medio en condiciones aerobias regenerando el poli-P intracelular, es decir que tendrían un metabolismo PAM. Mientras que las GAOs presentaban un metabolismo GAM porque acumulaban grandes cantidades de glucógeno. Estudios microbiológicos recientes (Nielsen *y col.*, 1999; Hesselmann *y col.*, 1999; Welles *y col.*, 2015) revelaron que los microorganismos PAOs y GAOs son distintos taxonómicamente y morfológicamente, así también fue observado en este estudio y puede verse en la figura 8.1.

Una situación preocupante en la operación del proceso de EBPR es tener un influente con una relación alta de DQO/P y observar en la fase anaerobia una disminución en la relación fósforo soltado por unidad de AGV tomado. Algunas veces, eso se debe al crecimiento incontrolado de las GAOs en el proceso EBPR, en otras ocasiones las causas son desconocidas.

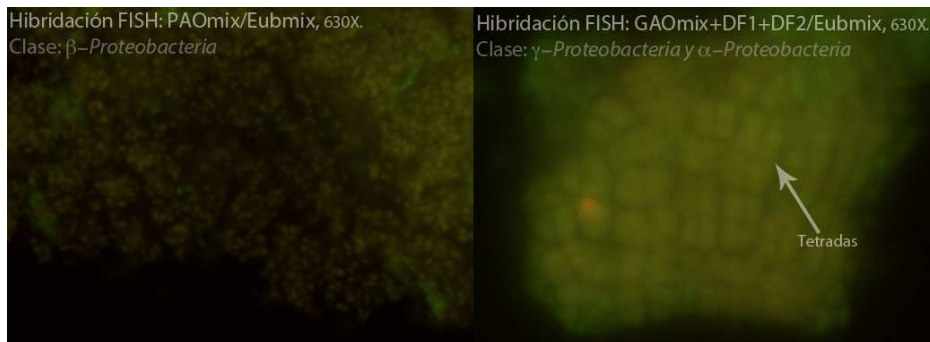


Figura 8.1: Morfología de las PAOs y GAOs hibridadas con sondas específicas. Muestra obtenida de un cultivo enriquecido en PAOs ($93 \pm 1.9\%$) y GAOs ($1 \pm 0.6\%$) empleado en este estudio. Imágenes tomadas a 600X.

En trabajos recientes (Barat *y col.*, 2006a; Zhou *y col.*, 2008) con cultivos enriquecidos en PAOs fue provocada una disminución de la concentración de fósforo en procesos EBPR. En estos trabajos los autores observaron que el fósforo liberado por ácido acético tomado disminuyó sin observar un crecimiento significativo de GAOs, sugirieron que tal vez las PAOs podrían ser capaces de emplear el glucógeno como principal fuente de energía cuando había un déficit de fósforo en el proceso.

Se han realizado muchos estudios sobre los factores que pudieran afectar a la competencia entre PAOs y GAOs cuando hubiera una carencia de fosfatos en el influente (Liu *y col.*, 1997; Saunders *y col.*, 2003; Erdal *y col.*, 2008; Zhou *y col.*, 2008). Sin embargo, aún existen muchas preguntas sin respuesta en relación al metabolismo de las PAOs cuando se presentan estas condiciones y se limita la formación del poli-P que emplean como reserva energética y a su efecto sobre la dinámica de las poblaciones de PAOs y GAOs en el proceso EBPR.

Esta Tesis Doctoral aborda esta temática y se centra en estudiar el metabolismo de las PAOs cuando estas son sometidas a la extracción de poli-P y su efecto sobre las dinámicas poblacionales PAOs, GAOs y las especies PAO Tipo I y PAO Tipo II en un proceso EBPR.

El estudio metabólico se realizó sometiendo a las PAOs a diferentes niveles de poli-P en un estudio a corto plazo (Capítulo 4 p.59), posteriormente en otro estudio fueron sometidas a bajos niveles de poli-P por largo plazo correspondiente a 3 TRC (Capítulo 5 p.81).

En el estudio a corto plazo se empleó un cultivo enriquecido en PAOs ($86 \pm 3\%$ de *Accumulibacter*). Seis experimentos con diferentes contenidos de poli-P fueron llevados a cabo: dos sin extracción de fósforo con alto contenido en poli-P (EX1 y EX2), tres con extracción de fósforo a distintos niveles (EX3, EX4 y EX5) y uno de recuperación del contenido de poli-P (EX6).

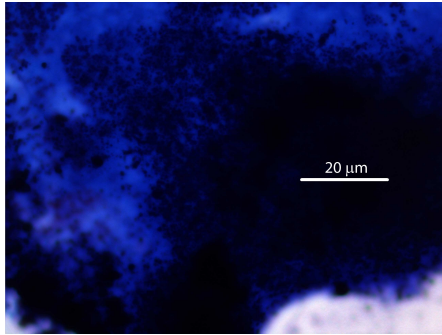
En la figura 8.2 se muestran los gránulos de poli-P (azul oscuro) en la biomasa mediante la tinción de azul de metileno. Cualitativamente se observaron los gránulos de poli-P correspondiéndose a los valores de poli-P obtenidos para los experimentos: con altos niveles de poli-P EX2:0.3 mgP/mgVSS y EX6:0.23 mgP/mgVSS; al extraer el poli-P los gránulos disminuyeron gradualmente en EX3:0.19 mgP/mgVSS, EX4:0.07 mgP/mgVSS y EX5:0.01 mgP/mgVSS. Es importante aclarar que el contenido en poli-P del EX2 y EX6 se encontró dentro del rango máximo reportado para cultivos de PAOs 0.2 – 0.38 mgP/mgVSS (Smolders *y col.*, 1995).

En el estudio a largo plazo se empleó un cultivo enriquecido en PAOs ($82 \pm 3\%$ *Accumulibacter*). Al igual que en el estudio a corto plazo se extrajo gradualmente el poli-P de la biomasa hasta que se obtuvo un contenido en poli-P de 0.03 mgP/mgVSS. Posteriormente el contenido en poli-P se mantuvo entre 0.01 y 0.04 mgP/mgVSS para estudiar su efecto sobre el comportamiento metabólico de las bacterias y la dinámica poblacional a largo plazo (3 TRC).

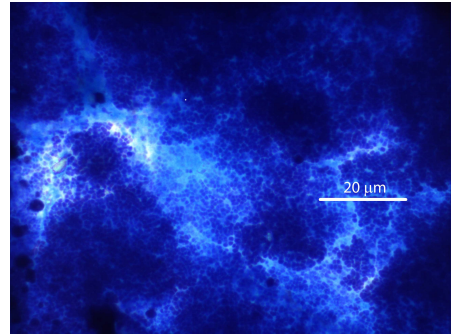
Tanto en el estudio a corto como a largo plazo la relación estequiométrica $P_{\text{liberado}}/HAc_{\text{tomado}}$ mostró el primer indicio del cambio metabólico de las PAOs en el sistema. Los valores de la relación $P_{\text{liberado}}/HAc_{\text{tomado}}$ para el EX1 y EX2 a corto plazo y C1 a largo plazo fueron característicos de cultivos PAO (Smolders *y col.*, 1995; Filipe *y col.*, 2001b; Kisoglu *y col.*, 2000). Cuando las extracciones de fósforo fueron más severas los valores de la relación $P_{\text{liberado}}/HAc_{\text{tomado}}$ del EX5 a corto plazo y C2 a largo plazo disminuyeron hasta valores característicos de cultivos GAO. Del mismo modo, los valores de las relaciones anaerobias: $GLU_{\text{degradado}}/HAc_{\text{tomado}}$ y $PHA_{\text{sintetizado}}/HAc_{\text{tomado}}$ y como las aerobias: $GLU_{\text{formado}}/PHA_{\text{degradado}}$ y $P_{\text{tomado}}/PHA_{\text{degradado}}$ cambiaron significativamente desde valores típicos encontrados en estudios experimentales y teóricos (modelos) sobre bacterias PAOs a valores típicos en estudios experimentales y teóricos (modelos) sobre bacterias GAO (ver tabla 5.1 p.88). Los cambios en las relaciones estequiométricas anaerobias y aerobias mostraron que tanto en los experimentos a corto como a largo plazo se presentó un cambio metabólico de PAM a GAM al extraer el poli-P intracelular.

En el estudio a largo plazo, al reducir el contenido de poli-P y limitar el fósforo del sistema por los 3 TRC, las relaciones anaerobias y aerobias se mantuvieron con valores similares a los valores típicos para cultivos GAOs presentando un metabolismo GAM. La velocidad de toma de HAc disminuyó de 0.095 mgC/h/mgVSS en el experimento C1 a 0.024 mgC/h/mgVSS en el experimento C2.

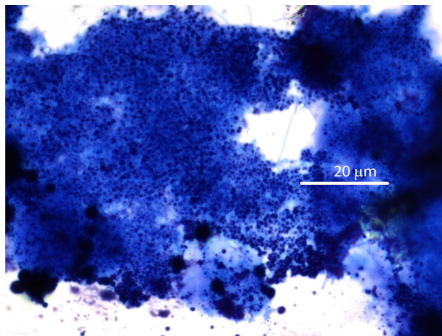
Los análisis FISH realizados en cada uno de los estudios mostraron que el porcentaje de *Accumulibacter* en el reactor fue constante 80% en el estudio a corto plazo y entre un 70 y 80% a largo plazo. Las especies *Competibacter*, *Defluviococcus-cluster 1* y *Defluviococcus-cluster 2* en los experimentos a corto plazo no se detectaron y en la experimentación a largo plazo se mantuvieron por debajo de un 5% (ver tabla 4.3 p.69 y figura 5.5 p. 92).



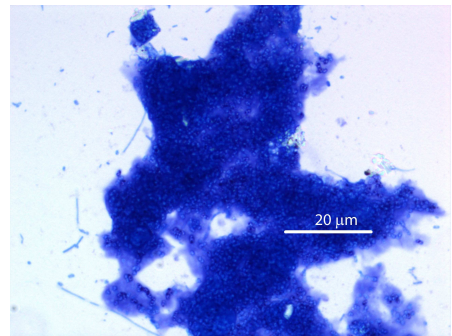
(a) EX2: 0.3 mgP/mgVSS



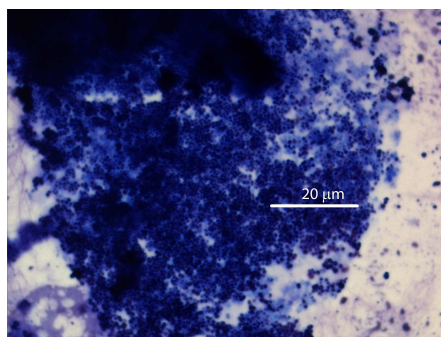
(b) EX3: 0.19 mgP/mgVSS



(c) EX4: 0.07 mgP/mgVSS



(d) EX5: 0.01 mgP/mgVSS



(e) EX6: 0.23 mgP/mgVSS

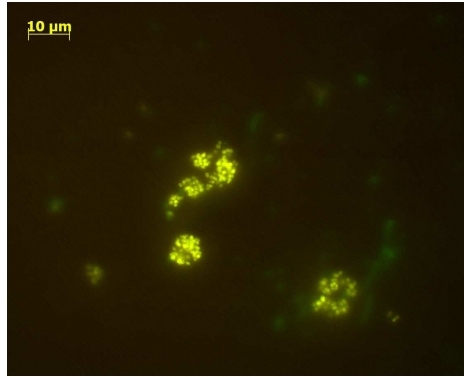
Figura 8.2: Observaciones microbiológicas de gránulos de poli-P con tinción azul de metileno (a) EX2, (b) EX3, (c) EX4, (d) EX5, (e) EX6.

En el estudio de Zhou *y col.* (2008) sometieron una biomasa enriquecida en *Accumulibacter* al caso extremo de extraer severamente el contenido de poli-P. En los estudios a corto y largo plazo se reprodujo este caso extremo. En el EX5 y la C2 se observaron resultados similares a los que obtuvieron Zhou *y col.* (2008), las PAOs expresan claramente un metabolismo GAM. En el estudio a corto y largo plazo no solo se observó el cambio de metabolismo de PAM a GAM, al obtener diferentes contenidos en poli-P se observó una transición desde el metabolismo PAM a GAM dependiente del contenido en poli-P. Las relaciones estequiométricas anaerobias y aerobias en el estudio a corto y a largo plazo mostraron estar correlacionadas con el contenido en poli-P (ver figura 5.4 p.91). También se observó que las PAOs tienen la capacidad de recuperar el contenido en poli-P y el metabolismo PAM sin ser afectado el proceso EBPR.

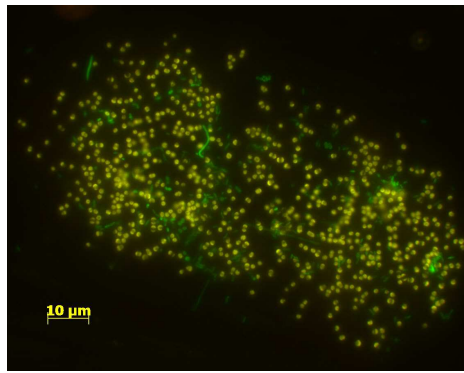
Estos resultados mostraron que al extraer el contenido en poli-P de la biomasa, las PAOs son capaces de emplear anaerobicamente el glucógeno como fuente de energía para la toma de ácido acético y la síntesis de PHA. Las PAOs aerobicamente son capaces de transformar el PHA a glucógeno y almacenarlo en elevadas cantidades con total independencia de la síntesis intracelular de poli-P. Por lo que se concluyó que las PAOs (*Accumulibacter*) presentaron un cambio metabólico de PAM a GAM y son capaces de mantener el metabolismo GAM por largo tiempo. Mediante el análisis FISH se descartó que las GAOs fueran las responsables del cambio metabólico observado en el proceso EBPR.

Mediante el análisis FISH se observó la dinámica de las especies PAO Tipo I y PAO Tipo II en el sistema en el estudio a corto y largo plazo (Figura 8.3). En el estudio a corto plazo cuando la biomasa estaba enriquecida en poli-P las PAO Tipo I predominaban en el sistema, al disminuir el contenido de poli-P en la biomasa se observó un cambio en la población bacteriana, la especie PAO Tipo I disminuyó mientras que la PAO Tipo II aumentó. Al recuperar el contenido en poli-P las PAO Tipo I nuevamente dominaron en el sistema (Figura 4.7 p.73). En el estudio a largo plazo se observó que antes de la extracción del poli-P las PAO Tipo I se encontraban en el reactor en un 70 % y las PAO Tipo II en un 25 %. Durante la reducción del contenido en poli-P las PAO Tipo I disminuyeron en un 12 % más que las PAO Tipo II (Figura 5.3 p.90). Sin embargo, a los 37 días de ser expuesto el sistema a condiciones extremas (bajo contenido de poli-P en la biomasa y un influente con bajas concentraciones de fósforo) el porcentaje de las PAO Tipo II disminuyó hasta por debajo de un 5 % y las PAO Tipo I aumentaron hasta predominaron en el sistema.

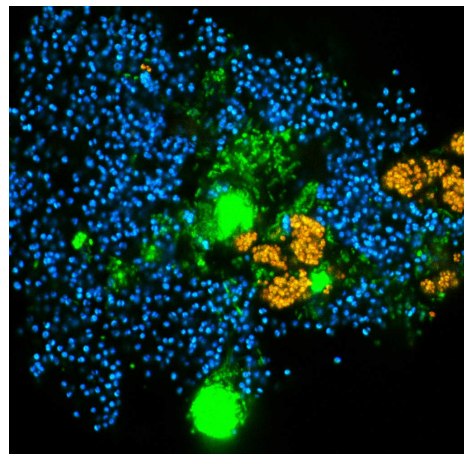
El análisis FISH también reveló que después de la extracción de poly-P en ambos estudios a corto y largo plazo, la suma de las PAO Tipo I y PAO Tipo II fue significativamente más baja que las PAOs detectadas con la sonda PAOmix, sugiriendo el desarrollo de otra especie de PAO diferente a las PAO Tipo I o PAO Tipo II.



(a)



(b)



(c)

Figura 8.3: Observaciones microbiológicas de diferentes flóculos con FISH (1000X). (a) FISH con sondas EUBmix y PAO Tipo II. (b) FISH con sondas EUBmix y PAO Tipo I. (c) FISH con sondas Eubmix, PAO Tipo I y PAO Tipo II.

Por lo tanto, en base a estas observaciones se sugirió que no sólo el nitrato y la duración de la fase anóxica afecta la relación PAO Tipo I/Tipo II (Oehmen *y col.*, 2010a) también puede ser afectada por el contenido en poli-P y la influencia del metabolismo GAM para que compitan las distintas especies PAOs. Estos resultados podrían explicar porque en algunos casos no pudo observarse un cambio de metabolismo (Brdjanovic *y col.*, 1998b; López-Vázquez *y col.*, 2008).

También fue posible observar en ambos estudios la variación en el porcentaje de los principales polímeros que constituyen el PHA intracelular: PHB y PHV. En los experimentos a corto plazo con alto contenido en poli-P se observó que el porcentaje de PHB y PHV fueron de 95 % y 4.8 % respectivamente y al disminuir el contenido en poli-P fueron de 86 % y 13.8 %. Algo similar ocurre a largo plazo cuando el contenido de poli-P fue alto se observó que el porcentaje de PHB y PHV se mantuvo alrededor del 85 % y 15 %, mientras que para contenidos de poli-P bajos el porcentaje de PHB y PHV fue entre 66 % y 34 % percibiéndose un aumento importante en el porcentaje de PHV en ambos casos y un decremento en los porcentajes de PHB.

De acuerdo a amplias investigación recientes como la de Saunders (2005) en la que confirmaron que las PAOs (cultivo enriquecido a 90 % *Accumulibacter*) empleaban una fuerza protón-motriz (PMF) para la captación de AGV. La PMF la obtenían principalmente de la degradación intracelular de poli-P, debido a que si fuera obtenida a través de la degradación del glucógeno (sin emplear el ciclo del TCA) el balance de energía no se mantendría dentro de la célula. Mas tarde, Martín *y col.* (2006) encontraron genes para la expresión de la glucólisis y TCA en la especie *Accumulibacter*, esto significó que las PAOs pueden emplear la degradación de glucógeno en conjunto con el TCA o parte del TCA según otras investigaciones Hesselmann *y col.* (2000) y Pijuan *y col.* (2009). Concretando estas investigaciones con los resultados observados en este estudio, el comportamiento que presentan las fracciones de PHA pudiera explicarse mediante las rutas metabólicas anaerobias del esquema mostrado en la figura 8.4.

En el esquema de la figura 8.4 el HAc consumido es transformado en acetyl-CoA. El acetyl-CoA puede seguir dos rutas de acuerdo a las necesidades: la ruta de unión de unidades monoméricas acetyl-acetyl para la formación de PHB y se consumen NADH, o la ruta del TCA donde se generaría NADH y produce succinyl-CoA que posteriormente se transforma en propionyl-CoA con consumo de NADH y se forman unidades monoméricas acetyl-propionyl (PHV). Las PAOs en presencia de poli-P, utilizan principalmente la glucólisis para la producción de NADH, ya que el ATP necesario para la toma de AGV y el mantenimiento celular anaerobio lo obtienen de la hidrólisis del poli-P. Sin embargo, cuando el contenido en poli-P es bajo, tiene que emplearse la ruta glucolítica con el fin de compensar la falta de ATP. Es posible que el uso de la vía glucolítica para abastecer las necesidades de ATP genere un exceso de NADH, entonces el piruvato resultante de la glucólisis podría tomar dos rutas: la formación de acetyl-CoA empleada en menor medida,

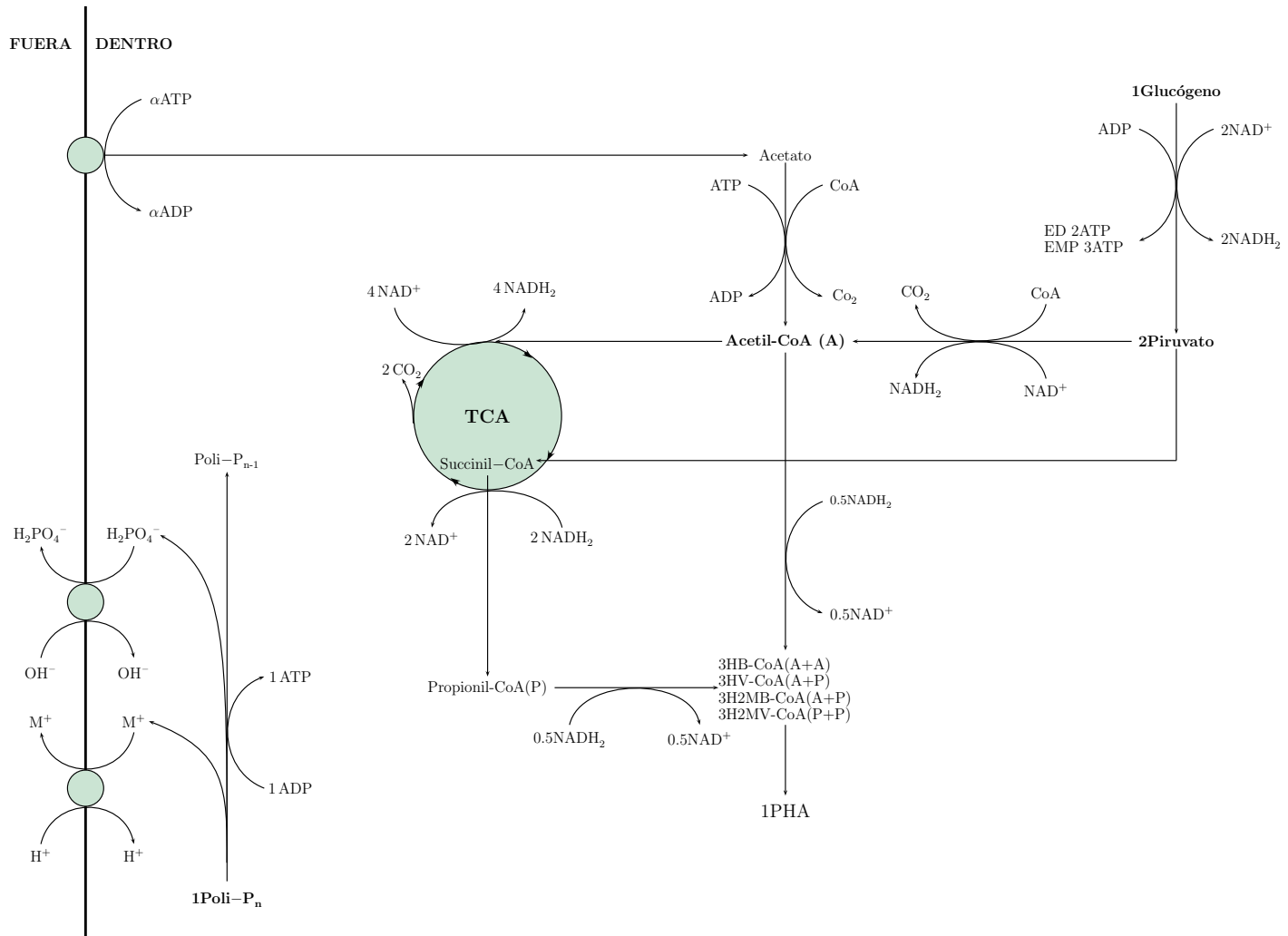


Figura 8.4: Esquema metabólico anaerobio para las PAOs. (Hesselmann *y col.*, 2000; Reis *y col.*, 2003; Martín *y col.*, 2006; Zhou *y col.*, 2009)

ya que generaría más NADH; la síntesis succinil-propionil CoA emplea principalmente la ruta parcial del TCA equilibrando el NADH en el interior de la célula. La ruta piruvato-succinil-propionil CoA podría ser potenciada al ser inhibida la enzima dehidrogenasa succinata del ciclo del TCA provocando que el NADH no sea reoxidado, esto provocaría una acumulación de succinil-CoA la cual sería incorporada a la ruta succinil-propionilCoA para la formación de unidades monoméricas de PHV, PH2MB y PH2MV (Hesselmann *y col.* (2000)).

Se concluyó que las PAOs cuando presentan un metabolismo PAM podrían emplear la hidrólisis de poli-P y en menor proporción la degradación del glucógeno para la obtención de energía, para la generación de poder reductor podrían emplear la glucólisis. El ciclo del TCA lo podrían emplear para incorporar el acetil-CoA y sintetizar unidades monoméricas principalmente PHB y en menor cantidad PHV. Cuando las PAOs presentan un metabolismo GAM, podrían emplear la glucólisis generando energía para la toma de AGV y poder reductor para la síntesis de PHA, potenciar la ruta parcial del TCA piruvato-succinil-propionil CoA proporcionando equilibrio energético en el interior de la célula y potenciando la formación de unidades monoméricas de PHV, PH2MB y PH2MV.

Una vez analizadas las rutas metabólicas que pudieran emplear las PAOs al realizar el cambio metabólico de PAM a GAM, y la necesidad de actualizar los modelos existentes, se incorporó el cambio metabólico que presentan las PAOs a los modelos metabólicos.

En el cambio metabólico de PAM a GAM las PAOs mostraron diferentes relaciones estequiométricas que estaban directamente relacionadas con el contenido intracelular de poli-P (f_{PP_PAO}). Por lo que, para el modelo metabólico se desarrollaron tres funciones: (Ecuación 8.1, 8.2 y 8.3) que representaron la transición entre las vías metabólicas anaerobias propuestas para las PAOs por Smolders *y col.* (1994a) a las descritas para GAOs propuestas por Zeng *y col.* (2003) (vea la sección 6.3.1 p.105). Estas funciones se aplicaron a la estequiometría para los procesos anaerobios de toma de HAc y el proceso de mantenimiento celular. Los términos Y_{PHA}^{PAO} , Y_{PHA}^{GAO} , Y_{GLY}^{PAO} , Y_{GLY}^{GAO} , $Y_{PO_4}^{PAO}$ son los parámetros estequiométricos típicos para las PAOs y las GAOs calculados a un pH de 7.5. Los términos $K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}$, $K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}$ y $K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}$ son las constantes de semisaturación con un valor de 0.3 mmolP/mmoC, este valor fue obtenido al ajustar las funciones a los valores experimentales. En la tabla 6.2 p.110 se muestra la extensión de la estequiometría. El modelo de fase aerobia fue el descrito en López-Vázquez *y col.* (2009) para *Accumulibacter*. Todos los parámetros estequiométricos son mostrados en el Apéndice A.

$$Y_{PHA} = Y_{PHA}^{PAO} + (Y_{PHA}^{GAO} - Y_{PHA}^{PAO}) \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{f_{PP_PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}} \quad (8.1)$$

$$Y_{\text{GLY}} = -Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}} - (Y_{\text{GLY}}^{\text{GAO}} - Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}) \times \frac{K_{\text{S}, Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}}{f_{\text{PP_PAO}} + K_{\text{S}, Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}}} \quad (8.2)$$

$$Y_{\text{PO}_4} = Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}} \times \frac{f_{\text{PP_PAO}}}{f_{\text{PP_PAO}} + K_{\text{S}, Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}}} \quad (8.3)$$

La cinética del modelo se basó en la descrita por López-Vázquez *y col.* (2009) para las *Accumulibacter*. La dependencia de poli-P ($f_{\text{PP_PAO}}$) fue eliminada de la cinética. Una función de conmutación se incluyó en el término dependiente de glucógeno, con el fin de reducir la velocidad de toma de HAc a bajo contenido de poli-P. Los resultados experimentales mostraron una clara reducción en la velocidad de degradación de PHA cuando el contenido en poli-P es bajo. Esta observación fue matemáticamente incluida añadiendo una función de conmutación para cambiar la constante de saturación media para el consumo PHA a partir del metabolismo típico de PAOs a un metabolismo GAO a bajo contenido en poli-P.

El modelo se aplicó a los seis experimentos reportados en el capítulo 4 p.59, así como al experimento con bajo contenido en poli-P en el estudio realizado por Zhou *y col.* (2008). El modelo fue calibrado considerando dos experimentos: un experimento con alto contenido en poli-P (relación $f_{\text{PP_PAO}}$ de 0.23 mmolP/ mmolC) que presentó un metabolismo PAO típico y el otro sin poli-P (relación $f_{\text{PP_PAO}}$ de 0 mmolP/ mmolC) con un cultivo enriquecido en PAOs que presentó un metabolismo GAO.

El modelo previamente calibrado fue validado considerando cinco experimentos (ver tabla 6.3 p.113) con los cuales se cubrió todo el comportamiento metabólico PAO posible: el metabolismo PAO típico (relación $f_{\text{PP_PAO}}$ de 0.25 y 0.20 mmolP/ mmolC) la transición entre el metabolismo PAO y GAO (relación $f_{\text{PP_PAO}}$ de 0.17 y 0.05 mmolP/ mmolC) y el metabolismo GAO típico (relación $f_{\text{PP_PAO}}$ de 0 mmolP/ mmolC). El modelo fue capaz de representar satisfactoriamente los escenarios. Con el fin de evaluar la capacidad del modelo para caracterizar la fase anaerobia y la fase aerobia, la calibración y validación de los experimentos se llevaron a cabo mediante la simulación por separado de cada fase utilizando una estimación inicial de los compuestos poliméricos de almacenamiento en cada caso.

Mientras que el análisis de sensibilidad realizado señaló que el modelo es capaz de describir muy bien los datos experimentales, incluso después de cambiar los parámetros del modelo en un 50%. Por lo tanto, un cambio en los nuevos parámetros cinéticos, estequiometricos, en la fase anaeróbica o aeróbica, no tiene ningún impacto significativo en la capacidad del modelo para describir el cambio de PAM a GAM. Esto apoya la transferibilidad del modelo para describir el metabolismo de las PAOs bajo una gama más amplia de situaciones que se encuentran en las plantas EBPR (es decir, niveles variables de poli-P). Finalmente, se puede concluir

que el modelo es robusto, porque se logró un buen ajuste durante la calibración y validación del modelo.

Las PAOs tienen la capacidad de almacenar elevadas concentraciones de fósforo intracelularmente que puede ser extraído en la línea de aguas aprovechando el cambio de metabolismo de estas bacterias. Esto proporciona la oportunidad de recuperar el fósforo de un sistema sencillo y económico. Por este motivo se llevó a cabo un estudio con la finalidad de evaluar el potencial de recuperación de fósforo de dos estrategias de operación en un sistema SBR alternando condiciones anaerobias-aerobias, el efecto sobre el rendimiento biológico de este nuevo modo de funcionamiento del proceso EBPR en el tiempo y la dinámica de la población microbiana. Las estrategias de operación consistieron en:

1. Leve extracción de fósforo (adicionando 100 mgHAc/l) con mayor frecuencia (recuperación del poli-P en biomasa cada 2 días).
2. Fuerte extracción (adicionando desde 100 mgHAc/l hasta 350 mgHAc/l) y menor frecuencia (recuperación del poli-P en biomasa cada 6 días).

Las concentraciones de fósforo total se observaron en cada uno de los estrategias. Los resultados mostraron que las reducciones de P_T fueron constantes en las extracciones con la misma cantidad de HAc (100 mg/l), mientras que en la segunda estrategia las reducciones de P_T aumentaron a lo largo los experimentos. Por lo que, en la segunda estrategia el contenido en poli-P disminuyó notablemente. Un aspecto muy importante a tomar en cuenta fue la capacidad que el sistema para eliminar fósforo a pesar de las extracciones de fósforo.

Los resultados obtenidos de la relación $P_{\text{liberado}}/HAc_{\text{tomado}}$ y el análisis FISH mostraron que en la primera estrategia con extracciones leves de fósforo no se presentó un cambio metabólico. En la segunda estrategia se presentó un cambio metabólico, la relación $P_{\text{liberado}}/HAc_{\text{tomado}}$ disminuyó desde 0.6 mmolP/mmolC a 0.2 mmolP/mmolC. El análisis FISH para la segunda estrategia (Figura 7.6 p. 136) mostró que *Competibacter*, *Defluviicoccus*-grupo 1 y *Defluviicoccus*-grupo 2 no estuvieron presente en el SBR, esto confirmó que en la segunda estrategia sucedió un cambio metabólico de PAM a GAM.

Las especies PAO Tipo I y PAO Tipo II también se estudiaron en ambas estrategias. Al inicio de las experimentaciones se observó que la especie predominante fue la PAO Tipo II en ambos casos. En la primera estrategia, no se detectaron variaciones entre las poblaciones lo que sugiere que las extracciones ligeras y frecuentes de fósforo no afectan a la dinámica poblacional. Sin embargo, los resultados para la segunda estrategia (Figura 7.6 p.134) muestran que hubo un cambio en la dinámica poblacional de las especies *Accumulibacter*. El porcentaje de PAO Tipo I se mantuvo constante mientras que la especie PAO Tipo II disminuyó después del tercer experimento, que fue el primero de la serie de extracciones de alta eficiencia.

La suma de ambos tipos de PAOs resultó ser inferior al total de *Accumulibacter* detectado con una sonda PAOMix.

Una estimación del resultado global de recuperación de fósforo, se obtuvo que de la primera estrategia el 59 % de fósforo entrante es recuperable con dos experimentos por semanas. En contraste, cuando se aplicó la segunda estrategia, se recuperó el 81 % del fósforo entrante en un solo experimento semanal. En general, la segunda estrategia mostró tener una mayor eficacia de extracción debido a que en la mitad del volumen del sobrenadante se puede obtener una concentración superior de fósforo. En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren que esta estrategia es más apropiada si se requiere la recuperación de fósforo para fines de reutilización.

De este estudio se concluyó que ninguna de las dos estrategias tuvo un efecto negativo en el proceso biológico. El sistema es suficientemente capaz de eliminar el fósforo incluso después de las elevadas extracciones de fósforo al que fue sometido. Al extraer altas cantidades de fósforo fue posible observar el cambio metabólico en el sistema, sin que esto afectará el proceso de eliminación de fósforo. Al parecer las PAO Tipo I presentaron no verse afectadas por las extracciones y los cambios metabólicos, sin embargo las PAO Tipo II parecen verse afectadas por los déficit de poli-P ya que desaparecieron del sistema.

Capítulo 9

Conclusiones

En este trabajo de Tesis Doctoral se estudió, a corto y largo plazo, el metabolismo de las PAOs cuando son sometidas a la extracción de poli-P y su efecto sobre las dinámicas poblacionales de PAOs y GAOs y de las especies PAO Tipo I y Tipo II en un proceso EBPR. También se desarrolló un modelo metabólico sobre el cambio de metabolismo de las PAOs y se evaluó la recuperación de fósforo mediante un sistema novedoso. A continuación se describen las conclusiones más importantes de este trabajo de tesis:

1. A nivel metabólico las relaciones estequiométricas anaerobias y aerobias de la biomasa enriquecida en *Accumulibacter* presentaron un cambio metabólico de PAM a GAM cuando el contenido en poli-P decrece. Así mismo, la biomasa al recuperar el contenido en poli-P el metabolismo cambió de GAM a PAM. A largo plazo (40 días) con bajo contenido en poli-P en la biomasa, las relaciones estequiométricas muestran que las PAOs son capaces de adaptarse a estas condiciones extremas y mantenerlas a lo largo del tiempo.
2. A nivel microscópico los resultados en los estudios a corto y largo plazo las PAO *Accumulibacter* y no las GAOs (*Competibacter*, *Deftuviococcus*-cluster 1 y *Deftuviococcus*-cluster 2) fueron las responsables del cambio de metabolismo (PAM a GAM) observado en el sistema cuando se reduce el contenido en poli-P en el sistema.
3. Las PAOs fueron capaces de mantener el metabolismo GAM por largo tiempo, sin observarse un crecimiento de GAOs (*Competibacter*, *Deftuviococcus*-cluster 1 y *Deftuviococcus*-cluster 2) en la población microbiana del SBR.
4. De los resultados obtenidos se desprende que cuando las PAOs presentan un metabolismo PAM pueden emplear la hidrólisis de poli-P para la obtención

de energía, en menor proporción emplean la degradación del glucógeno para la generación de energía y poder reductor y emplear el ciclo del TCA para la síntesis de unidades monoméricas principalmente PHB y PHV. Cuando las PAOs presentaron un metabolismo GAM, pueden emplear la glucólisis generando energía para la toma de AGV y poder reductor para la síntesis de PHA, potenciando la ruta parcial del TCA piruvato-succinil-propionil CoA proporcionando equilibrio energético en el interior de la célula, potenciando la formación de unidades monoméricas de PHV, PH2MB y PH2MV.

5. De acuerdo con los tres estudios experimentales realizados, al extraer el contenido en poli-P a corto plazo, las PAO Tipo II muestra una rápida capacidad de adaptación o resistencia a las nuevas condiciones. Las PAO Tipo II cambian rápidamente su metabolismo PAM a GAM, sin embargo, al mantener la biomasa con bajo contenido en poli-P por un largo periodo las PAO Tipo I presentan una mayor capacidad para adaptarse a las condiciones internas empleando de manera mas eficiente las ruta metabólicas para emplear el glucógeno como principal fuente de energía y predominar en el sistema.
6. La extensión desarrollada del modelo metabólico de las PAOs que simula la habilidad de las PAOs para cambiar de una vía metabólica a otra en función del contenido de poli-P interno, se realizó mediante la introducción de diferentes expresiones de tipo Monod en la estequiometría y expresiones cinéticas. El modelo fue calibrado y validado con siete experimentos bajo diferentes concentraciones de poli-P internos, y mostró la capacidad de predecir correctamente el cambio metabólico PAO en concentraciones poli-P bajas. Para permitir la variación entre diferentes valores estequiométricos y cinéticos del procesos, que describe el cambio del metabolismo de PAO con el metabolismo GAO. El análisis de sensibilidad y error mostró que el modelo es robusto y tiene la capacidad para describir de forma satisfactoria el cambio de metabolismo PAM a GAM.
7. Ninguna de las estrategias de recuperación de P estudiadas presentaron un efecto negativo en el proceso EBPR. Ningún grupo de bacterias GAOs se desarrollo, a pesar de que se efectuó repetidamente y de forma extrema la reducción del contenido de poli-P de la biomasa. En ninguna de las estrategias, la eficiencia del sistema de eliminación de P cambió. Valores bajos de la relación $P_{\text{liberado}}/HAc_{\text{tomado}}$ y los análisis microbiológicos corroboraron que el grupo de bacterias *Accumulibacter* presentó un cambio de metabolismo de PAM a GAM. Además, mostraron un cambio de poblaciones entre las especies PAO Tipo I y PAO Tipo II. Comparando el potencial de recuperación de P de ambas estrategias, la estrategia basada en la extracción con concentraciones altas de AGV permitió alcanzar una recuperación del fósforo del 81 % del fósforo entrante por semana. Consecuentemente los resultados obtenidos sugieren que la segunda estrategia es más apropiada para la recuperación de P con fines de re-uso a pesar del costo extra de fuente de carbono.

Capítulo 10

Desarrollos futuros

Esta Tesis Doctoral muestra la capacidad de las PAOs a adaptarse frente a la disponibilidad de distintas fuentes energéticas (poli-P o glucógeno). No obstante existen distintos aspectos que deberían ser abordados en estudios posteriores para completar el conocimiento iniciado en la presente tesis doctoral. Entre dichos aspectos cabe destacar:

1. Mejorar el modelo metabólico que describiría el comportamiento de las PAOs en condiciones aerobias, actualizando la determinación del parámetro P/O_2 (δ) cuando las PAOs presentan un metabolismo PAM y GAM.
2. Profundizar en la dinámica de las poblaciones de bacterias PAO Tipo I y PAO Tipo II que permitan conocer porque las PAO Tipo II prevalecen a corto plazo en ausencia de poli-P y las PAO Tipo I lo hacen a largo plazo.
3. Evaluar la estrategia de recuperación P en un SBR tratando agua residual real para eliminar biológicamente materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

Referencias

- Acevedo, B., A. Oehmen, G. Carvalho, A. Seco, L. Borrás, and R. Barat (2012). “Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage”. In: *Water Research* 46.6, pp. 1889–1900 (cit. on p. 40).
- Amann, R.L., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl (1990). “Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations”. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56.6, pp. 1919–1925 (cit. on pp. 53, 55).
- Arvin, E. and G.H. Kristensen (1985). “Exchange of organics, phosphate and cations between sludge and water in biological phosphorus and nitrogen removal processes”. In: *Water Science and Technology* 17, pp. 2147–2162 (cit. on p. 10).
- Ashley, K., D. Cordell, and D. Mavinic (2011). “A brief history of phosphorus: From the philosopher’s stone to nutrient recovery and reuse”. In: *Chemosphere* 84.6, pp. 737–746 (cit. on pp. 35, 36).
- Barat, R. (2004). «Estudio de la precipitación de fósforo inducida biológicamente en el tratamiento de aguas residuales». Tesis doct. Universidad Politécnica de Valencia (vid. pág. 47).
- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, A. Seco, and J. Ferrer (2006a). “Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal”. In: *Water Science and Technology* 53.12, pp. 29–37 (cit. on p. 143).
- Barat, R. and M.C.M. van Loosdrecht (2006b). “Potential phosphorus recovery in a WWTP with the BCFS® process: Interactions with the biological process”. In: *Water Research* 40.19, pp. 3507–3516 (cit. on p. 40).

- Barat, R., T. Montoya, L. Borrás, J. Ferrer, and A. Seco (2008). “Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism”. In: *Water Research* 42.13, pp. 3415–3424 (cit. on pp. 13, 34).
- Barnard, J.L. (1976). “A review of biological phosphorus removal in the activated sludge process”. In: *Water Sa* 2.3, pp. 136–144 (cit. on p. 8).
- Blackall, L.L., G.R. Crocetti, A.M. Saunders, and P.L. Bond (2004). “A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants”. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 81, pp. 681–691 (cit. on p. 27).
- Bond, P.L., R. Erhart, M. Wagner, J. Keller, and L.L. Blackall (1999). “Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems”. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65.9, pp. 4077–4084 (cit. on pp. 24, 25, 142).
- Borrás, L. (2008). «Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR». Tesis doct. Universidad Politécnica de Valencia (vid. págs. 26, 47, 53, 57).
- Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty (1978). “A rapid gas chromatographic method for determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass”. In: *European Journal of Applied Microbiology* 6, pp. 29–37 (cit. on p. 51).
- Brdjanovic, D., A. Slamet, M.C.M. van Loosdrecht, C. Hooijmans, G.J. Alaerts, and J.J. Heijnen (1998a). “Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater”. In: *Water Research* 32, pp. 200–208 (cit. on p. 13).
- Brdjanovic, D., S. Logemann, M.C.M. van Loosdrecht, C. Hooijmans, G.J. Alaerts, and J.J. Heijnen (1998b). “Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies”. In: *Water Research* 32.4, pp. 1035–1048 (cit. on p. 148).
- Carvalho, G., P.C. Lemos, A. Oehmen, and M.A.M. Reis (2007). “Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure”. In: *Water Research* 41.19, pp. 4383–4396 (cit. on p. 25).

- Cech, J.S. and P. Hartman (1990). "Glucose induced breakdown of enhanced biological phosphorus removal". In: *Environmental Technology* 11, pp. 651–656 (cit. on p. 11).
- Cech, J.S. and P. Hartman (1993). "Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphorus removal systems". In: *Water Research* 27, pp. 1219–1225 (cit. on p. 11).
- Comeau, Y., K.J. Hall, R.E.W. Hancock, and W.K. Oldham (1985). "Biochemical model for Enhanced Biological Phosphorus Removal." In: *Proc. UBC Conference on new directions and research in waste treatment and residual management*. Vancouver, Canada (cit. on p. 16).
- Comeau, Y., K.J. Hall, R.E.W. Hancock, and W.K. Oldham (1986). "Biochemical-model for enhanced biological phosphorus removal". In: *Water Research* 20, pp. 1511–1521 (cit. on pp. 11, 18, 142).
- Comeau, Y., B. Rabinowitz, K.J. Hall, and K.W. Oldham (1987). "Phosphate release and uptake in enhanced biological phosphorus removal from wastewater". In: *Journal WPCF* 59, pp. 707–715 (cit. on p. 10).
- Comeau, Y., K.J. Hall, and W.K. Oldham (1988). "Determination of Poly- β -hydroxybutyrate and Poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography". In: *Apply Enviromental Microbiology* 54, pp. 2325–2327 (cit. on p. 51).
- Corcoran, E. (2010). *Sick water?: the central role of wastewater management in sustainable development: a rapid response assessment*. UNEP/Earthprint (vid. pág. 3).
- Cordell, D., J.O. Drangert, and S. White (2009). "The story of phosphorus: Global food security and food for thought". In: *Global environmental change* 19.2, pp. 292–305 (cit. on pp. 2, 36, 37).
- Cordell, D., A. Rosemarin, J.J. Schröder, and A.L. Smit (2011). "Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options". In: *Chemosphere* 84.6, pp. 747–758 (cit. on pp. 38, 39).
- Crocetti, G.R., P. Hugenholtz, P.L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L.L. Blackall (2000). "Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and design of 16 rRNA-directed probes for their detection and quantification". In: *Applied and Environmental Microbiology* 66, pp. 1175–1182 (cit. on pp. 24–26, 54, 55).

- Crocetti, G.R., J.F. Banfield, J. Keller, P.L. Bond, and L.L. Blackall (2002). “Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes”. In: *Microbiology* 148.11, pp. 3353–3364 (cit. on pp. 26, 27).
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K-H. Schleifer, and M. Wagner (1999). “The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set”. In: *Systematic and Applied Microbiology* 22, pp. 434–444 (cit. on p. 55).
- DESA, UN (2011). *World population prospects: The 2010 revision, highlights and advance tables*. Tech. rep. Working Paper No ESPWP. 220. New York: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (cit. on p. 35).
- Eaton, A.D. and M.A.H. Franson, eds. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. APHA (American Public Health Association). American Public Health Association (cit. on pp. 50, 51).
- Edmondson, W.T. (1995). *Eutrophication. Encyclopedia of Environmental Biology, vol. 1* (cit. on p. 3).
- Elser, J. and E. Bennett (2011). “Phosphorus cycle: a broken biogeochemical cycle”. In: *Nature* 478.7367, pp. 29–31 (cit. on p. 37).
- Elser, J.J. (2012). “Phosphorus: a limiting nutrient for humanity?” In: *Current opinion in biotechnology* 23.6, pp. 833–838 (cit. on pp. 34–36).
- Erdal, U.G., Z.K. Erdal, G.T. Daigger, and C.W. Randall (2008). “Is it PAO-GAO competition or metabolic shift in EBPR system? Evidence from an experimental study”. In: *Water science and technology* 58.6, pp. 1329–34 (cit. on p. 143).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001a). “A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 76, pp. 17–31 (cit. on pp. 13, 23, 28, 141, 178).
- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001b). “pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms”. In: *Water Environmental Research* 73.2, pp. 223–232 (cit. on p. 144).

- Filipe, C.D.M., G.T. Daigger, and C.P.L. Grady (2001c). “Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 76, pp. 32–43 (cit. on pp. 22, 28, 178).
- Flowers, J.J., S. He, S. Yilmaz, D.R. Noguera, and K.D. McMahon (2009). “Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different *Candidatus Accumulibacter* clades”. In: *Environmental Microbiology Reports* 1.6, pp. 583–588 (cit. on pp. 25, 26, 55).
- Fuhs, G.W. and M. Chen (1975). “Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater”. In: *Microbial Ecology* 2, pp. 119–138 (cit. on p. 9).
- Fukase, T., M. Shibata, and Y. Miyaji (1985). “The role of the anaerobic stage on biological phosphorus removal”. In: *Water Science Technology* 17, pp. 69–80 (cit. on p. 11).
- Gatti, M. (2009). «Caracterización de las aguas residuales y calibración del modelo matemático BNRM1 para la simulación de los procesos de eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes». Tesis doct. Universida de Valencia (vid. pág. 51).
- Gerber, A., E.S. Mostert, C.T. Winter, and R.H. De Villiers (1986). “The effect of acetate and other short-chain carbon compounds on the kinetics of biological nutrient removal.” In: *Water S. A.* 12.1, pp. 7–12 (cit. on p. 11).
- Griffiths, P.C., H.M. Stratton, and R.J. Seviour (2002). “Environmental factors contributing to the G bacteria population in full-scale EBP plants”. In: *Water Science and Technology* 46, pp. 185–192 (cit. on pp. 13, 141).
- Gujer, W., M. Henze, T. Mino, T. Matsuo, M.C. Wentzel, and G.v.R. Marais (1995). “The Activated Sludge Model No. 2: Biological phosphorus removal”. In: *Water Science and Technology* 31.2. Modelling and Control of Activated Sludge Processes Selected Proceedings of the {IAWQ} International Specialized Seminar on Modelling and Control of Activated Sludge Processes, pp. 1–11 (cit. on p. 15).
- Gujer, W., M. Henze, T. Mino, and M.C.M. van Loosdrecht (1999). “Activated sludge model no. 3”. In: *Water Science and Technology* 39.1, pp. 183–193 (cit. on p. 16).

- He, S., A.Z. Gu, and K.D. McMahon (2005). “The role of Rhodocyclus-like organisms in biological phosphorus removal: factors influencing population structure and activity”. In: *Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference (WEFTEC 2005)*. Washington, DC, USA (cit. on p. 25).
- Hecky, R.E. and P. Kilham (1988). “Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment.” In: *Limnology and Oceanography* 33.4, pp. 796–822 (cit. on p. 3).
- Henze, M., C.P. L. Grady, W. Gujer, G.v.R. Marais, and T. Matsuo (1987). “A general model for single-sludge wastewater treatment systems”. In: *Water Research* 21.5, pp. 505–515 (cit. on p. 15).
- Henze, M., W. Gujer, T. Mino, T. Matsuo, M.C. Wentzel, G.v.R. Marais, and M.C.M. van Loosdrecht (1999). “Activated Sludge Model No.2d, ASM2d”. In: *Water Science and Technology* 39.1, pp. 165–182 (cit. on pp. 11, 15).
- Hesselmann, R.P.X., C. Werlen, D. Hahn, J.R. van der Meer, and A.J.B. Zehnder (1999). “Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge”. In: *Systematic and Applied Microbiology* 22, pp. 454–465 (cit. on pp. 24, 26, 54, 142).
- Hesselmann, R.P.X., R. Von Rummell, S.M. Resnickm, R. Hany, and A.J.B. Zehnder (2000). “Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal”. In: *Water Research*. 34, pp. 3487–3494 (cit. on pp. 29, 148–150).
- INE (2014). *INEbase: Operaciones estadísticas: clasificación por temas*. <http://www.ine.es/ss/Satellite?c=Page&pagename=INE%2FINELayout&cid=1254735905566&L=0>. Instituto Nacional de Estadística (vid. pág. 35).
- Jeon, C.O., D.S. Lee, M.W. Lee, and J.M. Park (2001). “Enhanced biological phosphorus removal in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor: effect of pH”. In: *Water Environmental Research*. 73, pp. 301–306 (cit. on p. 142).
- Kampfer, P., R. Erhart, C. Beimfohr, J. Bohringer, M. Wagner, and R. Amann (1996). “Characterization of bacterial communities from activated sludge-culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group and genus-specific rRNAtargeted oligonucleotide probes”. In: *Microbial ecology* 32, pp. 101–121 (cit. on p. 24).

- Karydis, M. and D. Kitsiou (2012). “Eutrophication and environmental policy in the Mediterranean Sea: a review”. In: *Environmental monitoring and assessment* 184.8, pp. 4931–4984 (cit. on p. 3).
- Kawaharasaki, M., H. Tanaka, T. Kanagawa y K. Nakamura (1999). «In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration». En: *Water Research* 33.1, págs. 257-265 (vid. pág. 25).
- Kisoglu, Z., U. Erdal, and C.W. Randall (2000). “The effect of CODTP ratio on intracellular storage materials, system performance and kinetic parameters in a BNR system”. In: *Proceedings of the 73rd annual Water Environment Federation mTechnical Exposition and Conference*. Anaheim, California (cit. on p. 144).
- Kong, Y., J.L. Nielsen y P.H. Nielsen (2005). «Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants». En: *Applied and environmental microbiology* 71.7, págs. 4076-4085 (vid. pág. 25).
- Kong, Y.H ., S.L. Ong, W.J. Ng, and W.T. Liu (2002a). “Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacteria group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes”. In: *Environmental Microbiology* 11, pp. 753–757 (cit. on pp. 26, 27, 55).
- Kong, Y.H., M. Beer, G.N. Rees, and R.J. Seviour (2002b). “Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios”. In: *Microbiology* 148, pp. 2299–2307 (cit. on p. 27).
- Kuba, T., E. Murnleitner, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1996). “A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms”. In: *Biotechnology and bioengineering* 52.6, pp. 685–695 (cit. on p. 21).
- Lemos, P.C., C. Viana, E.N. Salguero, A.M. Ramos, J.P.S.G. Crespo, and M.A.M. Reis (1998). “Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture”. In: *Enzyme Microbial Technology* 22, pp. 662–671 (cit. on p. 33).
- Lemos, P.C., Y. Dai, Z. Yuan, J. Keller, H. Santos, and M.A.M. Reis (2007). “Elucidation of metabolic pathways in glycogen-accumulating organisms with

- in vivo¹³C nuclear magnetic resonance”. In: *Environmental microbiology* 9.11, pp. 2694–2706 (cit. on p. 31).
- Levin, G.V. and H.J. Shapiro (1965). “Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms”. In: *Journal Water Pollut Control Federation* 37, pp. 800–821 (cit. on p. 8).
- Liu, W-T., T. Mino, K. Nakamura, and T. Matsuo (1996). “Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphate removal”. In: *Water Research* 30, pp. 75–82 (cit. on p. 33).
- Liu, W-T., K. Nakamura, T. Matsuo, and T. Mino (1997). “Internal energy-based competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating bacteria in biological phosphorus removal reactors-Effect of P/C feeding ratio”. In: *Water Research* 31.6, pp. 1430–1438 (cit. on pp. 34, 143).
- López-Vázquez, C.M., C.M. Hooijmans, D. Brdjanovic, H.J. Gijzen, and M.C.M. van Loosdrecht (2008). “Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands”. In: *Water Research* 42.10-11, pp. 2349–2360 (cit. on p. 148).
- López-Vázquez, C.M., A. Oehmen, C.M. Hooijmans, D. Brdjanovic, H.J. Gijzen, Z. Yuan, and M.C.M. van Loosdrecht (2009). “Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature”. In: *Water Research* 43.2, pp. 450–462 (cit. on pp. 24, 150, 151, 178, 180, 211).
- Manga, J., J. Ferrer, F. Garcia-Usach, and A. Seco (2001). “A modification to the Activated Sludge Model No. 2 based on the competition between phosphorus-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms”. In: *Water Science & Technology* 43.11, pp. 161–171 (cit. on p. 16).
- Manning, J.F. and R.L. Irvine (1985). “The biological removal of phosphorus in a sequencing batch reactor”. In: *Journal Water Pollution Control Federation* 57, pp. 87–94 (cit. on p. 10).
- Martín, H.G., N. Ivanova, V. Kunin, F. Warnecke, K.W. Barry, C. McHardy A.C. and Yeates, S. He, A.A. Salamov, E. Szeto, E. Dalin, N.H. Putnam, H.J. Shapiro, Pangilinan J.L., I. Rigoutsos, N.C. Kyrpides, L.L. Blackall, K.D. McMahon, and P. Hugenholtz (2006). “Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities”. In: *Nature Biotechnology* 24, pp. 1263–1269 (cit. on pp. 31, 32, 142, 148, 149).

- Meinhold, J., E. Arnold, and S. Isaacs (1999). “Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge”. In: *Water Research* 33, pp. 1871–1883 (cit. on pp. 12, 141).
- Metcalf, Eddy (2003). «Inc., Wastewater Engineering, Treatment and Reuse». En: *New York: McGraw-Hill* (vid. pág. 6).
- Meyer, R.L., A.M. Saunders, and L.L. Blackall (2006). “Putative glycogen accumulating organisms belonging to Alphaproteobacteria identified through rRNA-based stable isotope probing”. In: *Microbiology*. 152, pp. 419–429 (cit. on pp. 27, 55).
- Mino, T., V. Arun, Y. Tsuzuki, and T. Matsuo (1987). “Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphate removal processes”. In: *Advances in Water Pollution Control: Biological Phosphate Removal from Wastewater*. Oxford: Pergamon Press, pp. 27–38 (cit. on pp. 11, 12, 16, 17, 19–21, 28, 142).
- Mino, T., W.T. Liu, F. Kurisu, and T. Matsuo (1995). “Modeling glycogen-storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes”. In: *Water Science Technology* 31, pp. 25–34 (cit. on pp. 11, 15).
- Mino, T., M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1998). “Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process”. In: *Water Research* 32.11, pp. 3193–3207 (cit. on pp. 13, 142).
- Montoya, T. (2008). «Estudio del efecto de la concentración de calcio en los procesos de eliminación biológica de fósforo». Tesis doct. Universidad Politécnica de Valencia (vid. pág. 47).
- Moosbrugger, R.E., M.C. Wentzel, G.A. Ekama, and G.v.R. Marais (1992). *Simple Titration Procedures to determine H_2CO_3 alkalinity and short-chain fatty Acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acids/bases*. Tech. rep. TT 57/93. UCT (cit. on p. 49).
- Murnleitner, E., T. Kuba, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1997). “An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 54.5, pp. 434–450 (cit. on pp. 21, 211).

- Nicholls, H.A. and D.W. Osborn (1979). "Bacterial Stress: prerequisite for biological removal of phosphorus". In: *Journal WPCF* 51, pp. 557–569 (cit. on p. 9).
- Nielsen, A.T., W.T. Liu, C. Filipe, C. Grady, S. Molin, and D.A. Stahl (1999). "Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor". In: *Applied and Environmental Microbiology* 65, pp. 1251–1258 (cit. on pp. 26, 27, 142).
- Nielsen, P. H., H. Daims y H. Lemmer (2009). *FISH handbook for biological wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. Iwa publishing (vid. págs. 24, 54).
- Oehmen, A., Z. Yuan, L.L. Blackall, and J. Keller (2005a). "Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms". In: *Biotechnology and Bioengineering* 91, pp. 162–168 (cit. on p. 23).
- Oehmen, A., B. Keller-Lehmann, R.J. Zeng, Z. Yuan, and J. Keller (2005b). "Optimisation of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems". In: *Journal of Chromatography A* 1-2.1070, pp. 131–136 (cit. on pp. 51, 52).
- Oehmen, A., A.M. Saunders, M.T. Vives, Z. Yuan, and J. Keller (2006). "Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources". In: *Journal of Biotechnology* 123.1, pp. 22–32 (cit. on p. 23).
- Oehmen, A., P.C. Lemos, G. Carvalho, Z.G. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, and M.A.M. Reis (2007a). "Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale". In: *Water Research* 41.11, pp. 2271–2300 (cit. on pp. 14, 16, 25, 28).
- Oehmen, A., R.J. Zeng, J. Keller, and Z. Yuan (2007b). "Modeling the aerobic metabolism of polyphosphate-accumulating organisms enriched with propionate as a carbon source". In: *Water Environment Research* 79.13, pp. 2477–2486 (cit. on p. 23).
- Oehmen, A., G. Carvalho, C.M. Lopez-Vazquez, M.C.M. van Loosdrecht, and M.A.M. Reis (2010a). "Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms". In: *Water Research* 44.17. Microbial ecology of drinking

- water and waste water treatment processes, pp. 4992–5004 (cit. on pp. 148, 211).
- Oehmen, A., C.M. Lopez-Vazquez, G. Carvalho, M.A.M. Reis, and M.C.M. van Loosdrecht (2010b). “Modelling the population dynamics and metabolic diversity of organisms relevant in anaerobic/anoxic/aerobic enhanced biological phosphorus removal processes”. In: *water research* 44.15, pp. 4473–4486 (cit. on p. 24).
- Pattarkine, V.M. and C.W. Randall (1999). “The requirement of metal cations for enhanced biological phosphorus removal by activated sludge”. In: *Water Science and Technology* 40, pp. 159–165 (cit. on p. 13).
- Pereira, H., P.C. Lemos, M.A.M. Reis, J.P.S.G. Crespo, M.J.T. Carrondo, and H. Santos (1996). “Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on in vivo¹³C-NMR labelling experiments”. In: *Water Research* 30.9, pp. 2128–2138 (cit. on p. 30).
- Pijuan, M., A.M. Saunders, A. Guisasola, J.A. Baeza, C. Casas, and L.L. Blackall (2004). “Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source”. In: *Biotechnology and bioengineering* 85.1, pp. 56–67 (cit. on p. 16).
- Pijuan, M., A. Guisasola, J.A. Baeza, J. Carrera, C. Casas, and J. Lafuente (2005). “Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake: Influence of PAO intracellular storage compounds”. In: *Biochemical Engineering Journal* 26.2-3. Engineering Bioreaction Systems: A Spanish Perspective, pp. 184–190 (cit. on pp. 13, 141).
- Pijuan, M., C. Casas, and J.A. Baeza (2009). “Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorus removal microbial communities”. In: *Process Biochemistry* 44.1, pp. 97–105 (cit. on p. 148).
- Randall, A.A. and W-T. Liu (2002). “Polyhydroxyalkanoates form potentially a key aspect of aerobic phosphorus uptake in enhanced biological phosphorus removal”. In: *Water Research* 36, pp. 3473–3478 (cit. on p. 33).
- Reis, M.A.M., L.S. Serafim, P.C. Lemos, A.M. Ramos, F.R. Aguiar, and M.C.M. van Loosdrecht (2003). “Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures”. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25.6, pp. 377–385 (cit. on pp. 30, 142, 149).

- Rickard, L.F. and S.A. McClintock (1992). "Potassium and magnesium requirements for enhanced biological phosphorus removal from wastewater". In: *Water Science and Technology* 26, pp. 2203–2206 (cit. on p. 10).
- Satoh, H., T. Mino, and T. Matsuo (1992). "Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes". In: *Water Science & Technology* 26.5-6, pp. 933–942 (cit. on p. 28).
- Saunders, A.M. (2005). "The physiology of microorganisms in enhanced biological phosphorous removal". PhD thesis. University of Queensland, Australia (cit. on pp. 30, 148).
- Saunders, A.M., A. Oehmen, L.L. Blackall, Z. Yuan y J. Keller (2003). «The effect of GAOs on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR plants». En: *Water Science Technology* 47.11, págs. 37-43 (vid. pág. 143).
- Schindler, D.W. (1977). "Evolution of phosphorus limitation in lakes". In: *Science* 195.4275, pp. 260–262 (cit. on p. 3).
- Schlesinger, W.H. and E.S. Bernhardt (2013). *Biogeochemistry: an analysis of global change*. Academic press (cit. on p. 3).
- Schuler, A.J. and D. Jenkins (2003a). "Enhanced Biological Phosphorus Removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, Part I: Experimental results and comparison with metabolic models". In: *Water Environment Research* 75.6, pp. 485–498 (cit. on pp. 33, 34).
- Schuler, A.J. and D. Jenkins (2003b). "Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, Part III: Anaerobic sources of reducing equivalents". In: *Water Environmental Research* 75.6, pp. 512–522 (cit. on p. 142).
- Serralta, J., J. Ferrer, L. Borrás y A. Seco (2004). «An extension of ASM2d including pH calculation». En: *Water Research* 38.19, págs. 4029 -4038 (vid. pág. 16).
- Seviour, R.J. and L.L. Blackall (1999). *The microbiology of activated sludge*. Kluwer Academic Publishers (cit. on p. 52).

- Smith, V.H. (1998). "Cultural eutrophication of inland, estuarine, and coastal waters". In: *Successes, limitations, and frontiers in ecosystem science*. Springer, pp. 7–49 (cit. on p. 3).
- Smith, V.H., G.D. Tilman, and J.C. Nekola (1999). "Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems". In: *Environmental Pollution* 100.1-3, pp. 179–196 (cit. on p. 3).
- Smolders, G.J.F., J. Vandermeij, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1994a). "Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence". In: *Biotechnology and Bioengineering* 43, pp. 461–470 (cit. on pp. 13, 21, 22, 28, 141, 142, 150, 178).
- Smolders, G.J.F., J. van der Meij, M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1994b). "Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process". In: *Biotechnology and Bioengineering* 44, pp. 837–848 (cit. on pp. 12, 13, 21).
- Smolders, G.J.F., M.C.M. van Loosdrecht, and J.J. Heijnen (1995). "A metabolic model for the biological phosphorus removal process". In: *Water Science and Technology* 31.2. Modelling and Control of Activated Sludge Processes, pp. 79–93 (cit. on pp. 21, 22, 144).
- Tchobanoglous, G. and F.L. Burton (1991). *Wastewater Engineering: Treatment disposal and reuse*. Wastewater Engineering. New York: Metcalf and Eddy Incorporated (cit. on p. 4).
- Verstraete, W., P. van de Caveye, and V. Diamantis (2009). "Maximum use of resources present in domestic used water". In: *Bioresource technology* 100.23, pp. 5537–5545 (cit. on p. 37).
- Vitousek, P.M. and R.W. Howarth (1991). "Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur?" In: *Biogeochemistry* 13.2, pp. 87–115 (cit. on p. 3).
- Voet, D. y J.G. Voet (2006). *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana (vid. pág. 17).
- Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K.-H. Schleifer (1994). "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge". In: *Applied and Environmental Microbiology* 60, pp. 792–800 (cit. on p. 24).

- WBG (2014). *Data*. OnLine: <http://data.worldbank.org/>. World Bank Group (cit. on p. 35).
- Welles, L., W.D. Tian, S. Saad, B. Abbas, C.M. Lopez-Vazquez, C.M. Hooijmans, M.C.M van Loosdrecht, and D. Brdjanovic (2015). “Accumulibacter clades Type I and II performing kinetically different glycogen-accumulating organisms metabolisms for anaerobic substrate uptake”. In: *Water research* 83, pp. 354–366 (cit. on p. 142).
- Ramadori, R., ed. (1987). *Experiments towards establishing the kinetics of biological excess phosphorus removal*. Vol. 4. In *Advances in Water Pollution Control. Biological Phosphate Removal from Wastewaters*, p. 79 (cit. on pp. 17, 19).
- Wentzel, M.C., L.H. Lotter, R.E. Loewenthal, and G.v.R. Marais (1986). “Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal-a biochemical model”. In: *Water SA* 12, pp. 209–224 (cit. on pp. 11, 16, 18, 21, 28).
- Wentzel, M.C., G.A. Ekama, R.E. Loewenthal, P.L. Dold, and G.v.R. Marais (1989a). “Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems. Part II: Experimental behaviour.” In: *Water S. A.* 15.2, pp. 71–88 (cit. on pp. 12, 13).
- Wentzel, M.C., P.L. Dold, G.A. Ekama, and G.v.R. Marais (1989b). “Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems. Part III: Kinetic model.” In: *Water S. A.* 15.2, pp. 89–102 (cit. on pp. 15, 141).
- Westerson, K. (2015). *Phosphorus cycle*. Online. http://www.greenlivingaz.com/2013/11/06/phosphorus_study/. Green Living AZ (cit. on p. 36).
- Wang, L.M. and J.K. Park (2002). “Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in biological phosphorus removal systems-effect of temperature”. In: *Water Science and Technology* 46, pp. 191–194 (cit. on pp. 13, 23, 141).
- Wong, M.T., F.M. Tan, W.J. Ng, and W.T. Liu (2004). “Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes”. In: *Microbiology* 150, pp. 3741–3748 (cit. on pp. 27, 55).
- Wong, M.T., T. Mino, R.J. Seviour, M. Onuki, and W.T. Liu (2005). “*In situ* identification and characterization of the microbial community structure of

-
- full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan”. In: *Water Research* 39, pp. 2901–2914 (cit. on p. 25).
- Yagci, N., N. Artan, E.w.U. Cokgor, C.W. Randall, and D. Orhon (2003). “Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate-and glycogen accumulating organisms under anaerobic conditions”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 84.3, pp. 359–373 (cit. on p. 23).
- Yuan, Z., S. Pratt, and D.J. Batstone (2012). “Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes”. In: *Current opinion in biotechnology* 23.6, pp. 878–883 (cit. on pp. 38–40).
- Zeng, R., Z. Yuan, M.C.M. van Loosdrecht, and J. Keller (2002a). “Proposed modifications to metabolic model for glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 80.3, pp. 277–279 (cit. on p. 23).
- Zeng, R. J., Z. Yuan, and J. Keller (2003). “Model-based analysis of anaerobic acetate uptake by a mixed culture of polyphosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 83.3, pp. 293–302 (cit. on pp. 23, 142, 150, 178).
- Zeng, R.J., M.C.M. van Loosdrecht, Z Yuan, and J. Keller (2002b). “Metabolic model for Glycogen-Accumulating Organisms in Anaerobic/Aerobic activated sludge systems”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 81, pp. 92–105 (cit. on p. 23).
- Zhang, C., Y. Chen, A.A. Randall, and G. Gu (2008). “Anaerobic metabolic models for phosphorus-and glycogen-accumulating organisms with mixed acetic and propionic acids as carbon sources”. In: *Water research* 42.14, pp. 3745–3756 (cit. on p. 23).
- Zhou, Y., M. Pijuan, R.J. Zeng, L. Huabing, and Z. Yuan (2008). “Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)?” In: *Water Research* 42, pp. 2361–2368 (cit. on pp. 34, 143, 146, 151).
- Zhou, Y., M. Pijuan, R.J. Zeng, and Z. Yuan (2009). “Involvement of the TCA cycle in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs)”. In: *Water Research* 43.5, pp. 1330–1340 (cit. on p. 149).
- Zilles, J.L., J. Peccia, M.W. Kim, C.H. Hung, and D.R. Noguera (2002). “Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorus removal in full-scale

wastewater treatment plants". In: *Applied and Environmental Microbiology* 68, pp. 2763–2769 (cit. on pp. 25, 26).

Appendix A

Stoichiometric matrix

Table A.1: Stoichiometric matrix (S).

Process	Soluble components			
	1	2	3	4
	S_{O_2}	S_{CO_2}	S_{HAc}	S_{PO_4}
Anaerobic acetate uptake	-	$Y_{CO_2}^{PAO} + (Y_{CO_2}^{GAO} - Y_{CO_2}^{PAO}) \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$	-1	$Y_{PO_4}^{PAO} \times \frac{f_{PP,PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$
Anaerobic maintenance	-	$Y_{CO_2,mana}^{GAO} \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$		$1 \times \frac{f_{PP,PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$
Anaerobic PHA degradation	$-i_{O_2,PHA}^{PAO}$			$-i_{PO_4,X}^{PAO}$
Aerobic GLY production	$i_{O_2,GLY}^{PAO}$			$i_{PO_4,GLY}^{PAO}$
Aerobic Poly-P formation	$i_{O_2,PP}^{PAO}$			$-i_{PO_4,PP}^{PAO}$
Aerobic maintenance	$i_{O_2,maer}^{PAO}$			$i_{PO_4,maer}^{PAO}$

where:

$$i_{O_2,PHA}^{PAO} = \frac{Y_{S,X}^{PAO}}{Y_{O,X}^{PAO}}$$

$$i_{PO_4,X}^{PAO} = i_{BM,P} \times Y_{S,X}^{PAO}$$

$$i_{O_2,GLY}^{PAO} = \frac{Y_{S,X}^{PAO}}{(Y_{O,X}^{PAO} \times Y_{S,GLY}^{PAO}) - \left(\frac{1}{Y_{O,GLY}^{PAO}}\right)}$$

$$i_{PO_4,GLY}^{PAO} = i_{BM,P} \times \frac{Y_{S,X}^{PAO}}{Y_{S,GLY}^{PAO}}$$

$$i_{O_2,PP}^{PAO} = \frac{Y_{S,X}^{PAO}}{(Y_{O,X}^{PAO} \times Y_{S,GLY}^{PAO}) - \left(\frac{1}{Y_{O,PP}^{PAO}}\right)}$$

$$i_{PO_4,PP}^{PAO} = \left(i_{BM,P} \times \frac{Y_{S,X}^{PAO}}{Y_{S,PP}^{PAO}}\right) - 1$$

$$i_{O_2,maer}^{PAO} = \left(\frac{Y_{S,X}^{PAO}}{Y_{O,X}^{PAO}}\right) - 1$$

$$i_{PO_4,maer}^{PAO} = i_{BM,P} \times Y_{S,X}^{PAO}$$

Table A.2: Stoichiometric matrix (X).

Process	Particulate components			
	5	6	7	8
	X_{PHA}^{PAO}	X_{GLY}^{PAO}	X_{PP}^{PAO}	X_{PAO}
Anaerobic acetate uptake	$Y_{PHA}^{PAO} + (Y_{PHA}^{GAO} - Y_{PHA}^{PAO}) \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{J_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$	$-Y_{GLY}^{PAO} - (Y_{GLY}^{GAO} - Y_{GLY}^{PAO}) \times \frac{K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}{J_{PP,PAO} + K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}$	$-Y_{PO_4}^{PAO} \times \frac{J_{PP,PAO}}{J_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$	-
Anaerobic maintenance	$Y_{PHA}^{GAO} \times \frac{K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}{J_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}}$	$-1 \times \frac{K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}{J_{PP,PAO} + K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}}$	$-1 \times \frac{J_{PP,PAO}}{J_{PP,PAO} + K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}}$	-
Anaerobic PHA degradation	-1			$Y_{S,X}^{PAO}$
Aerobic GLY production		1		$-i_{X,GLY}^{PAO}$
Aerobic Poly-P formation			1	$-i_{X,PP}^{PAO}$
Aerobic maintenance				$-Y_{S,X}^{PAO}$

where:

$$i_{X,GLY}^{PAO} = -\frac{Y_{S,X}^{PAO}}{Y_{S,GLY}^{PAO}}$$

$$i_{X,PP}^{PAO} = -\frac{Y_{S,X}^{PAO}}{Y_{S,PP}^{PAO}}$$

Table A.3: Anaerobic stoichiometric of *Accumulibacter*.

Parameter	Value	Units	Description	Source
$Y_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$	$\frac{4}{3}$	C-mmol	PHA stored per 1 C-mmol acetate taken up.	Smolders <i>et al.</i> , 1994a
$Y_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$	$\frac{1}{2}$	C-mmol	Glycogen consumed per 1 C-mmol acetate taken up.	Smolders <i>et al.</i> , 1994a
$Y_{\text{CO}_2}^{\text{PAO}}$	$\frac{1}{6}$	C-mmol	CO ₂ released per 1 C-mmol acetate taken up.	
$Y_{\text{PO}_4}^{\text{PAO}}$	$\frac{1}{4} + \alpha_{\text{HAc}}^{\text{PAO}}$	P-mmol	Poly-P consumed per 1 C-mmol acetate taken up.	Smolders <i>et al.</i> , 1994a
$\alpha_{\text{HAc}}^{\text{PAO}}$	$0.16 \times \text{pH}_{\text{out}} - 0.7985$	ATP-mmol	ATP necessary to transport 1 C-mmol acetate through cell membrane.	Filipe <i>et al.</i> , 2001c
$Y_{\text{PHA}}^{\text{GAO}}$	a	C-mmol	PHA stored per 1 C-mmol acetate taken up when PAOs present a metabolic GAM.	Zeng <i>et al.</i> , 2003
$Y_{\text{GLY}}^{\text{GAO}}$	$1 + 2 + \alpha_{\text{HAc}}^{\text{PAO}}$	C-mmol	Glycogen consumed per 1 C-mmol acetate taken up when PAOs present a metabolic GAM.	Filipe <i>et al.</i> , 2001a
$Y_{\text{CO}_2}^{\text{GAO}}$	$\frac{1}{4} + \frac{\alpha_{\text{HAc}}^{\text{PAO}}}{3}$	C-mmol	CO ₂ released per 1 C-mmol acetate taken up when PAOs present a metabolic GAM.	
$\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}$	$0.057 \times \text{pH}_{\text{out}} - 0.34$	ATP-mmol	ATP necessary to transport 1 C-mmol acetate through cell membrane when PAOs present a metabolic GAM.	Filipe <i>et al.</i> , 2001a
$Y_{\text{PHAm}_a}^{\text{GAO}}$	$\frac{1}{6} + \frac{1}{12} + \frac{1}{4}$	C-mmol	PHA stored per 1 C-mmol glycogen consumed when PAOs present a metabolic GAM.	
$Y_{\text{CO}_2 \text{ m}_a}^{\text{GAO}}$	$\frac{1}{6}$	C-mmol	CO ₂ released per 1 C-mmol glycogen consumed when PAOs present a metabolic GAM.	

$$a = \frac{\left(\frac{9}{6} + \frac{2}{3}\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}\right)^2}{\frac{5}{3} + \frac{4}{3}\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}} + \frac{2.5 \times \left(\frac{9}{6} + \frac{2}{3}\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}\right) \left(\frac{1}{6} + \frac{2}{3}\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}\right)}{\frac{5}{3} + \frac{4}{3}\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}} + 1.5 \times \frac{\left(\frac{1}{6} + \frac{2}{3}\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}\right)^2}{\frac{5}{3} + \frac{4}{3}\alpha_{\text{HAc}}^{\text{GAO}}}$$

Note: Aerobic stoichiometric parameters for *Accumulibacter* (see López-Vázquez *et al.*, 2009).

Table A.4: Kinetic expression for *Accumulibacter*.

Anaerobic acetate uptake	$q_{S,HAc}^{max} \times \frac{S_{HAc}}{S_{HAc} + K_{S,HAc}} \times \frac{f_{GLY,PAO}}{f_{GLY,PAO} + \left(K_{S,GLY}^{PAM} + (K_{S,GLY}^{GAM} - K_{S,GLY}^{PAM}) \times \frac{K_{S,GLY}^{PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,GLY}^{PAO}} \right)} \times \frac{f_{PHA,PAO}^{max} - f_{PHA,PAO}}{f_{PHA,PAO}^{max} - f_{PHA,PAO} + K_{S,PHA}} \times \left(1 - \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{S,O_2}} \right) \times X_{PAO}$
Anaerobic maintenance	$m_{ana} \times 1 - \frac{SO_2}{SO_2 + K_{S,O_2}} \times X_{PAO}$
Anaerobic PHA degradation	$q_{PHA}^{PAO} \times (f_{PHA,PAO})^{\frac{2}{3}} \times \frac{f_{PHA,PAO}}{f_{PHA,PAO} + \left(K_{S,PHA_{aer}}^{PAM} + (K_{S,PHA_{aer}}^{GAM} - K_{S,PHA_{aer}}^{PAM}) \times \frac{K_{S,PHA_{aer}}^{PAO}}{f_{PP,PAO} + K_{S,PHA_{aer}}^{PAO}} \right)} \times \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{S,O_2}} \times X_{PAO}$
Aerobic GLY production	$q_{GLY}^{PAO} \times \frac{1}{f_{GLY,PAO}} \times \frac{f_{GLY,PAO}^{max} - f_{GLY,PAO}}{f_{GLY,PAO}^{max} - f_{GLY,PAO} + K_{S,GLY_{aer}}} \times (f_{PHA,PAO})^{\frac{2}{3}} \times \frac{f_{PHA,PAO}}{f_{PHA,PAO} + K_{S,PHA_{aer}}^{GLY}} \times \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{S,O_2}} \times X_{PAO}$
Aerobic Poly-P formation	$q_{PP}^{PAO} \times \frac{1}{f_{PP,PAO}} \times \frac{f_{PP,PAO}^{max} - f_{PP,PAO}}{f_{PP,PAO}^{max} - f_{PP,PAO} + K_{S,PP_{aer}}} \times \frac{f_{PHA,PAO}}{f_{PHA,PAO} + K_{S,PHA_{aer}}^{PP}} \times \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{S,PO_4}} \times \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{S,O_2}} \times X_{PAO}$
Aerobic maintenance	$m_{aer} \times \frac{SO_2}{SO_2 + K_{S,O_2}} \times X_{PAO}$

Table A.5: Kinetics parameters and kinetic coefficients for biomass.

ANAEROBIC KINETICS PARAMETERS				
Process	Parameters	Value	Units	Source
Maximum anaerobic acetate	$q_{S,HAc}^{max}$	0.37	C-mmol/(C-mmol/h)	This study
Anaerobic maintenance rate	m_{ana}^{ATP}	2.35×10^{-3}	ATP-mmol/(C-mmol/h)	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
AEROBIC KINETICS PARAMETERS				
Process	Parameter	Value	Units	Source
Aerobic PHA degradation rate	q_{PHA}^{PAO}	0.8	C-mmol/(C-mmol/h)	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Aerobic glycogen production rate	q_{GLY}^{PAO}	0.17	C-mmol/(C-mmol/h)	This study
Aerobic Poly-P formation rate	q_{PP}^{PAO}	0.01	P-mmol/(C-mmol/h)	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Aerobic maintenance	m_{aer}	*	C-mmol/(C-mmol/h)	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
ANAEROBIC KINETIC COEFFICIENTS FOR BIOMASS				
Description	Kinetic coefficients	Value	Units	Source
Half-saturation coefficient for acetate	$K_{S,HAc}$	0.1	C-mmol/l	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Glycogen half saturation constant for PAM in the anaerobic acetate uptake process	$K_{S,GLY}^{PAM}$	0.01	C-mmol/ C-mmol	This study
Glycogen half saturation constant for GAM in the anaerobic acetate uptake process	$K_{S,GLY}^{GAM}$	0.3	C-mmol/ C-mmol	This study
Glycogen half saturation constant in the anaerobic acetate uptake process	$K_{S,GLY}^{PAO}$	0.005	C-mmol/ C-mmol	This study
Half-saturation coefficient for PHA	$K_{S,PHA}$	0.01	C-mmol/ C-mmol	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Half-saturation coefficient for oxygen	K_{S,O_2}	0.01	O ₂ -mmol/l	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
AEROBIC KINETIC COEFFICIENTS FOR BIOMASS				
Description	Kinetic coefficients	Value	Units	Source
PAM in the aerobic PHA degradation process	$K_{S,PHA,aer}^{PAM}$	0.1	C-mmol/ C-mmol	This study
PHA half saturation constant for GAM in the aerobic PHA degradation process	$K_{S,PHA,aer}^{GAM}$	8	C-mmol/ C-mmol	This study
Half-saturation coefficient for PHA	$K_{S,PHA}$	0.01	C-mmol/ C-mmol	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Half-saturation coefficient for oxygen	K_{S,O_2}	0.01	O ₂ -mmol/l	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Half-saturation coefficient for GLY	K_{GLY}	0.01	C-mmol/ C-mmol	This study
Half-saturation coefficient for PHA	K_{PHA}	1	C-mmol/ C-mmol	This study
Half-saturation coefficient for polyphosphate (poly-P)	$K_{S,PP,aer}$	0.01	C-mmol/ C-mmol	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Half-saturation coefficient for PHA	$K_{PHA,aer}^{PP}$	0.01	C-mmol/ C-mmol	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Half-saturation coefficient for orthophosphate	K_{S,PO_4}	0.1	P-mmol/l	This study
Maximum glycogen fraction in Accumulibacter biomass	$J_{PAO,GLY}^{max}$	0.27	C-mmol/ C-mmol	López-Vázquez <i>et al.</i> , 2009
Maximum poly-P fraction in Accumulibacter biomass	$J_{PAO,PP}^{max}$	0.5	P-mmol/ C-mmol	This study

$$\begin{aligned}
 & 0.228 \\
 & 6 \left(\frac{X_{PAO}}{X_{PHE}} + \frac{2X_{PHS}}{X_{PHA}} + \frac{X_{PAO}}{5} \right) + 27 \left(\frac{X_{PAO}}{X_{PHE}} + \frac{2X_{PHV}}{X_{PHA}} + \frac{X_{PAO}}{5} \right) \times 1.85 + 2 \left(\frac{X_{PAO}}{X_{PHMV}} + \frac{2X_{PHV}}{X_{PHA}} + \frac{X_{PAO}}{5} \right) + 4 \left(\frac{X_{PAO}}{X_{PHMV}} + \frac{2X_{PHV}}{X_{PHA}} + \frac{X_{PAO}}{5} \right) 1.85
 \end{aligned}$$

a

Appendix B

Anaerobic and aerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic, coefficient and stoichiometric parameters

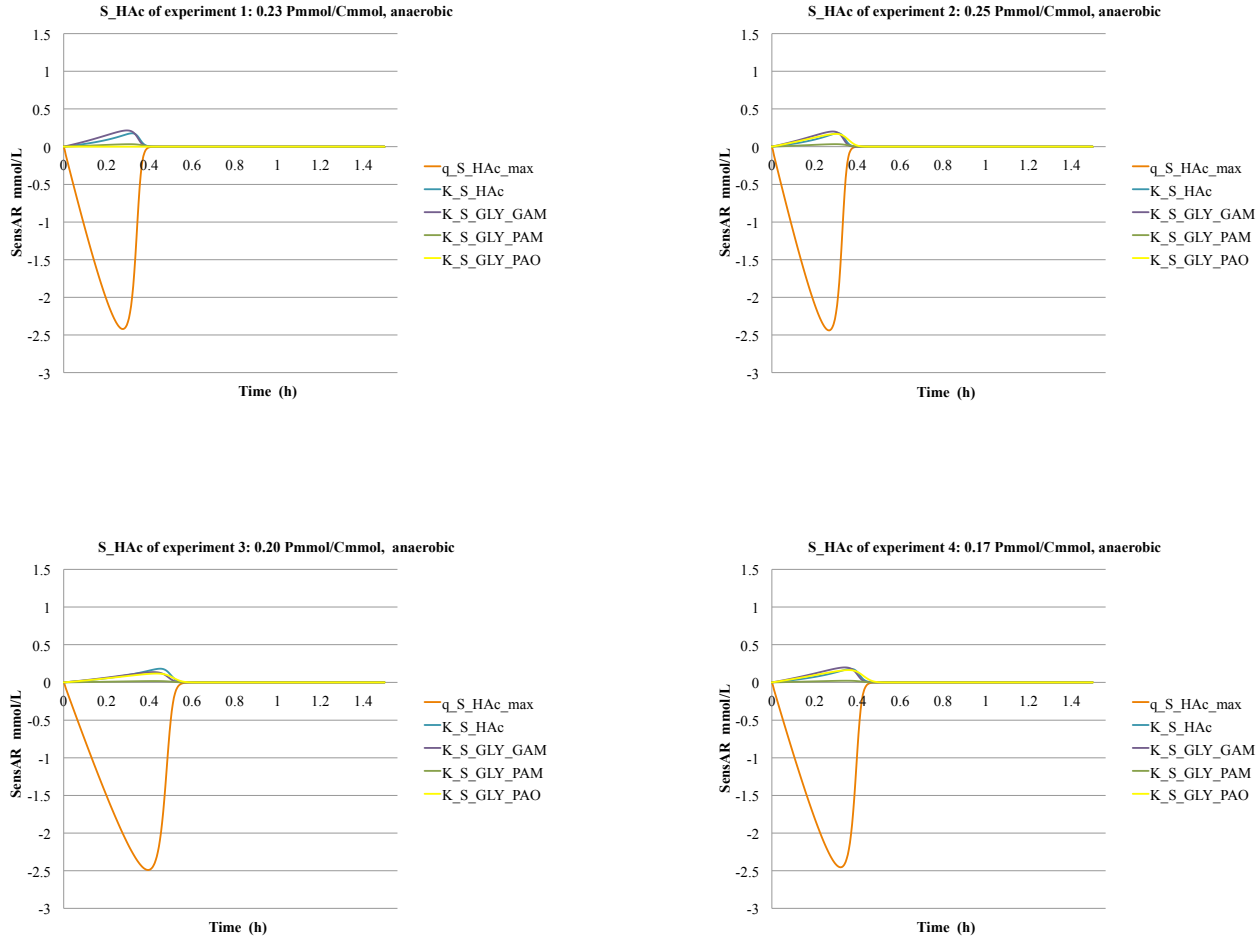


Figure B.1: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters. S_HAc, experiments 1 to 4.

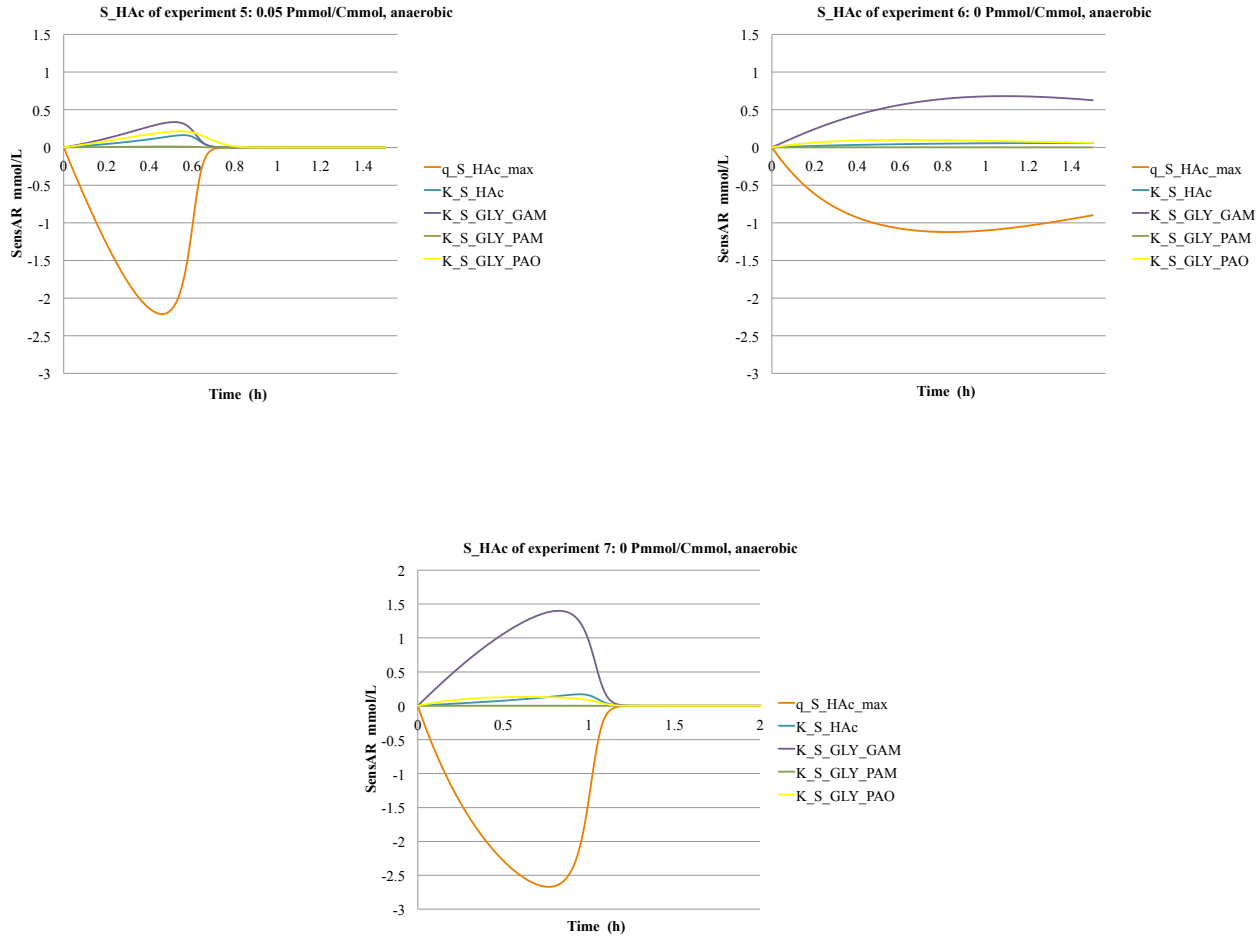


Figure B.1: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters. S_HAc, experiments 5 to 7.

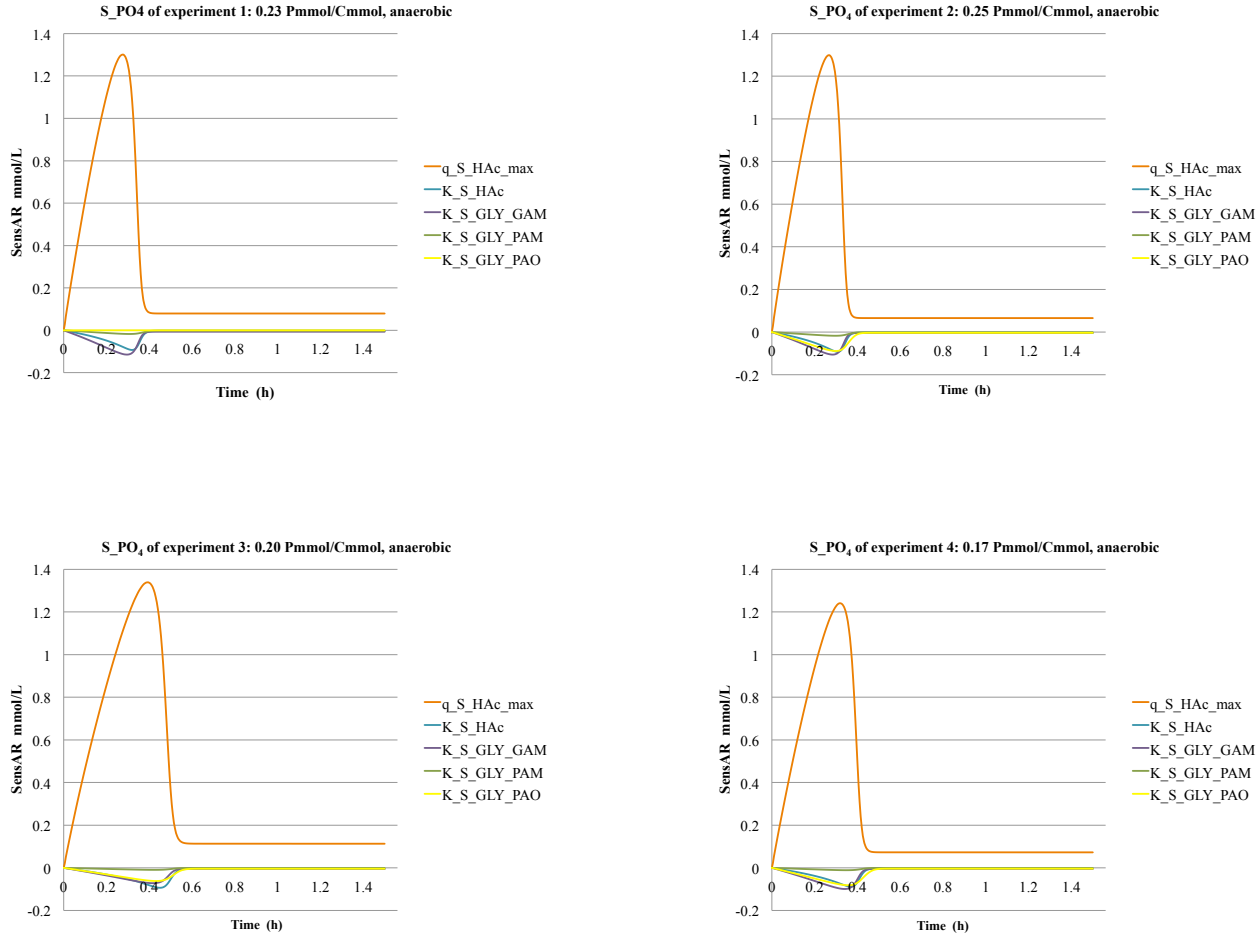


Figure B.2: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters. S_{PO_4} , experiments 1 to 4.

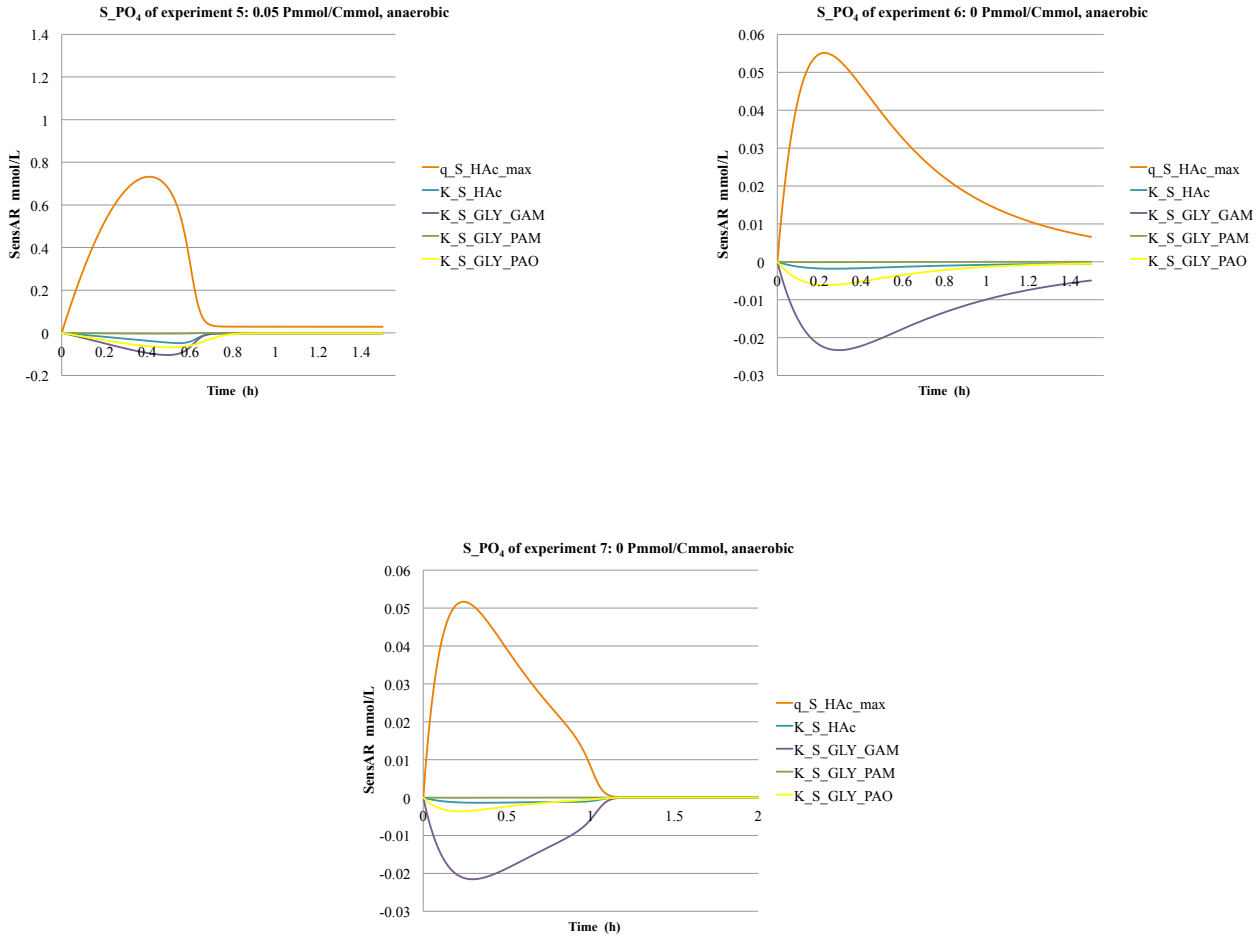


Figure B.2: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters. S_{PO_4} , experiments 5 to 7.

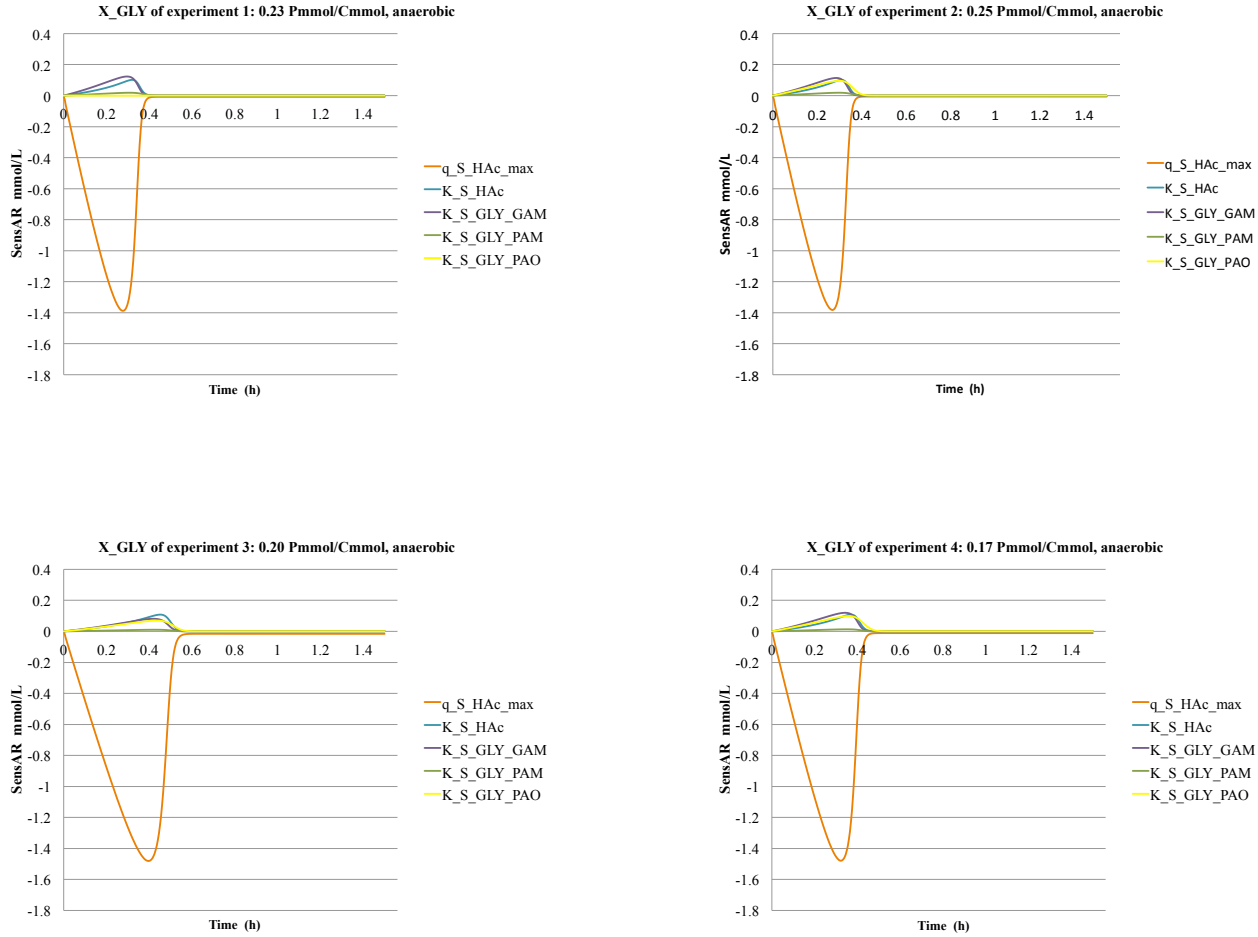


Figure B.3: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

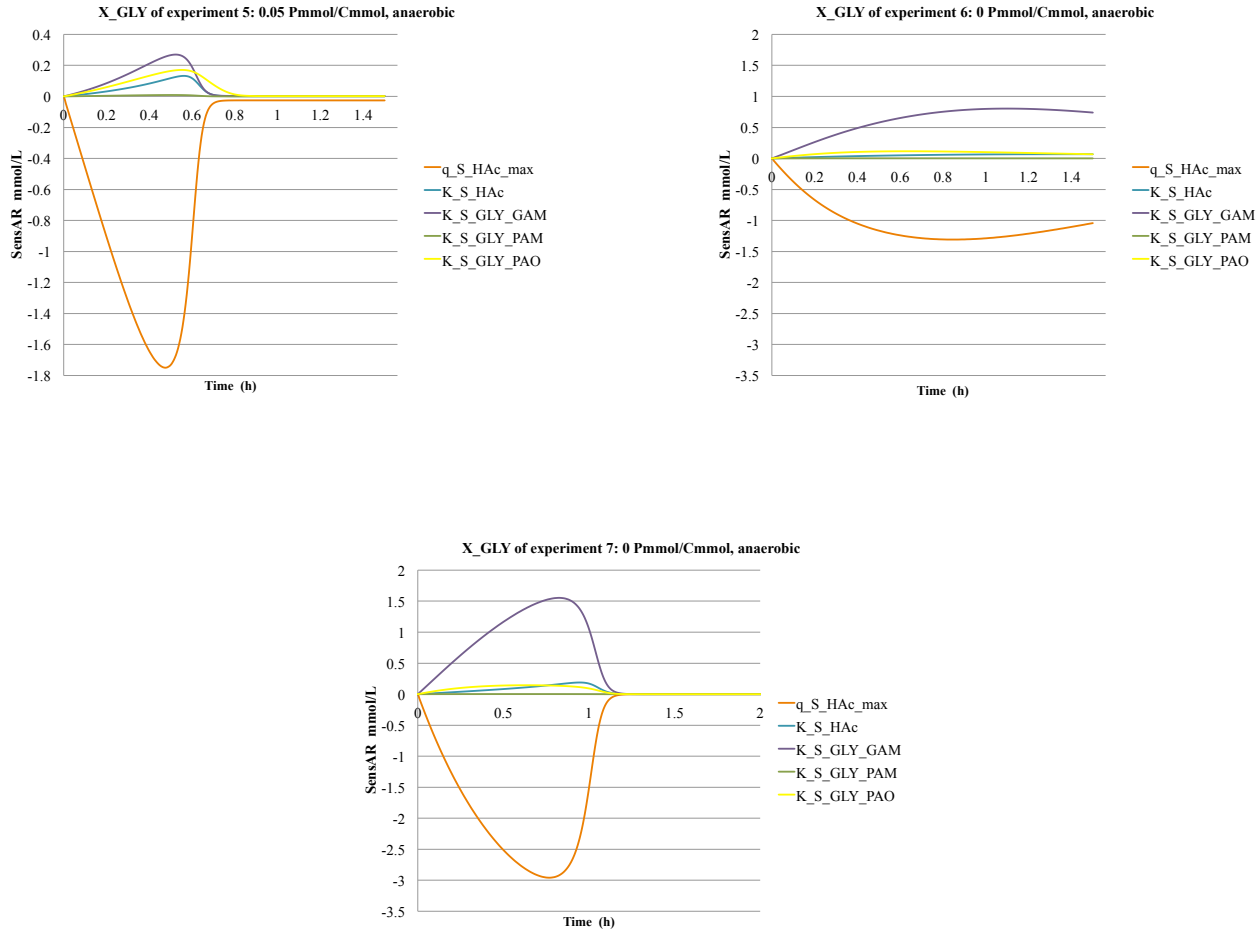


Figure B.3: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

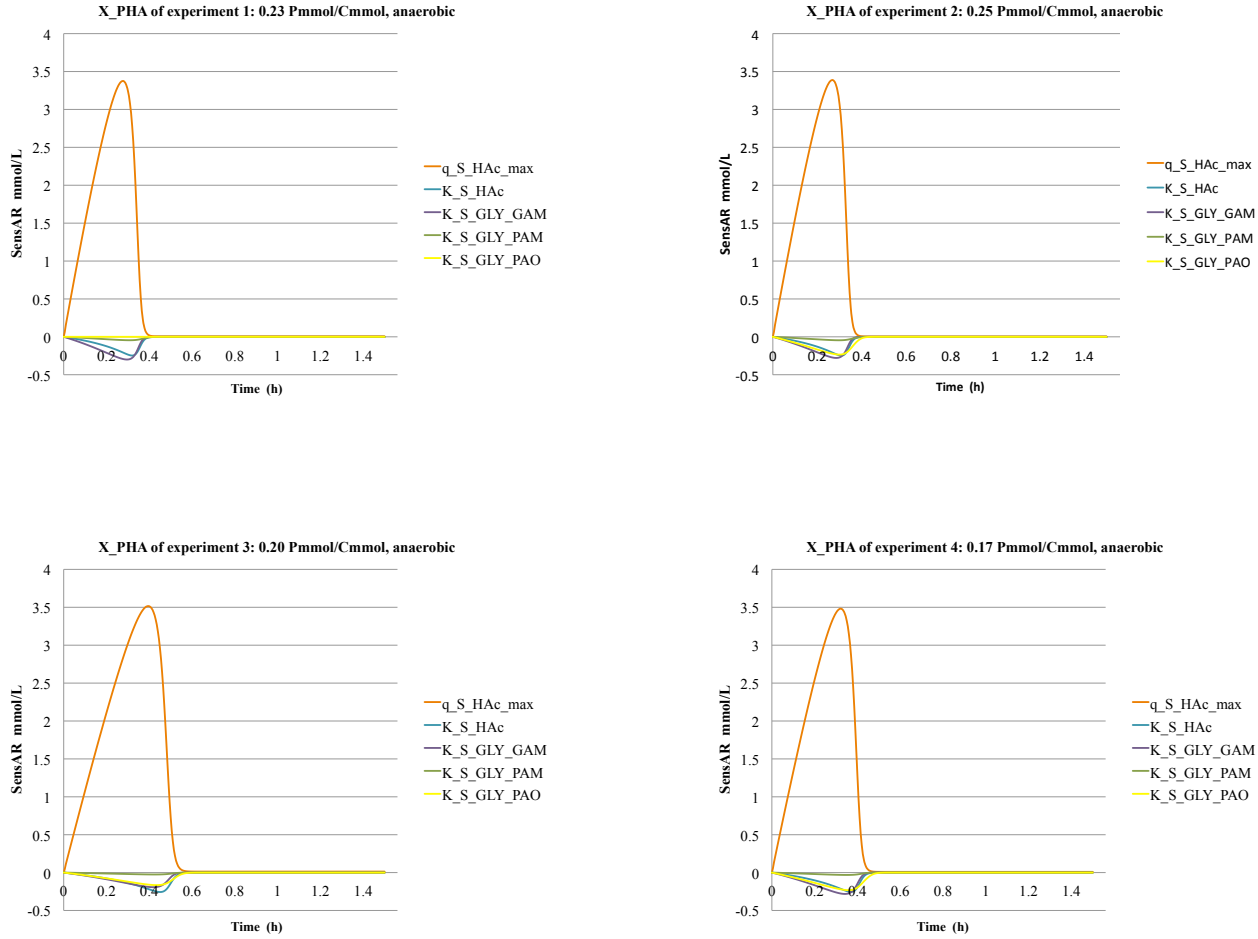


Figure B.4: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

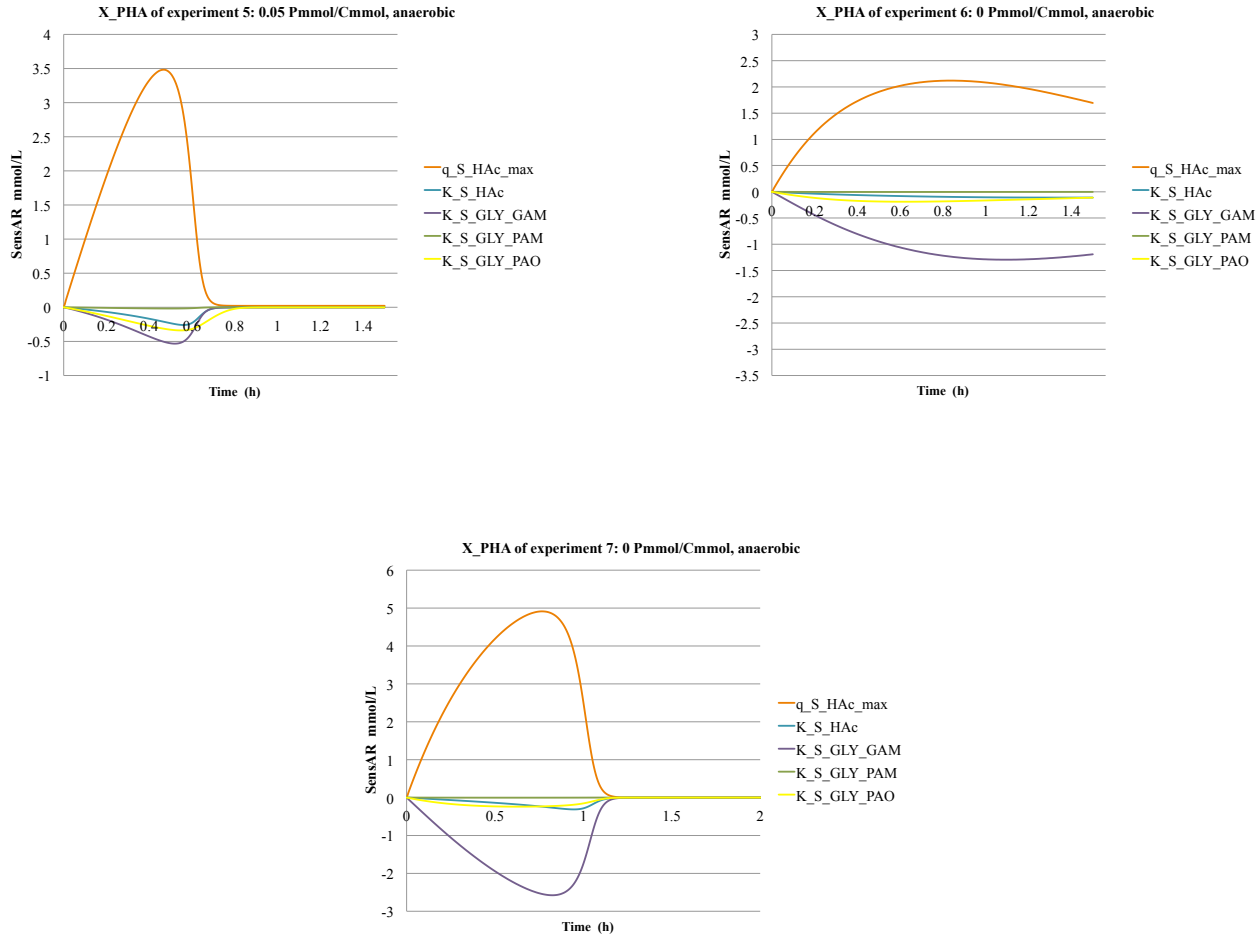


Figure B.4: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

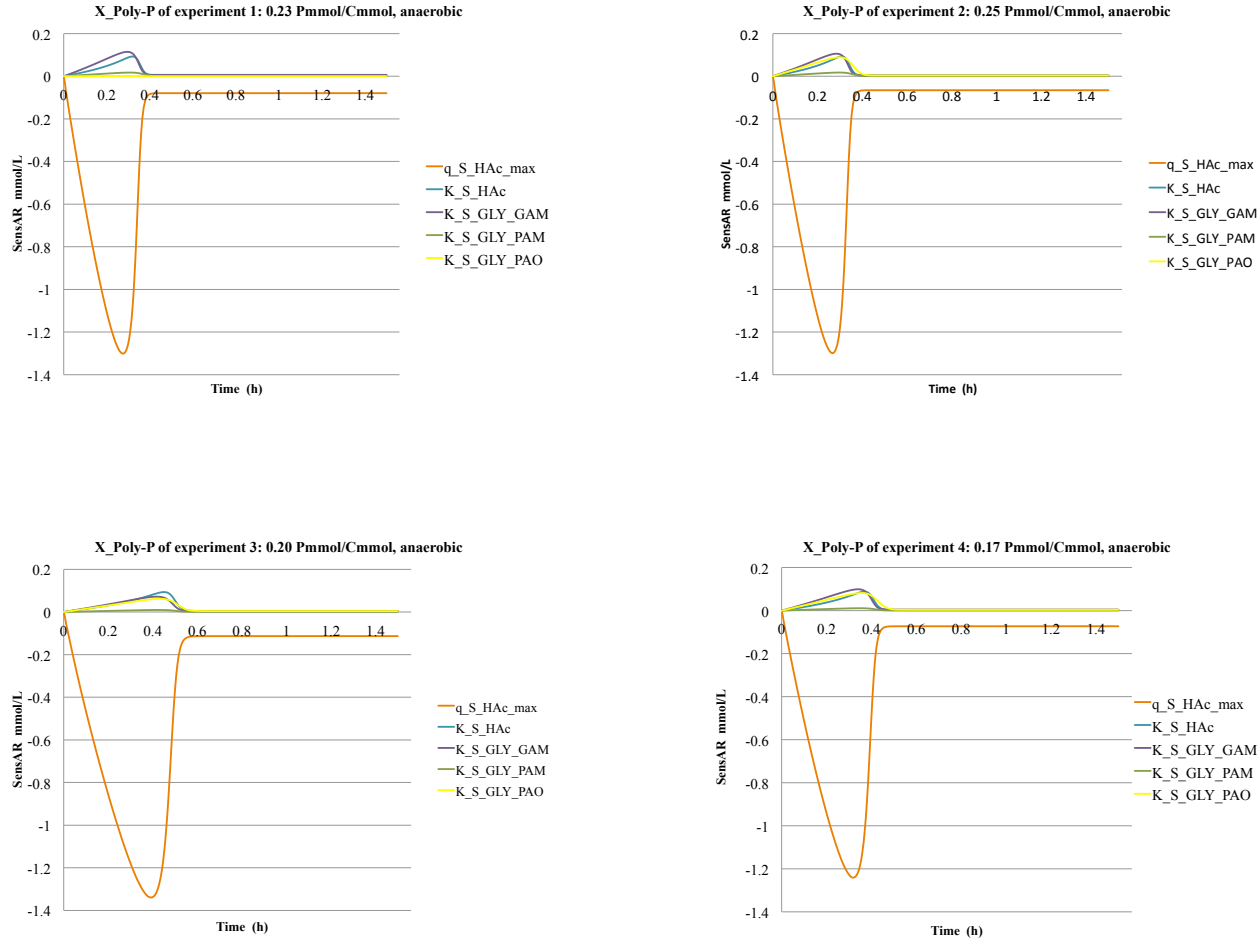


Figure B.5: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

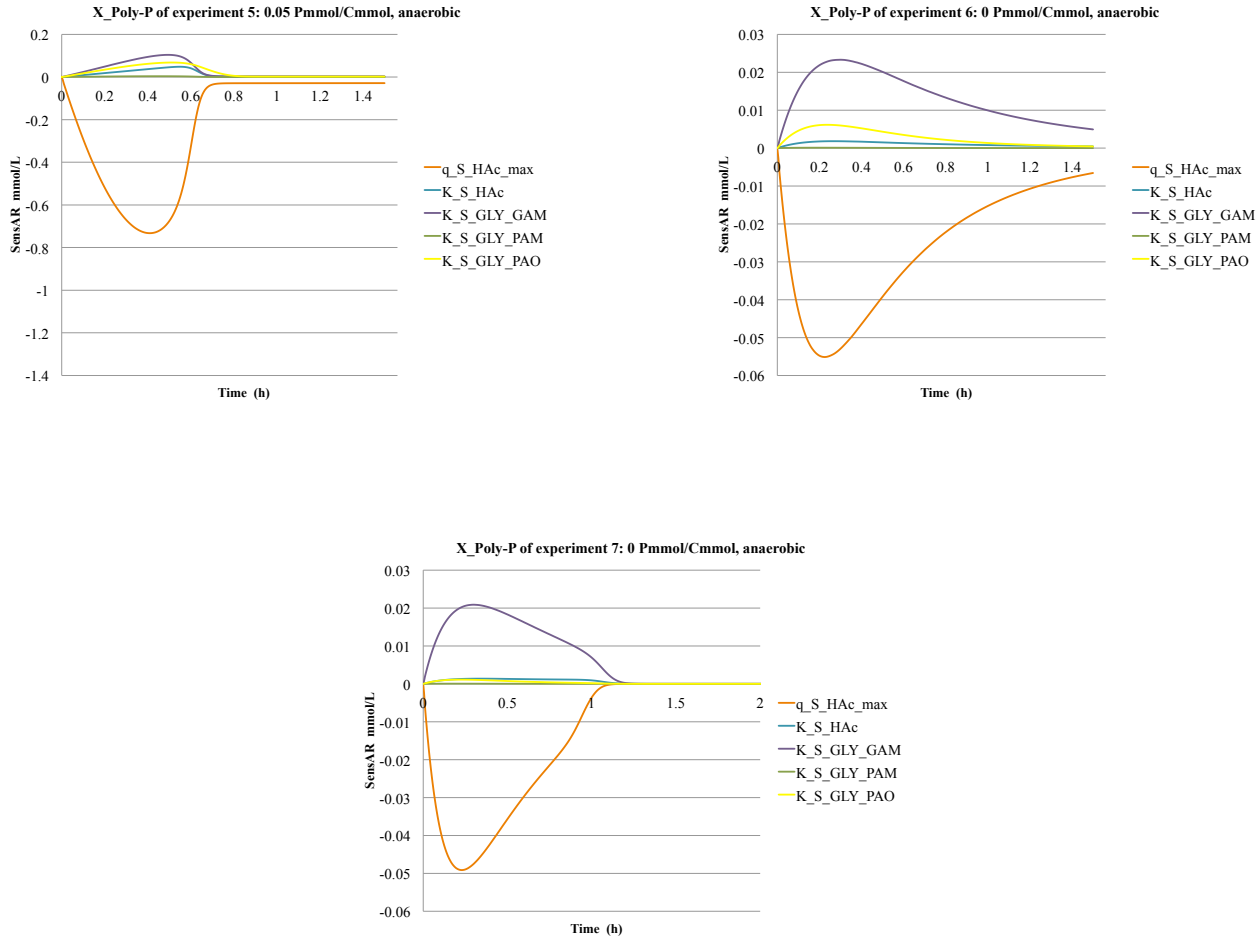


Figure B.5: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

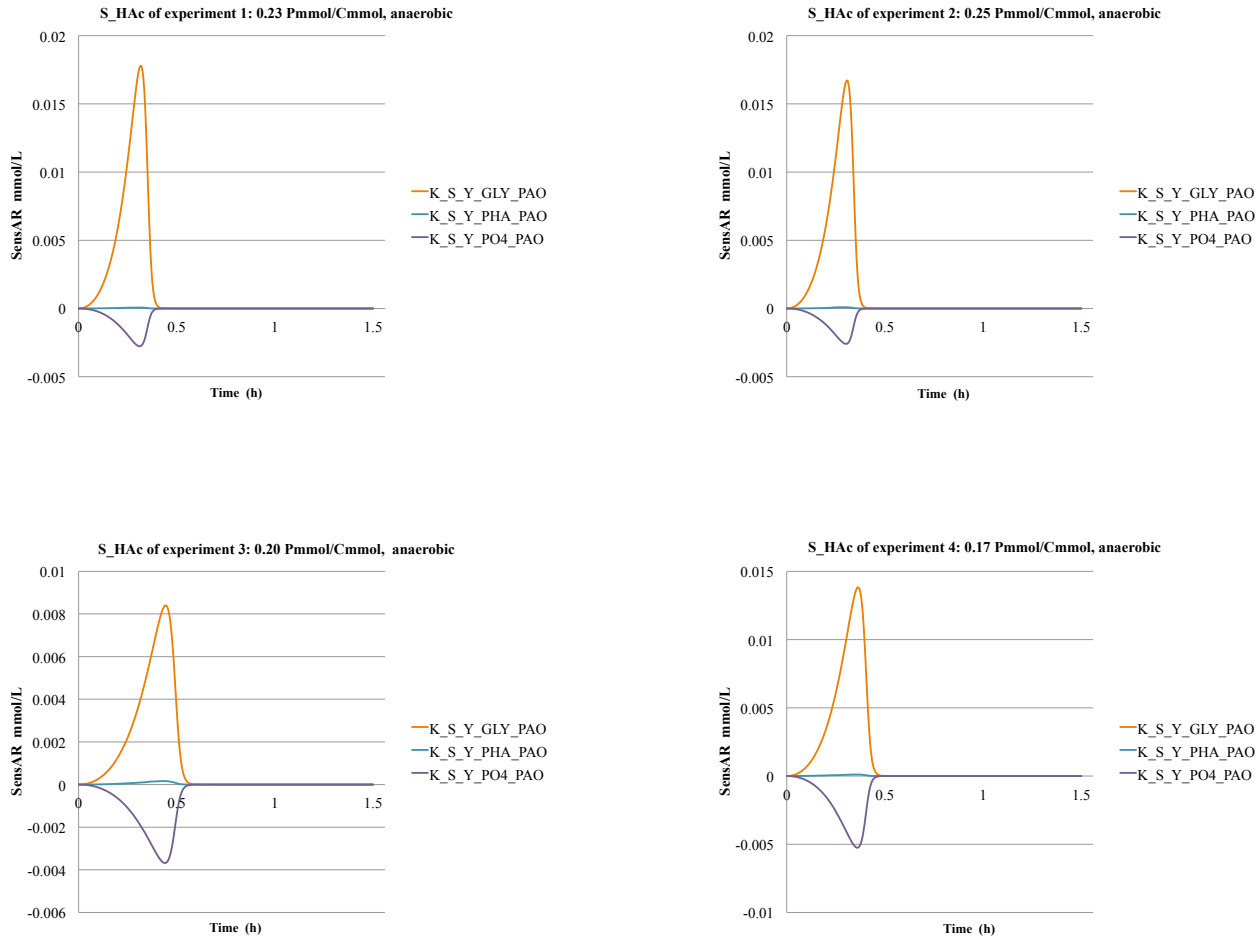


Figure B.6: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

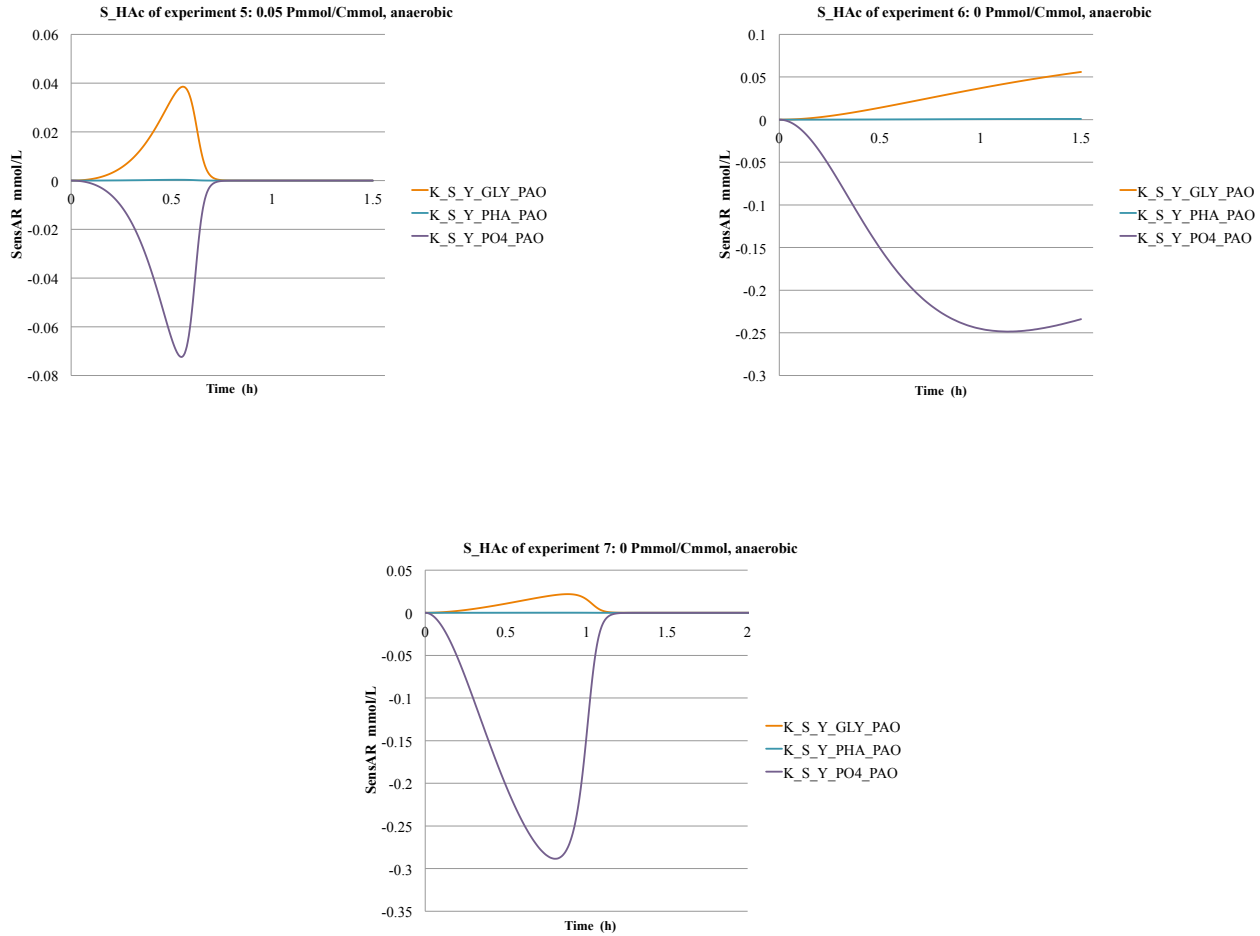


Figure B.6: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

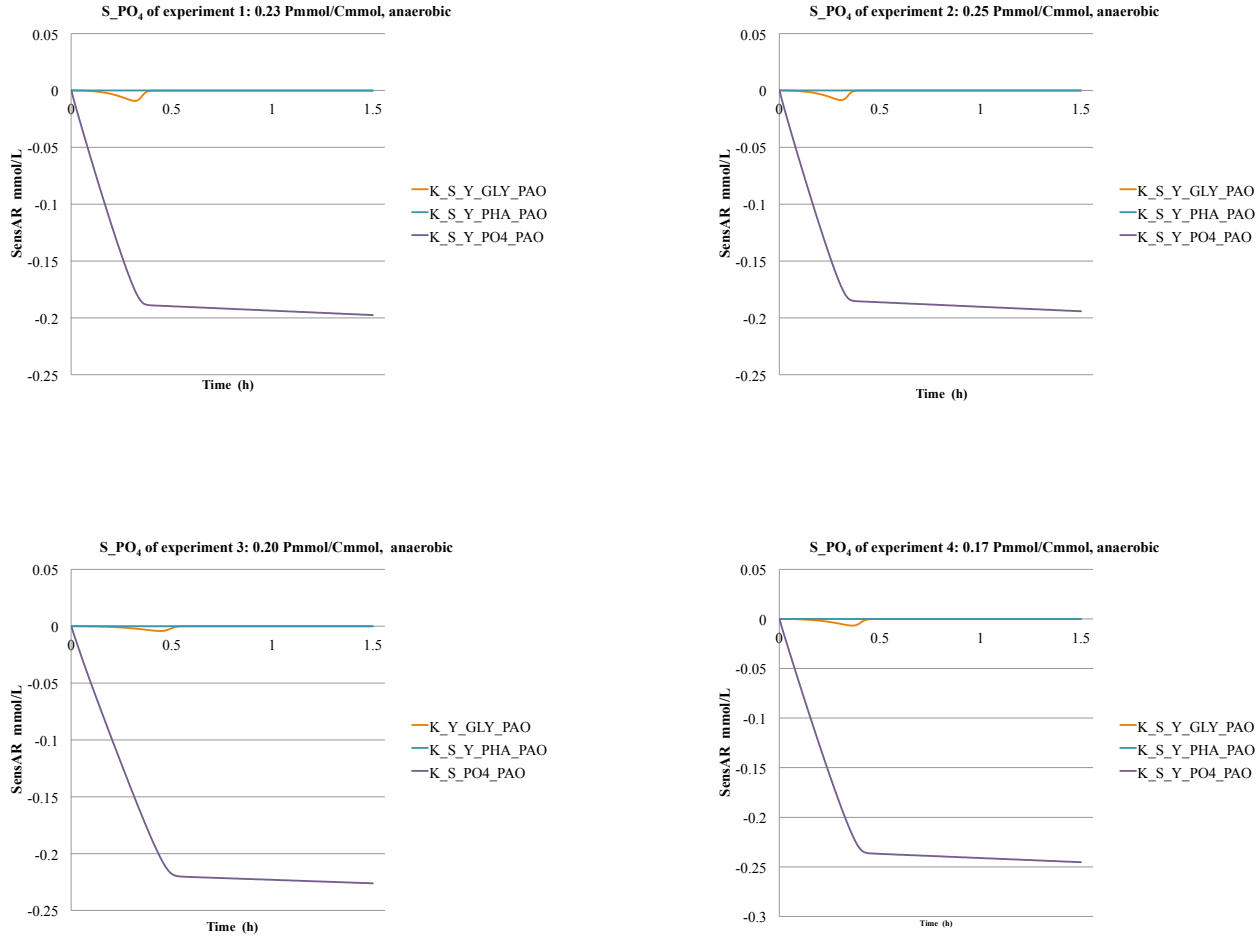


Figure B.7: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

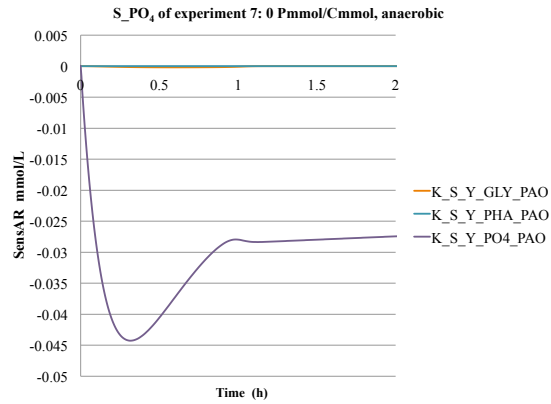
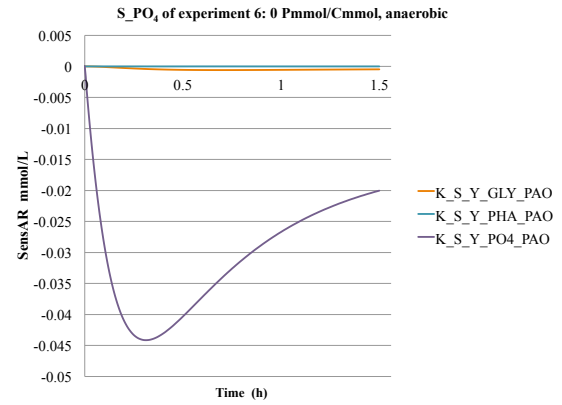
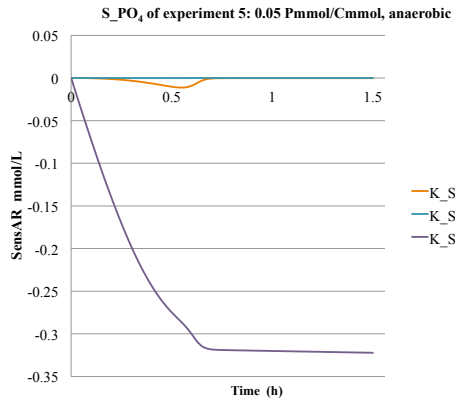


Figure B.7: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

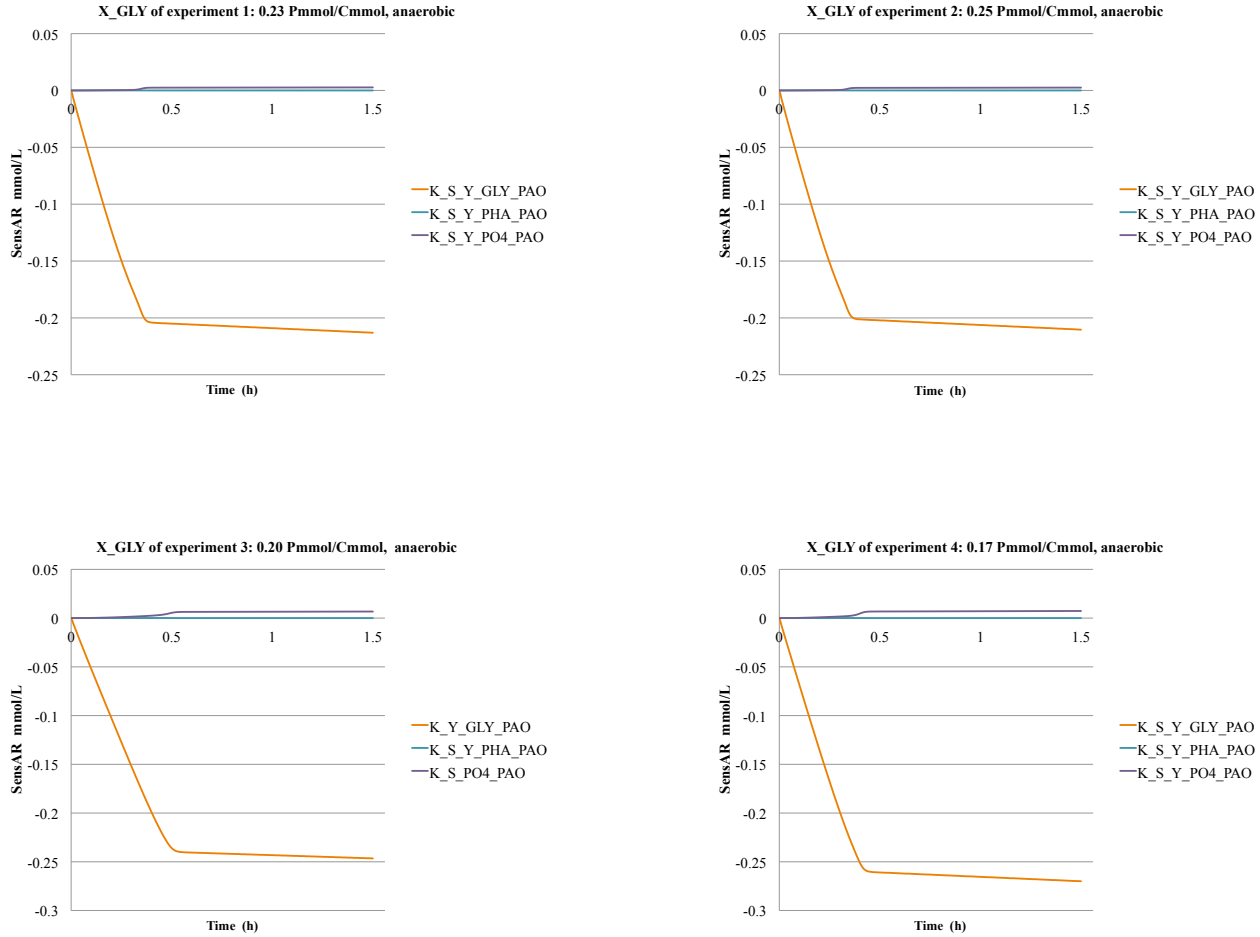


Figure B.8: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

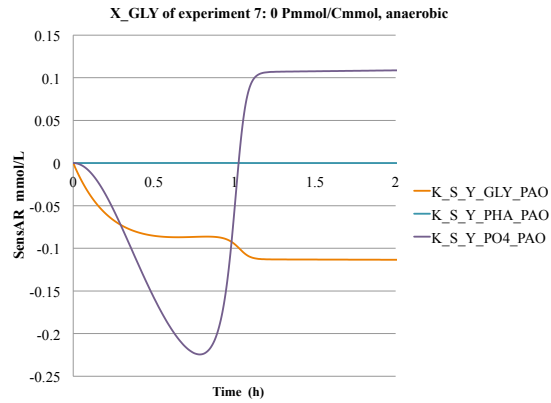
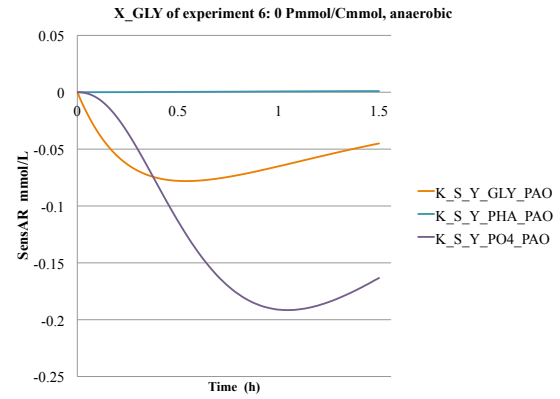
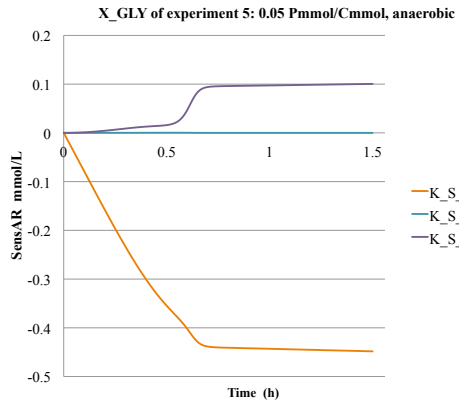


Figure B.8: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

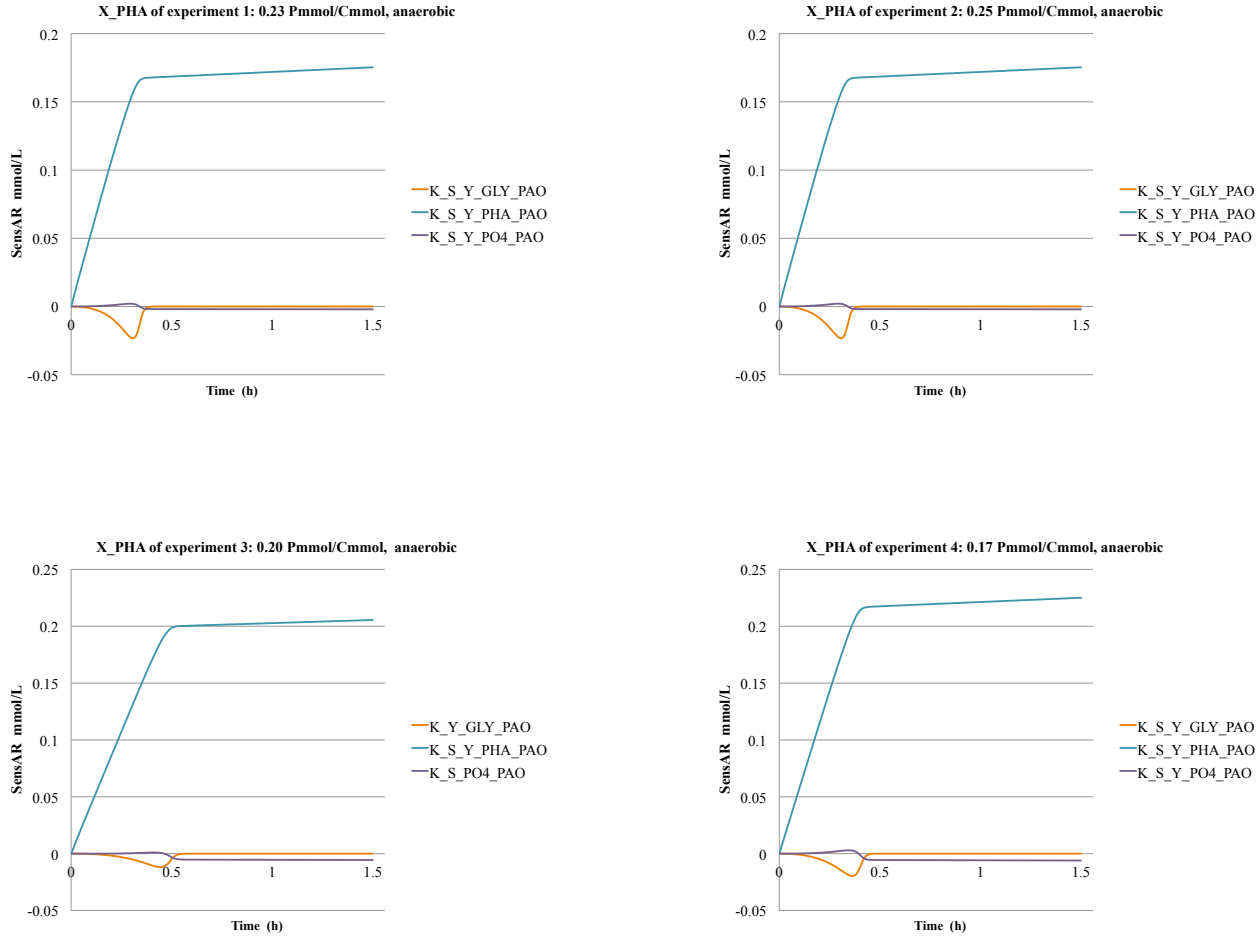


Figure B.9: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

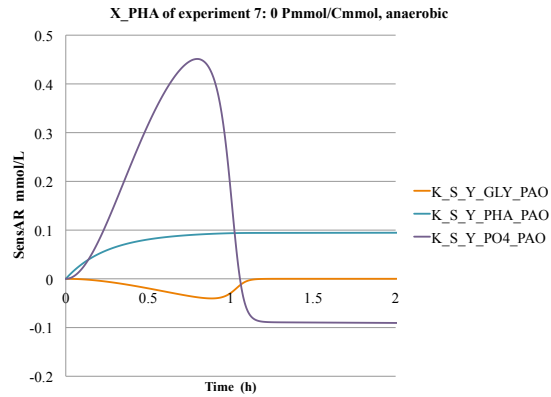
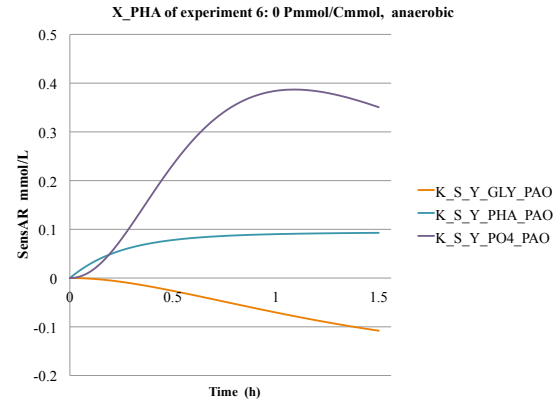
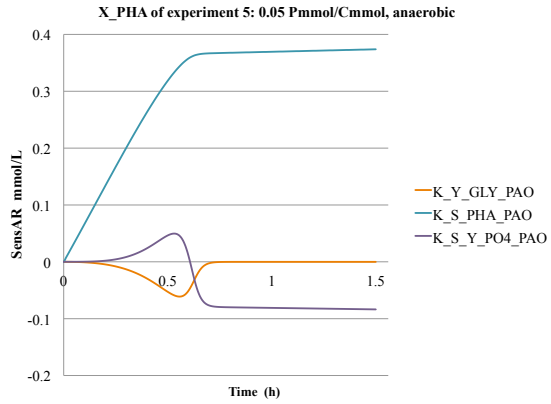


Figure B.9: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

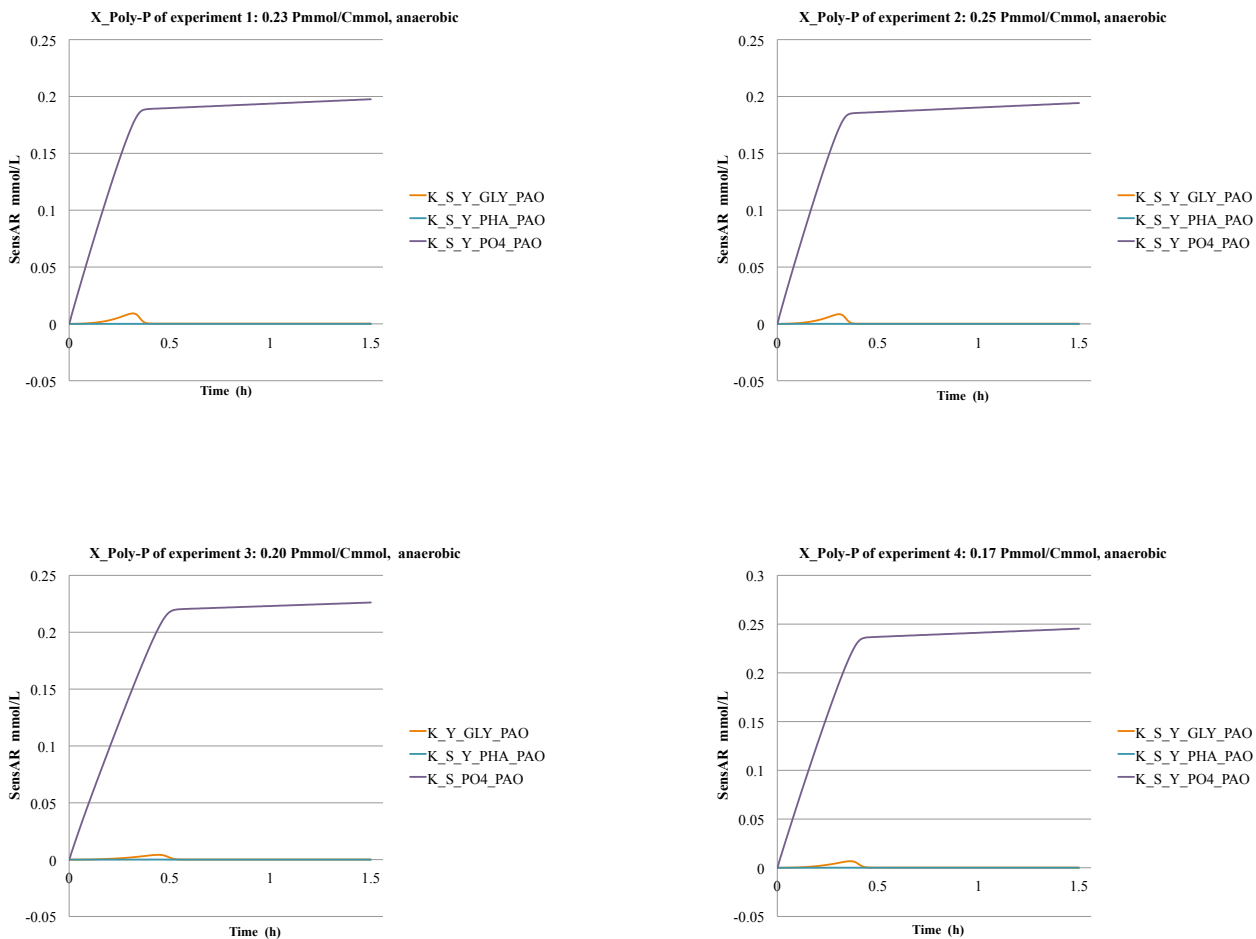


Figure B.10: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

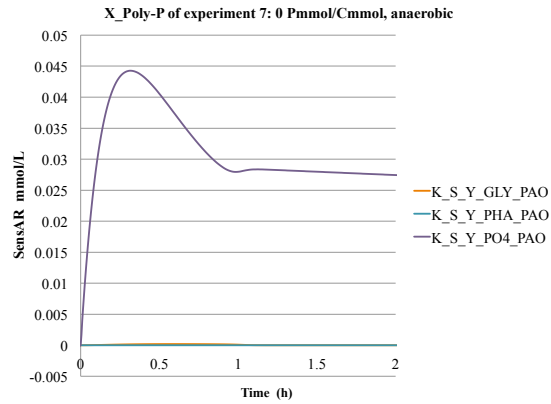
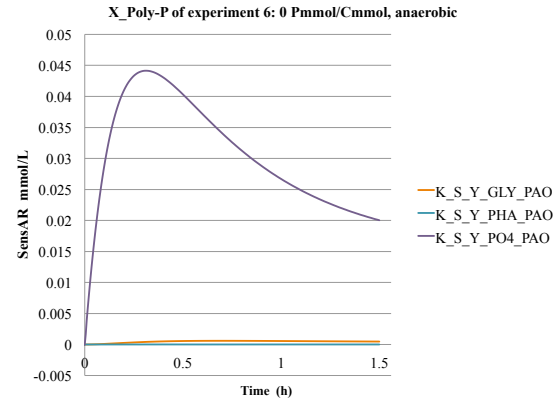
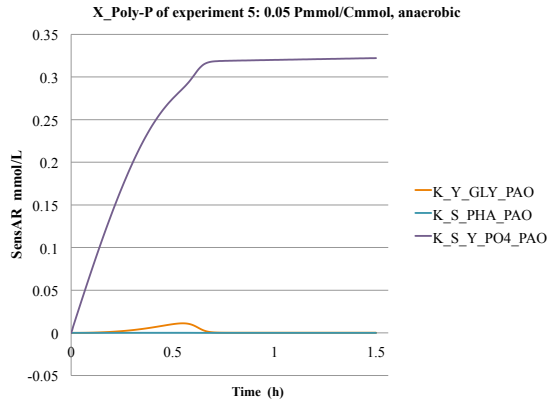


Figure B.10: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

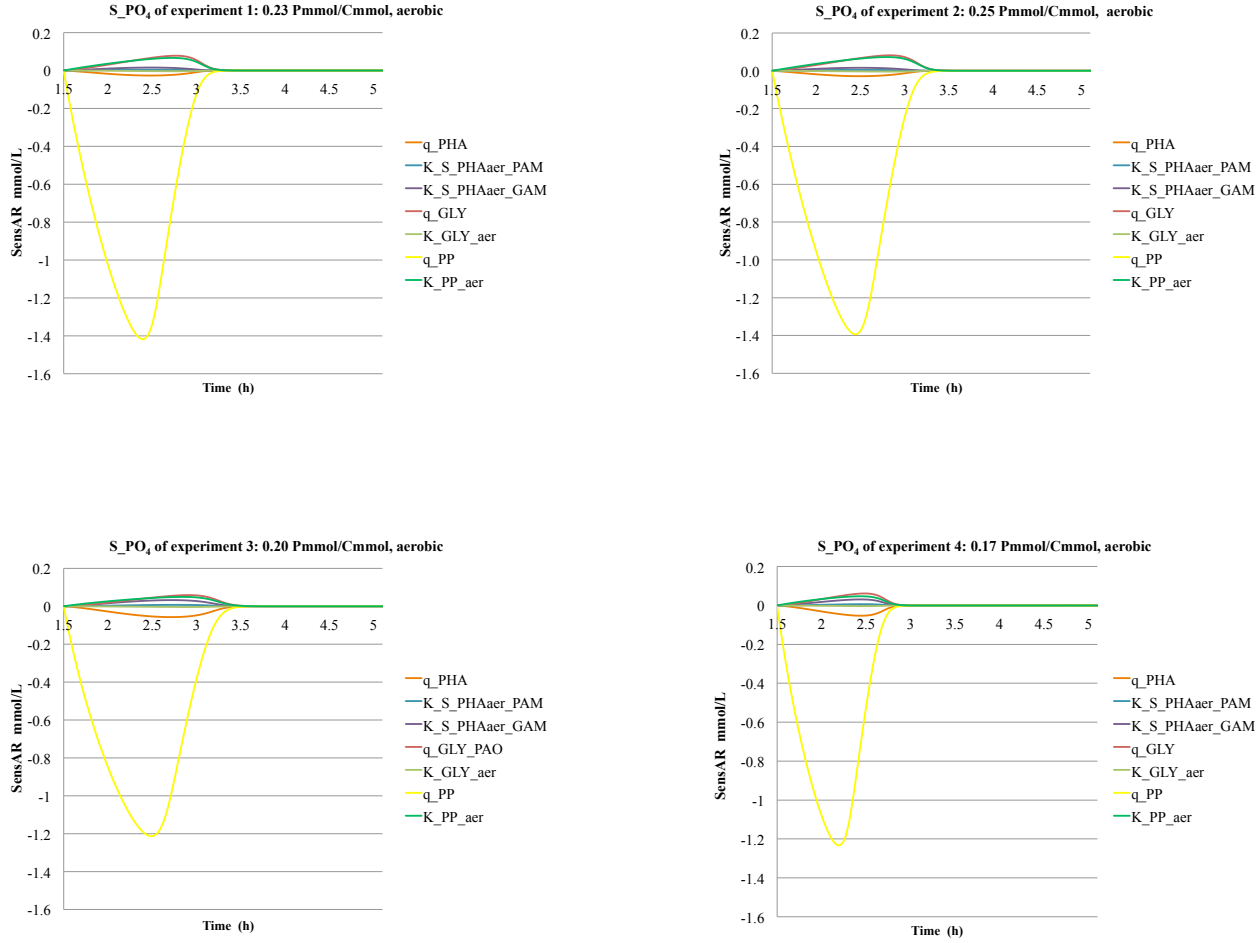


Figure B.11: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

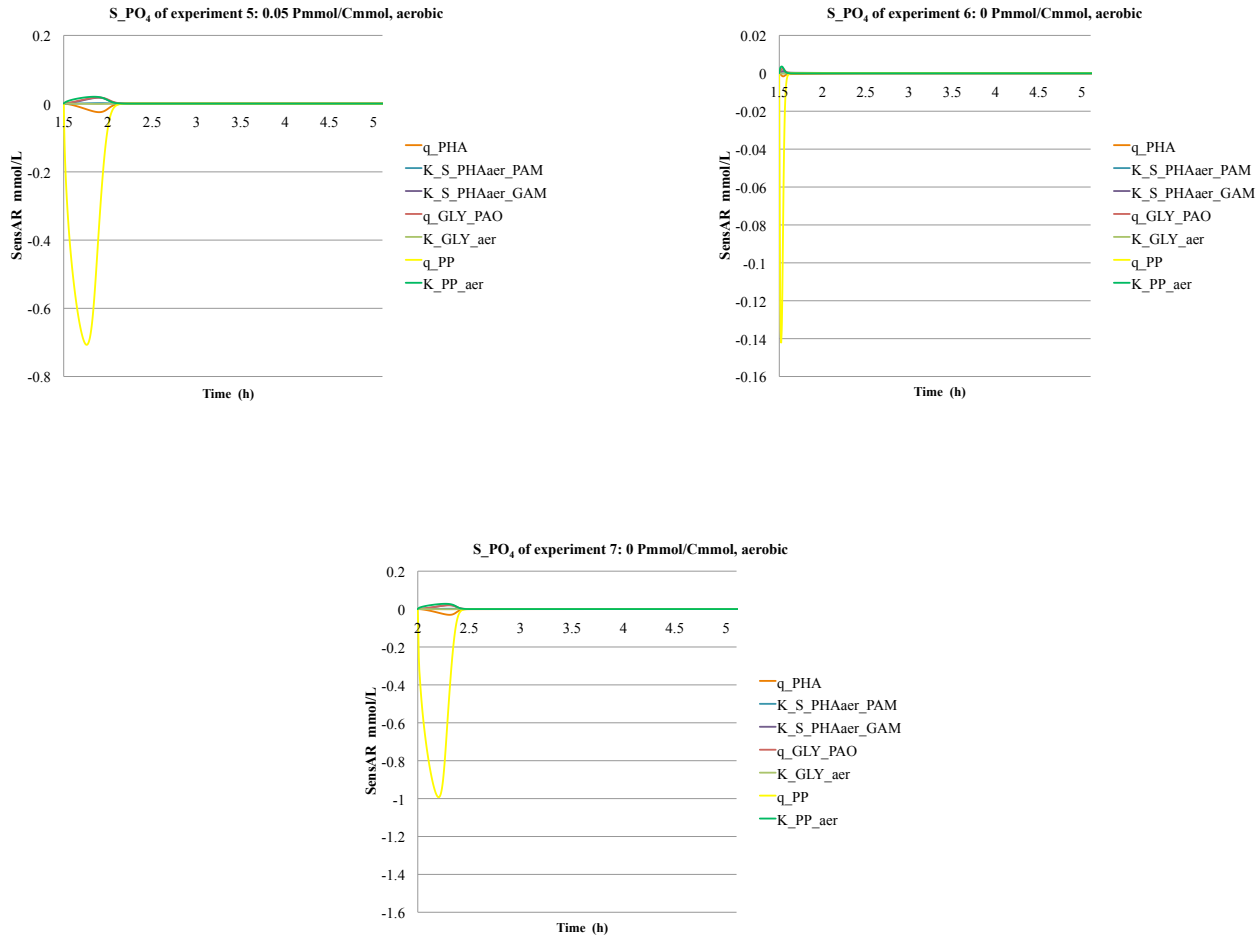


Figure B.11: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

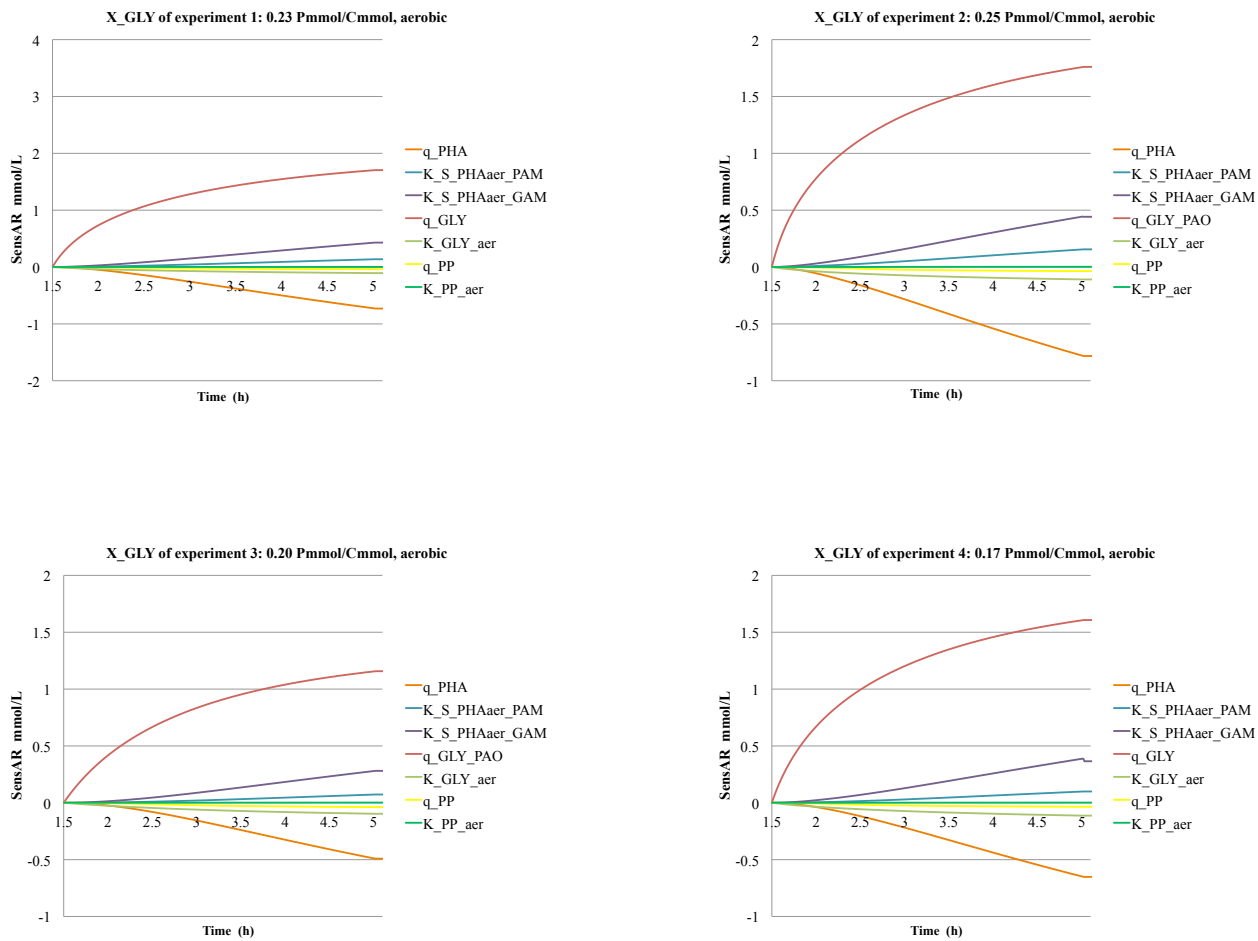


Figure B.12: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

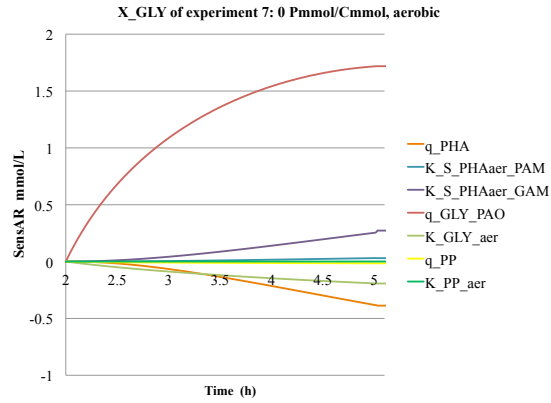
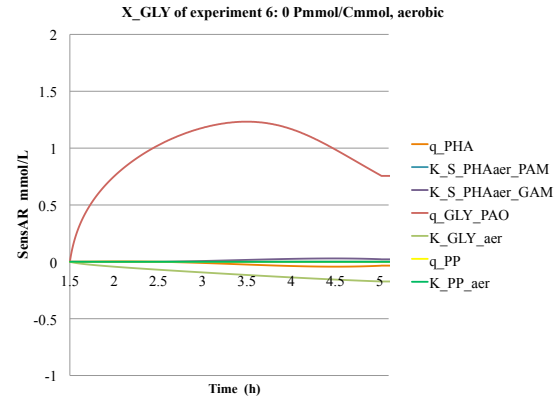
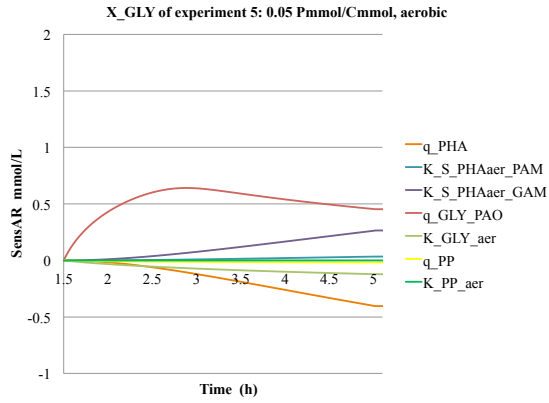


Figure B.12: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

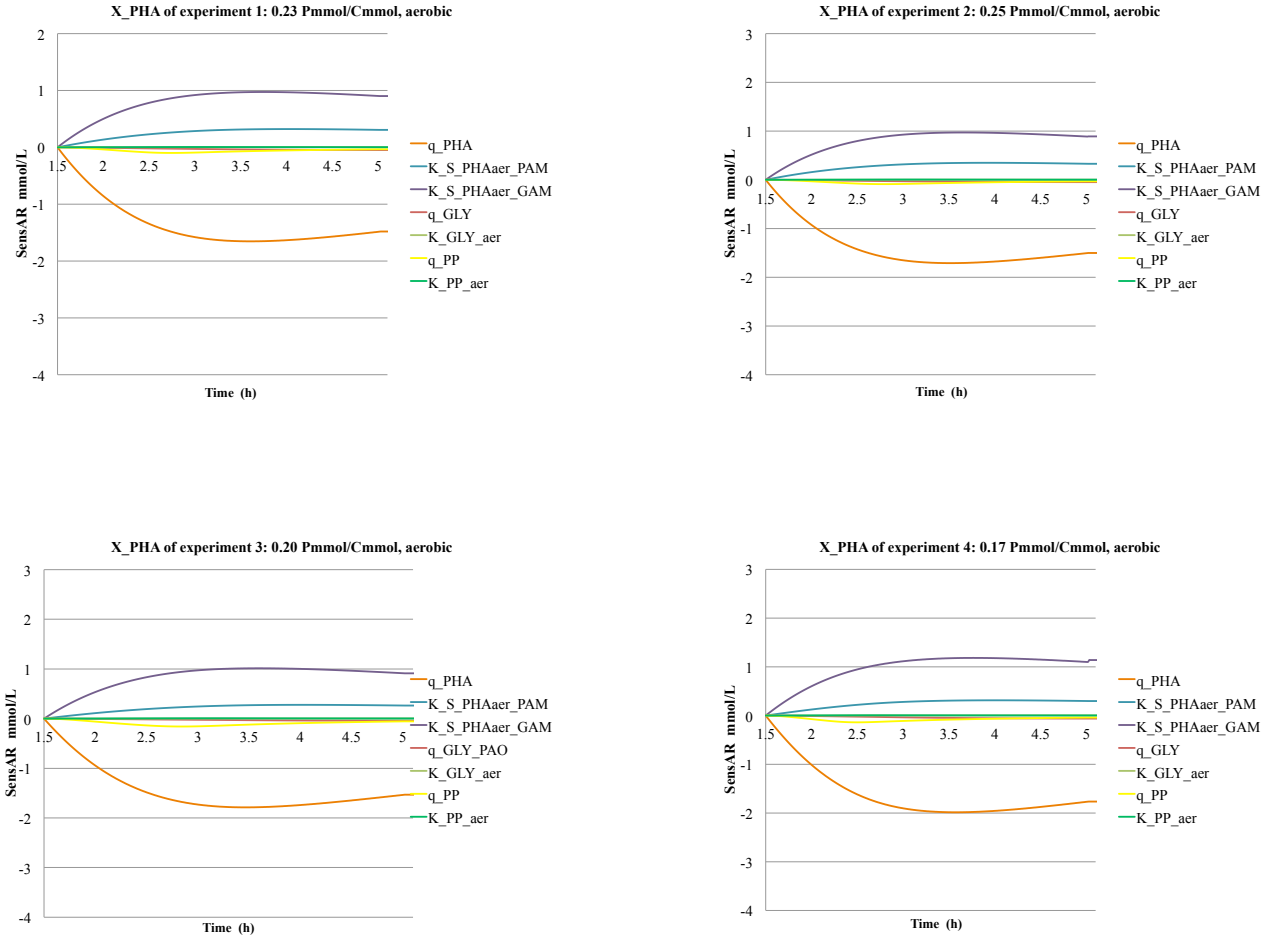


Figure B.13: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

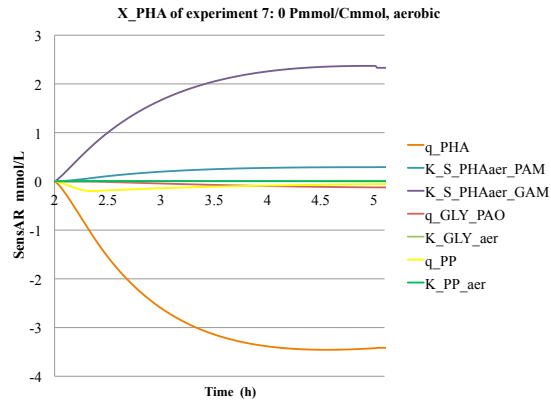
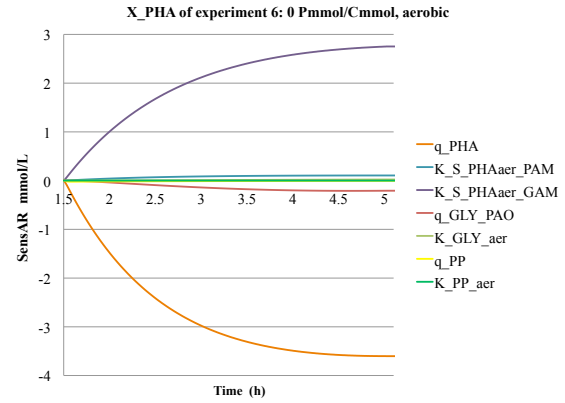
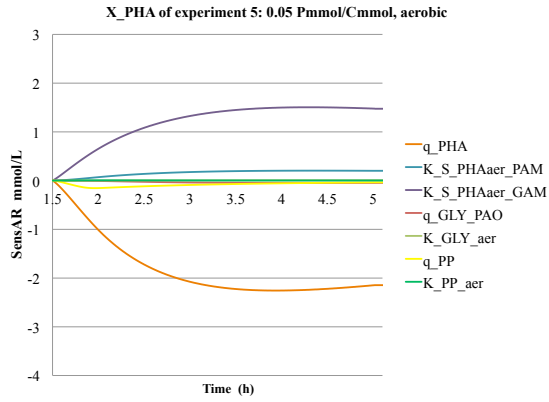


Figure B.13: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

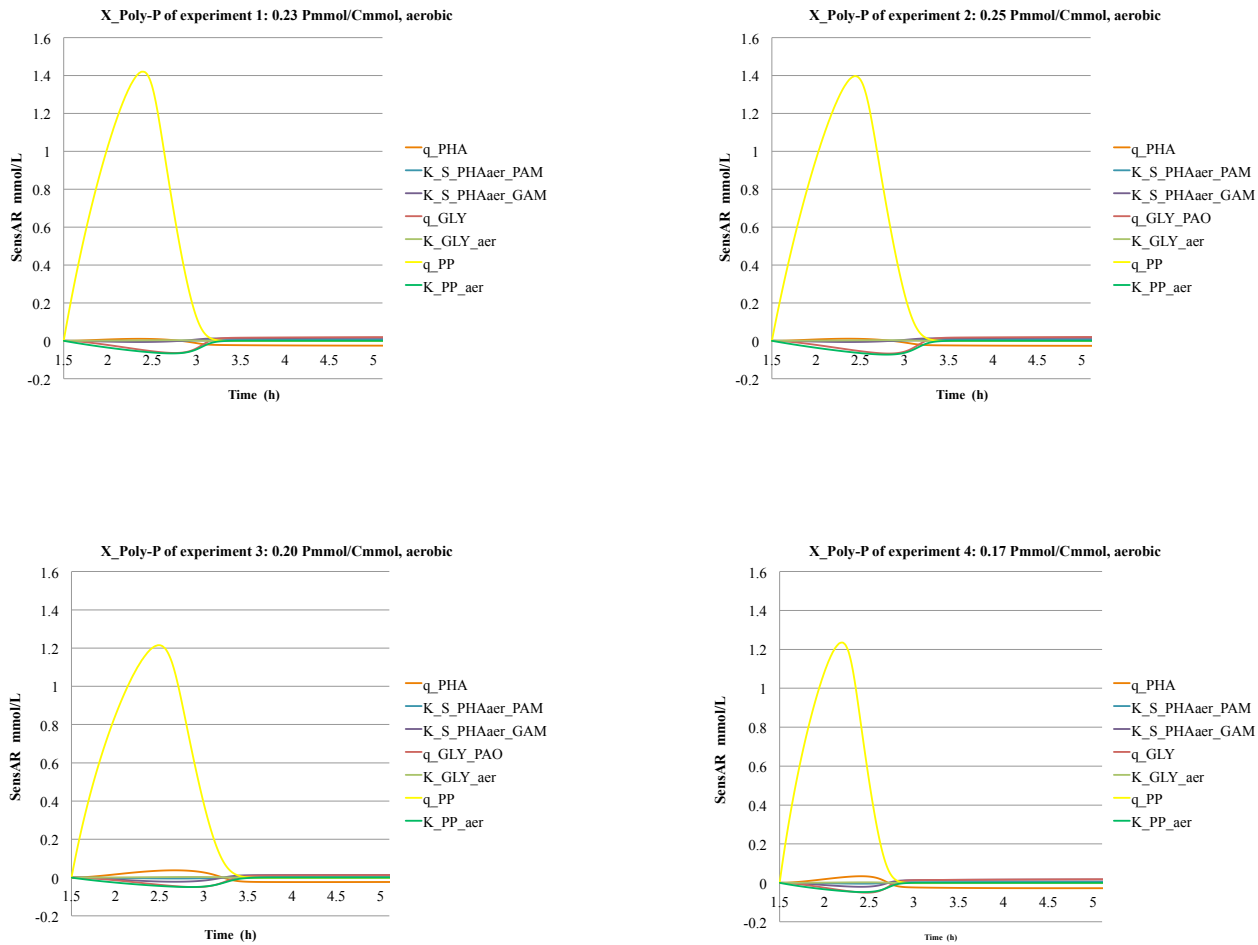


Figure B.14: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

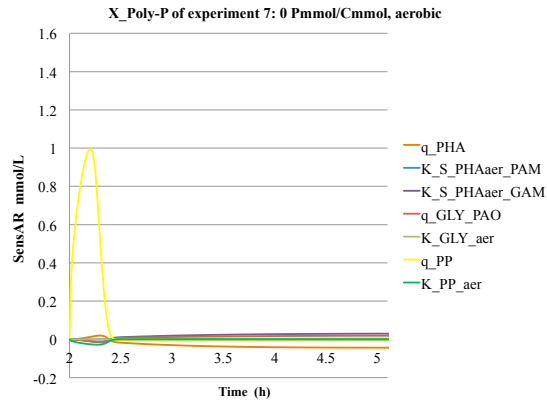
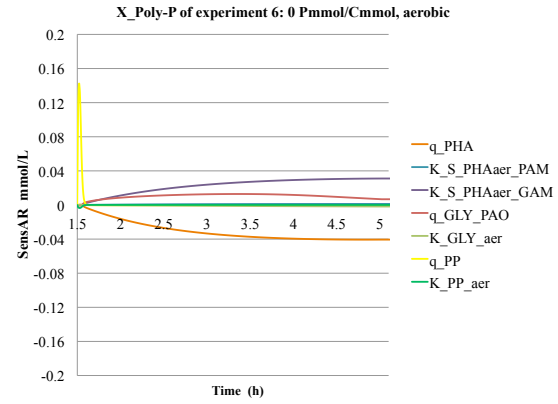
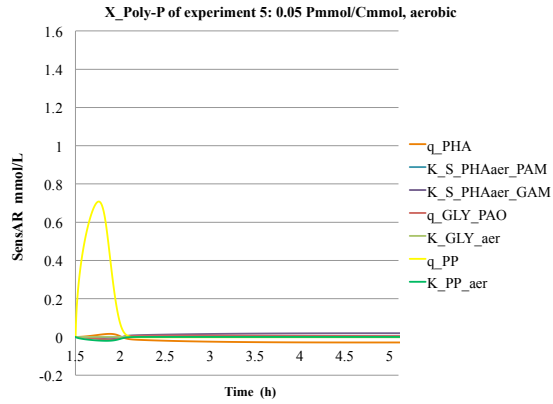


Figure B.14: Anaerobic sensitivity analysis of the calibrated kinetic and coefficient parameters.

Appendix C

Error analysis

The error associated with the description of each variable was calculated using normalized root mean standard deviation (NRMSD) (Oehmen *et al.*, 2010a). The error associated with $\pm 10\%$ and 50% changes to anaerobic stoichiometric parameters: $K_{S,Y_{PHA}^{PAO}}$, $K_{S,Y_{GLY}^{PAO}}$ and $K_{S,Y_{PO_4}^{PAO}}$; anaerobic kinetic parameters: $q_{S,HAc}^{max}$, $K_{S,HAc}$, $K_{S,GLY}^{GAM}$ and $K_{S,GLY}^{PAM}$; and aerobic kinetics: $K_{S,PHA_{aer}}^{PAM}$, $K_{S,PHA_{aer}}^{GAM}$ and p_{GLY}^{PAO} were calculated for each variable: VFA, P- PO_4 , PHA (PHB and PHV) and GLY. Errors were consistent between both the calibration and validation tests, indicating a reliable model. The parameters had low sensitivity to changes of $\pm 10\%$ and 50% . It was observed that the parameters have lower NRMSD values for glycogen after there is a change in metabolism to GAM, perhaps due to the higher glycolysis activity. However, at high poly-P levels a higher NRMSD was observed as compared to other parameters, which is an effect that has previously been recognized in other studies, and is due primarily to measurement difficulties (Oehmen *et al.*, 2010a; Murnleitner *et al.*, 1997; López-Vázquez *et al.*, 2009). In general, the average NRMSD between model predictions and experimental measurements were $\leq 10\%$.

C.1 Error analysis of calibration tests

- Stoichiometric anaerobic parameters, see Table C.1.
- Kinetic anaerobic parameters, see Table C.2
- Kinetic aerobic parameters, see Table C.3

C.2 Error analysis of validation tests

- Stoichiometric anaerobic parameters, see Table C.4.
- Kinetic anaerobic parameters, see Table C.5
- Kinetic aerobic parameters, see Table C.6

Table C.1: Stoichiometric anaerobic parameters.

(a) K.S.YPO₄

	VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	3.19	3.19	3.19	3.2	7.88	7.37	8.82	6.31	3.51	3.51	3.51	3.51	3.5	3.5	3.5	3.49	7.57	7.55	7.62	7.5	14.72	14.73	14.72	14.73
Exp 6	3.06	3.04	3.16	3.09	10.56	9.49	12.5	7.46	9.04	9.21	8.83	9.78	15.1	15.35	14.73	16.03	12.64	12.4	12.97	11.98	3.11	3.06	3.23	3.11
Average	3.13	3.12	3.17	3.14	9.22	8.43	10.66	6.88	6.28	6.36	6.17	6.64	9.3	9.42	9.12	9.76	10.1	9.98	10.3	9.74	8.91	8.89	8.98	8.92

(b) K.S.YGLY

	VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	3.2	3.19	3.22	3.17	7.63	7.63	7.64	7.62	3.5	3.51	3.49	3.53	3.49	3.5	3.48	3.52	7.56	7.57	7.55	7.58	14.89	14.56	15.47	13.84
Exp 6	3.06	3.03	3.09	2.96	10.04	10.03	10.06	9.96	9.14	9.11	9.17	9.04	15.23	15.2	15.3	15.04	12.43	12.63	12.22	13.28	3.07	3.1	3.05	3.3
Average	3.13	3.11	3.16	3.06	8.83	8.83	8.85	8.79	6.32	6.31	6.33	6.28	9.36	9.35	9.39	9.28	10	10.1	9.89	10.43	8.98	8.83	9.26	8.57

(c) K.S.YPHA

	VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	2.47	3.19	2.9	3.19	8.26	7.63	7.66	7.63	5.51	3.45	4.26	3.27	5.69	3.49	3.77	3.48	6.14	8.69	18.1	16.38	15.99	14.73	14.52	14.73
Exp 6	3.05	3.04	3.05	3.05	10.03	10.03	10.03	10.03	9.09	9.16	8.96	8.96	15.22	15.23	15.2	15.2	12.74	12.26	13.39	13.39	3.08	3.08	3.08	3.08
Average	2.76	3.12	2.97	3.12	9.15	8.83	8.85	8.83	7.3	6.31	6.61	6.12	10.46	9.36	9.49	9.34	9.44	10.48	15.74	14.88	9.54	8.91	8.8	8.91

Table C.2: Kinetic anaerobic parameters.

(a) $q_s, HA_{c,max}$																								
VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY				
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	2.58	4.24	3.97	10.55	7.18	8.2	6.54	13.09	4.33	3.1	6.91	6.94	4.36	3.04	7.02	7.18	8	7.27	9.41	7.76	15.38	14.16	17.21	10.5
Exp 6	3.49	2.93	5.95	9.54	0.18	0.21	0.13	14.14	6.32	7.51	4.75	15.03	8.24	8.95	6.87	20.12	0.71	0.61	0.86	9.73	2.67	2.69	4.09	10.84
Average	3.04	3.58	4.96	10.05	3.68	4.21	3.34	13.61	5.33	5.3	5.83	10.98	6.3	6	6.95	13.65	4.36	3.94	5.13	8.74	9.02	8.43	10.65	10.67

(b) K_s, HA_c																								
VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY				
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	3.24	4.24	3.44	2.94	7.66	8.2	7.76	7.5	3.47	3.1	3.33	3.74	3.45	3.04	3.31	3.74	7.55	7.27	7.47	7.69	14.7	14.16	14.56	14.92
Exp 6	5.51	5.56	5.39	5.68	8.48	8.45	8.52	8.4	6.42	6.4	6.46	6.35	12.23	12.18	12.36	12.04	17.11	17.28	16.8	17.61	4.88	4.95	4.74	5.09
Average	4.37	4.9	4.42	4.31	8.07	8.33	8.14	7.95	4.94	4.75	4.9	5.04	7.84	7.61	7.83	7.89	12.33	12.28	12.14	12.65	9.79	9.55	9.65	10.01

(c) $K_s, GLYGAM$																								
VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY				
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	3.27	3.12	3.57	2.83	7.67	7.59	7.83	7.43	3.45	3.57	3.26	3.86	3.44	3.56	3.23	3.86	7.53	7.59	7.42	7.76	14.68	14.78	14.48	15.01
Exp 6	5.16	5.95	4.02	8.16	8.62	8.31	9.23	7.75	6.6	6.22	7.61	6.15	12.58	11.8	13.93	9.94	16.4	18.03	13.68	21.98	4.51	5.35	3.28	7.58
Average	4.21	4.53	3.8	5.49	8.14	7.95	8.53	7.59	5.02	4.89	5.44	5	8.01	7.68	8.58	6.9	11.97	12.81	10.55	14.87	9.59	10.06	8.88	11.3

(d) $K_s, GLYPAM$																								
VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY				
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	2.85	2.82	2.89	2.78	7.44	7.43	7.47	7.4	3.84	3.87	3.79	3.92	3.85	3.88	3.79	3.93	7.75	7.77	7.72	7.79	15	15.02	14.96	15.06
Exp 6	5.54	5.54	5.53	5.54	8.46	8.46	8.47	8.46	6.4	6.4	6.4	6.39	12.21	12.21	12.21	12.2	17.18	17.18	17.18	17.21	4.91	4.91	4.91	4.92
Average	4.19	4.18	4.21	4.16	7.95	7.94	7.97	7.93	5.12	5.13	5.09	5.16	8.03	8.04	8	8.07	12.46	12.47	12.45	12.5	9.96	9.97	9.93	9.99

Table C.3: Kinetic aerobic parameters.(a) K_S, PHA_{aer}

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	8.02	6.01	11.79	2.07	22.85	21.64	24.7	18.2
Exp 6	6.89	7.47	7.05	10.4	2.86	2.83	2.84	2.6
Average	7.46	6.74	9.42	6.23	12.85	12.24	13.77	10.4

(b) $K_S, PHA_{aer}GAM$

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	7.38	6.68	8.75	5.28	22.48	22.07	23.21	21.18
Exp 6	7.1	7.14	7.05	7.19	2.85	2.84	2.85	2.84
Average	7.24	6.91	7.9	6.23	12.67	12.46	13.03	12.01

(c) $K_S, PHA_{aer}PAM$

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	8.07	5.97	10.12	5.97	22.88	21.61	23.95	21.61
Exp 6	6.84	7.61	6.93	9.14	2.86	2.83	2.84	2.72
Average	7.45	6.79	8.52	7.55	12.87	12.22	13.39	12.16

(d) $q_{GLY,PAO}$

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 1	2.43	2.44	2.42	2.46	20.31	13.11	33.23	3.61
Exp 6	13.62	13.62	13.56	13.74	3.42	3.42	9.37	10.33
Average	8.03	8.03	7.99	8.1	11.87	8.27	21.3	6.97

Table C.4: Stoichiometric anaerobic parameters.

(a) K₂S₂O₈

	VFA				PO ₄				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	5.5	5.5	5.5	5.5	14.02	13.72	14.61	13.11	7.54	7.54	7.54	7.54	7.5	7.5	7.5	7.5	10.12	10.11	10.17	10.07	12.07	12.07	12.07	12.07
Exp 3	1.58	1.58	1.58	1.58	3.68	3.41	4.38	3.15	6.29	6.29	6.28	6.3	8.48	8.48	8.48	8.48	10.22	10.15	10.34	9.99	11.91	11.92	11.89	11.94
Exp 4	5.62	5.62	5.61	5.63	10.47	9.89	11.55	8.68	7	7	7	7.01	6.77	6.77	6.77	6.78	12	11.96	12.09	11.85	9.18	9.18	9.19	9.18
Exp 5	4.04	4.08	3.99	4.18	9.35	8.39	10.98	6.17	9.19	9.21	9.17	9.25	11.8	11.84	11.74	11.95	19.65	20.53	18.35	23.16	13.75	13.64	13.9	13.37
Exp 7	3.5	3.23	3.89	2.47	13.7	13.68	13.74	13.67	7	6.78	7.3	6.15	8.1	7.82	8.49	7.07	6.95	6.83	7.1	6.5	3.55	3.43	3.71	3.09
Average	4.05	4	4.12	3.87	10.24	9.82	11.05	8.96	7.4	7.36	7.46	7.25	8.53	8.48	8.6	8.36	11.79	11.91	11.61	12.31	10.09	10.05	10.15	9.93

(b) K₂S₂O₈YGLY

	VFA				PO ₄				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	5.5	5.5	5.5	5.5	13.87	13.86	13.88	13.86	7.54	7.54	7.54	7.54	7.5	7.5	7.5	7.5	10.13	10.12	10.14	10.1	12.1	12.06	12.26	12.09
Exp 3	1.58	1.58	1.59	1.57	3.54	3.54	3.54	3.54	6.29	6.29	6.28	6.3	8.48	8.48	8.47	8.49	10.18	10.18	10.19	10.17	12.11	11.71	12.83	10.79
Exp 4	5.62	5.62	5.63	5.6	10.19	10.19	10.2	10.18	7	7	7.01	6.99	6.78	6.77	6.78	6.77	11.98	11.98	11.99	11.97	9.1	9.29	8.94	10.04
Exp 5	4.07	4.05	4.09	4.02	8.89	8.88	8.93	8.83	9.21	9.19	9.24	9.14	11.83	11.81	11.86	11.76	20.05	20.08	20	20.16	13.45	13.99	12.81	15.98
Exp 7	3.37	3.39	3.34	3.47	13.69	13.69	13.69	13.69	6.89	6.91	6.87	6.99	7.96	7.98	7.93	8.07	6.88	6.9	6.85	6.98	3.56	3.42	3.72	2.89
Average	4.03	4.03	4.03	4.03	10.04	10.03	10.05	10.02	7.39	7.39	7.39	7.39	8.51	8.51	8.51	8.52	11.84	11.85	11.83	11.88	10.06	10.1	10.11	10.36

(c) K₂S₂O₈YPHA

	VFA				PO ₄				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	5.5	5.5	5.5	5.5	13.87	13.87	13.87	13.87	7.55	7.53	7.62	7.51	7.5	7.5	7.5	7.49	9.01	11.68	10.61	20.48	12.07	12.07	12.07	12.07
Exp 3	1.58	1.58	1.58	1.58	3.54	3.54	3.54	3.54	6.4	6.17	6.83	5.69	8.49	8.47	8.51	8.44	8.72	11.71	4.3	18.47	11.92	11.92	11.92	11.92
Exp 4	5.62	5.62	5.62	5.62	10.19	10.19	10.19	10.19	6.99	7.01	6.98	7.1	6.77	6.77	6.77	6.77	10.92	13.28	9.74	20.21	9.18	9.18	9.18	9.18
Exp 5	4.02	4.02	4.02	4.02	8.83	8.83	8.83	8.83	9.04	9.24	8.73	9.8	11.75	11.77	11.73	11.8	22.27	18.1	30.26	13.96	15.98	13.97	14.3	13.59
Exp 7	3.37	3.37	3.37	3.38	13.69	13.69	13.69	13.69	6.93	6.86	7.03	6.52	7.97	7.97	7.98	7.95	7	6.76	7.31	5.9	3.5	3.5	3.5	3.5
Average	4.02	4.02	4.02	4.02	10.02	10.02	10.02	10.02	7.38	7.36	7.44	7.32	8.5	8.5	8.5	8.49	11.59	12.31	12.44	15.8	10.53	10.13	10.19	10.05

Table C.5: Kinetic anaerobic parameters.

(a) q_s, HAC_{max}

	VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	5.42	5.95	5.43	11.18	13.31	14.52	12.02	18.89	7.33	8.03	6.97	12.22	7.31	7.96	7	12.11	9.23	11.14	7.51	16.3	12.07	12.27	11.91	14.76
Exp 3	1.32	2.48	4.81	9.43	3.67	3.63	6	8.74	6.87	5.19	10.12	5.48	9.19	7.21	12.7	4.51	9.72	10.84	8.39	15.25	12.03	11.41	13.34	10.2
Exp 4	4.51	6.79	2.18	13.72	9.45	10.98	7.15	16.84	6.35	7.79	5.53	14.01	6.14	7.55	5.51	13.75	11.3	12.7	9.18	18.37	8.66	9.82	8.07	13.73
Exp 5	3.28	5.27	3.25	12.24	8.26	9.69	7.83	14.29	8.35	10.25	7.2	15.93	11	12.78	9.54	17.7	21.12	19.34	23.69	21.61	13.42	14.15	12.39	17.96
Exp 7	4.43	2.06	7.41	5.57	13.69	13.69	13.7	13.67	7.96	5.56	10.79	3.5	9.01	6.64	11.81	3.48	8	5.59	10.97	3.71	4.43	2.42	7.37	6.25
Average	3.79	4.51	4.62	10.43	9.68	10.5	9.34	14.49	7.37	7.36	8.12	10.23	8.53	8.43	9.31	10.31	11.87	11.92	11.95	15.05	10.12	10.01	10.61	12.58

(b) K_s, HAC

	VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	5.51	5.49	5.55	5.48	13.89	13.84	14.01	13.71	7.56	7.53	7.62	7.49	7.51	7.49	7.56	7.45	10.17	10.07	10.37	9.85	12.07	12.07	12.07	12.09
Exp 3	1.61	1.55	1.7	1.42	3.53	3.54	3.5	3.55	6.23	6.34	5.95	6.45	8.42	8.53	8.12	8.67	10.21	10.15	10.33	10.07	11.88	11.94	11.72	11.97
Exp 4	5.67	5.57	5.87	5.35	10.22	10.15	10.35	10.01	7.03	6.97	7.15	6.84	6.8	6.74	6.92	6.62	12	11.95	12.13	11.82	9.2	9.15	9.3	9.06
Exp 5	4.11	4.01	4.31	3.82	8.93	8.84	9.1	8.64	9.25	9.14	9.45	8.92	11.86	11.77	12.06	11.55	20	20.14	19.78	20.45	13.71	13.69	13.74	13.67
Exp 7	3.31	3.44	3.07	3.69	13.69	13.69	13.69	13.69	6.83	6.97	6.58	7.23	7.9	8.04	7.65	8.31	6.83	6.95	6.61	7.19	3.44	3.56	3.22	3.79
Average	4.04	4.01	4.1	3.95	10.05	10.01	10.13	9.92	7.38	7.39	7.35	7.39	8.5	8.51	8.46	8.52	11.84	11.85	11.84	11.88	10.06	10.08	10.01	10.11

(c) $K_s, GLYGAM$

	VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	5.51	5.48	14.95	5.46	13.91	13.82	20.27	13.65	7.57	7.52	16.41	7.46	7.52	7.48	16.32	7.42	10.19	10.05	19.54	9.75	12.08	12.07	18.37	12.08
Exp 3	1.61	1.55	1.75	1.42	3.53	3.54	3.53	3.54	6.25	6.32	6.09	6.44	8.42	8.52	8.26	8.66	10.2	10.15	10.3	10.07	11.9	11.93	11.84	11.96
Exp 4	5.7	5.54	6.01	5.2	10.24	10.13	10.44	9.92	7.05	6.95	7.24	6.76	6.82	6.73	7.01	6.53	12.02	11.93	12.2	11.73	9.22	9.14	9.37	8.99
Exp 5	4.18	3.94	4.7	3.54	8.99	8.77	9.38	8.33	9.32	9.07	9.8	8.57	11.93	11.7	12.37	11.21	19.92	20.22	19.49	21.01	13.73	13.67	13.85	13.63
Exp 7	2.77	3.96	0.81	6.48	13.69	13.69	13.68	13.7	6.28	7.5	4.14	9.99	7.35	8.57	5.21	11.01	6.29	7.5	4.33	10.1	2.98	4	1.82	6.33
Average	3.96	4.09	5.64	4.42	10.07	9.99	11.46	9.83	7.29	7.47	8.74	7.84	8.41	8.6	9.83	8.97	11.73	11.97	13.17	12.53	9.98	10.16	11.05	10.6

(d) $K_s, GLYPAM$

	VFA				PO4				PHA				PHB				PHV				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	5.5	5.49	5.51	5.48	13.87	13.86	13.91	13.82	7.55	7.54	7.56	7.52	7.5	7.49	7.51	7.48	10.13	10.11	10.19	10.06	12.08	12.07	12.08	12.07
Exp 3	1.58	1.58	1.6	1.56	3.54	3.54	3.53	3.54	6.28	6.29	6.27	6.31	8.48	8.49	8.45	8.51	10.18	10.18	10.2	10.16	11.91	11.92	11.91	11.93
Exp 4	5.63	5.61	5.66	5.57	10.2	10.19	10.22	10.15	7.01	7	7.03	6.97	6.78	6.76	6.8	6.74	11.98	11.97	12	11.95	9.19	9.18	9.21	9.15
Exp 5	4.06	4.06	4.08	4.03	8.89	8.88	8.91	8.87	9.2	9.19	9.22	9.17	11.82	11.81	11.84	11.79	20.06	20.07	20.04	20.09	13.7	13.69	13.7	13.68
Exp 7	3.37	3.38	3.37	3.38	13.69	13.69	13.69	13.69	6.89	6.89	6.89	6.9	7.97	7.97	7.97	7.98	6.89	6.89	6.89	6.9	3.49	3.5	3.49	3.5
Average	4.03	4.02	4.05	4	10.04	10.03	10.05	10.02	7.39	7.38	7.4	7.38	8.51	8.51	8.52	8.5	11.85	11.84	11.86	11.83	10.07	10.07	10.08	10.07

Table C.6: Kinetic aerobic parameters.(a) K_S, PHA_{aer}

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	8.61	12.05	2.94	19.36	10.82	10.51	11.2	9.68
Exp 3	3.43	4.72	2.32	8.02	4.5	4.65	4.61	5.88
Exp 4	16.19	13.3	21.85	7.55	26.17	24.99	27.94	21.55
Exp 5	4.94	2.78	8.91	2.62	9.63	10	9.12	11.25
Exp 7	5.78	3.97	9.05	0.72	5.75	5.88	5.59	6.39
Average	7.79	7.36	9.01	7.65	11.37	11.21	11.69	10.95

(b) $K_S, PHA_{aer,PAM}$

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	9.75	10.83	7.56	13.09	10.7	10.63	10.89	10.44
Exp 3	3.85	4.24	3.14	5.06	4.53	4.57	4.51	4.69
Exp 4	15.15	14.36	16.77	12.77	25.77	25.45	26.35	24.77
Exp 5	4.04	2.78	4.69	3.05	9.78	10	9.67	9.95
Exp 7	5.01	4.77	5.5	4.27	5.8	5.81	5.77	5.85
Average	7.56	7.39	7.53	7.65	11.32	11.29	11.44	11.14

(c) $K_S, PHA_{aer,GAM}$

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	8.48	12.12	5.12	15.85	10.82	10.51	11.01	10.13
Exp 3	3.4	4.76	2.48	6.37	4.51	4.66	4.51	5.1
Exp 4	16.29	13.22	19.37	10.18	26.2	24.96	27.24	23.37
Exp 5	5.06	2.67	7.39	0.84	9.61	10.03	9.29	10.6
Exp 7	5.89	3.87	7.84	1.77	5.74	5.89	5.64	6.11
Average	7.82	7.33	8.44	7	11.37	11.21	11.54	11.06

(d) $q_{GLY,PAO}$

	PHA				GLY			
%NRMSD	10%	-10%	50%	-50%	10%	-10%	50%	-50%
Exp 2	18.15	18.18	18.13	18.2	14.62	5	32.22	16.46
Exp 3	8.54	8.38	8.51	8.58	3.41	9.12	7.59	19.46
Exp 4	6.01	6	6.03	5.97	23.95	16.42	37.62	4.85
Exp 5	4.86	4.89	4.82	4.94	10.03	13.39	4.6	21.35
Exp 7	2.54	2.56	6.5	11.96	5.2	7.97	8.42	5.46
Average	8.02	8	8.8	9.93	11.44	10.38	18.09	13.52

Apéndice D

Información suplementaria y la primera hoja de los papers aceptados

Esta tesis doctoral es un compendio de artículos. Los trabajos relacionados con el presente documento son:

1. Participation in the 2nd Spain National Young Water Profesional Conference, with the poster entitled: Metabolic change of the PAOs metabolism during biological phosphorus removal. Spain IWAIWP. Year:2012. Autores: Acevedo B., Claros J., Seco A., Borrás L., Barat R.
2. Paper in Water Research 46 (6), pp. 1889–1900. Year: 2012. Title: Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage. Autors: Acevedo, B., Oehmen A., Carvalho G., Seco A., Borrás L., Barat R.
3. Participación en la X reunión de la mesa española de tratamiento de aguas, META 2012. Con la comunicación oral titulada: Cuando las bacterias PAO se visten de GAO en el proceso de eliminación biológica de fósforo. Autores: Barat R., Acevedo B., Borrás L., Ferrer J., Seco A.
4. Paper in Water Research 65 (), pp. 235-244. Year: 2014. Title: Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms. Autors: Acevedo, B., Borrás L., Oehmen A., Barat R.
5. Paper in Chemical Engineering Journal 270 (), pp. 459-467. Year: 2015. The metabolic versatility of PAOs as an opportunity to obtain a highly P-enriched

stream for further P-recovery. Autors: Acevedo, B., Camiña, C., Corona, JE., Borrás L., Barat R.

6. Submitted in Water Research. Title: Long term study of PAO metabolic behaviour under negligible poly-P reserves. Autors: Acevedo B., Murgui M., Borrás L., Barat R.

A continuación se muestra la primera página de los artículos que componen esta tesis.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage

B. Acevedo^a, A. Oehmen^b, G. Carvalho^b, A. Seco^c, L. Borrás^c, R. Barat^{a,*}^a Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain^b REQUIMTE/CQFB, Chemistry Department, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal^c Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia, Avenida de la Universidad, s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2011

Received in revised form

30 December 2011

Accepted 6 January 2012

Available online 15 January 2012

Keywords:

Polyphosphate-accumulating organisms (PAO)

Glycogen-accumulating organisms (GAO)

Accumulibacter Type I

Accumulibacter Type II

Polyphosphate (poly-P)

Polyphosphate-accumulating metabolism (PAM)

Glycogen-accumulating metabolism (GAM)

Wastewater

ABSTRACT

Previous studies have shown that polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) are able to behave as glycogen-accumulating organisms (GAOs) under different conditions. In this study we investigated the behavior of a culture enriched with *Accumulibacter* at different levels of polyphosphate (poly-P) storage. The results of stoichiometric ratios $Gly_{degraded}/HAC_{uptake}$, $PHB_{synthesis}/HAC_{uptake}$, $PHV_{synthesis}/HAC_{uptake}$ and $P_{release}/HAC_{uptake}$ confirmed a metabolic shift from PAO metabolism to GAO metabolism: PAOs with high poly-P content used the poly-P to obtain adenosine tri-phosphate (ATP), and glycogen (Gly) to obtain nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and some ATP. In a test where poly-P depletion was imposed on the culture, all the acetate (HAc) added in each cycle was transformed into polyhydroxyalkanoate (PHA) despite the decrease of poly-P inside the cells. This led to an increase of the $Gly_{degraded}/HAC_{uptake}$ ratio that resulted from a shift towards the glycolytic pathway in order to compensate for the lack of ATP formed from poly-P hydrolysis. The shift from PAO to GAO metabolism was also reflected in the change in the PHA composition as the poly-P availability decreased, suggesting that polyhydroxyvalerate (PHV) is obtained due to the consumption of excess reducing equivalents to balance the internal NADH, similarly to GAO metabolism. Fluorescence in situ hybridization analysis showed a significant PAO population change from Type I to Type II *Accumulibacter* as the poly-P availability decreased in short term experiments. This work suggests that poly-P storage levels and GAO-like metabolism are important factors affecting the competition between different PAO Types in enhanced biological phosphorus removal systems.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) is widely accepted as one of the most economical and sustainable processes to remove phosphorus from wastewater. PAOs are the group of microorganisms primarily responsible for the EBPR process. PAOs are equipped with a polyphosphate-

accumulating metabolism (PAM) under alternating anaerobic-aerobic/anoxic conditions. Under anaerobic conditions, PAOs take up volatile fatty acids (VFAs) (e.g. acetate) and store them as PHAs (Comeau et al., 1986; Mino et al., 1987; Wentzel et al., 1986). ATP is required for HAc transport (Comeau et al., 1986; Smolders et al., 1994) and conversion to acetyl coenzyme A (Ac-CoA) inside the cell. The source of ATP

* Corresponding author.

E-mail addresses: bracaju@posgrado.upv.es (B. Acevedo), a.ohmen@fct.unl.pt (A. Oehmen), gs.carvalho@fct.unl.pt (G. Carvalho), aurora.seco@uv.es (A. Seco), luis-borras-falomir@uv.es (L. Borrás), rababa@dihma.upv.es (R. Barat).

0043-1354/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2012.01.003

WATER RESEARCH 65 (2014) 235–244



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms



B. Acevedo^a, L. Borrás^b, A. Oehmen^c, R. Barat^{a,*}

^a Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia, Doctor Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^c REQUIMTE/CQFB, Chemistry Department, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2014

Received in revised form

16 July 2014

Accepted 20 July 2014

Available online 31 July 2014

Keywords:

Polyphosphate accumulating metabolism (PAM)

Glycogen accumulating metabolism (GAM)

Enhanced biological phosphorus removal (EBPR)

Metabolic models

Polyphosphate (poly-P)

Polyphosphate accumulating organism (PAO)

ABSTRACT

Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) is one of the most important methods of phosphorus removal in municipal wastewater treatment plants, having been described by different modelling approaches. In this process, the PAOs (polyphosphate accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) compete for volatile fatty acids uptake under anaerobic conditions. Recent studies have revealed that the metabolic pathways used by PAOs in order to obtain the energy and the reducing power needed for polyhydroxyalkanoates synthesis could change depending on the amount of polyphosphate stored in the cells. The model presented in this paper extends beyond previously developed metabolic models by including the ability of PAO to change their metabolic pathways according to the content of poly-P available. The processes of the PAO metabolic model were adapted to new formulations enabling the change from P-driven VFA uptake to glycogen-driven VFA uptake using the same process equations. The stoichiometric parameters were changed from a typical PAO coefficient to a typical GAO coefficient depending on the internal poly-P with Monod-type expressions. The model was calibrated and validated with seven experiments under different internal poly-P concentrations, showing the ability to correctly represent the PAO metabolic shift at low poly-P concentrations. The sensitivity and error analysis showed that the model is robust and has the ability to describe satisfactorily the change from one metabolic pathway to the other one, thereby encompassing a wider range of process conditions found in EBPR plants.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 963879618; fax: +34 963877618.

E-mail addresses: breactj@posgrado.upv.es (B. Acevedo), luis-borras-falomir@uv.es (L. Borrás), a.oeihen@fct.unl.pt (A. Oehmen), rabaha@dihma.upv.es (R. Barat).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.028>

0043-1354/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cejChemical
Engineering
Journal

The metabolic versatility of PAOs as an opportunity to obtain a highly P-enriched stream for further P-recovery

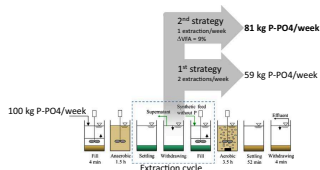
B. Acevedo^a, C. Camiña^a, J.E. Corona^a, L. Borrás^b, R. Barat^{a,*}

^a Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain
^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia, Doctor Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

HIGHLIGHTS

- A simple process was proposed to recover P in a SBR operated for EBPR.
- The P recovery did not affect the biological P removal performance.
- This process enables to recover up to 81% of the incoming P per week.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 15 October 2014
 Received in revised form 9 February 2015
 Accepted 14 February 2015
 Available online 21 February 2015

Keywords:
 Phosphorus recovery
 Polyphosphate (poly-P)
 Polyphosphate accumulating metabolism (PAM)
 Glycogen accumulating metabolism (GAM)
 Enhanced biological phosphorus removal (EBPR)
 Sequencing batch reactor (SBR)

ABSTRACT

The effects of two sequencing batch reactor operation strategies for phosphorus stream enrichment over the biological phosphorus removal performance have been studied. The objective of both strategies is of performing an extraction cycle in order to obtain a new stream highly enriched with phosphorus. In the 1st strategy the amount of influent volatile fatty acids (VFAs) is the same in each cycle; while in the 2nd strategy the influent VFAs concentration is increased during phosphorus extraction experiments. Despite the strong decrease of the stored poly-P inside the cells in both strategies after the recovery cycles, the ability of the systems to remove phosphorus was not affected. The $P_{\text{release}}/HAC_{\text{uptake}}$ ratio (changing from 0.73 to 0.21 mmol P mmol C⁻¹) together with FISH analyses (around 85% of *Accumulibacter* through the experimental period) confirmed that a shift from PAM to GAM occurred after phosphorus enrichment in the 2nd strategy experiments. These results suggest that energy required for VFA uptake by polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) was not only derived from polyphosphates degradation, but also from glycogen degradation. FISH also revealed that Type II *Accumulibacter* species are responsible of the metabolic shift. The strategy based on increasing influent VFAs concentration during phosphorus extraction experiments showed a higher extraction efficiency (from 46% to 76%), as higher phosphorus concentration within supernatant can be achieved (from 113.9 to 198.7 mg P l⁻¹). Following this strategy, it is possible to concentrate up to 81% of the incoming phosphorus in a single enriched stream. This suggests that, despite the extra addition of carbon source needed (9%), this strategy is more appropriate if phosphorus recovery for reuse purposes is required.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 963879618; fax: +34 963877618.
 E-mail addresses: breacj@posgrado.upv.es (B. Acevedo), carcaur@etsid.upv.es (C. Camiña), jecomen@posgrado.upv.es (J.E. Corona), luis-borras-falomir@uv.es (L. Borrás), rababa@diitma.upv.es (R. Barat).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.063>
 1385-8947/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phosphorus (P) is essential for all life and is a key element in fertilizers to increase crop yields not existing any other component

Estudio del cambio metabólico de las bacterias responsables de la eliminación biológica de fósforo.

El fósforo es de gran importancia para la vida debido a que desempeña un papel esencial en los procesos biológicos. El principal uso del fósforo está en la industria de los fertilizantes en forma de fosfatos. Estos fosfatos provienen principalmente de las rocas fosfáticas, las cuales podrían llegar a agotarse entre los próximos 50 y 100 años. La sobreexplotación de la roca fosfática, ha generado una disminución en la calidad de las reservas, y ha elevado el coste de su extracción, procesamiento y transporte marítimo.

Por otra parte, el fósforo proveniente de las aguas residuales, de la disolución de las rocas fosfáticas y de los suelos con excesivo aporte de fertilizantes, se deposita en los cuerpos de aguas superficiales produciendo un grave problema de contaminación llamado eutrofización.

Uno de los sistemas más empleados para reducir los niveles de fósforo en el agua residual es el proceso de eliminación biológica de fósforo (EBPR). Este proceso implica capturar biológicamente, alternando entre condiciones anaerobias óxicas/anóxicas, el fósforo del agua residual mediante organismos acumuladores de fósforo (PAOs). Sin embargo, uno de los principales problemas de este proceso, es la competencia de las PAOs con los organismos acumuladores de glucógeno (GAOs) por los ácidos grasos volátiles (AGV). Aunque si bien se han realizado muchos estudios sobre los factores que afectan la competencia entre PAOs y GAOs, existen aún muchas preguntas sin respuesta en relación al metabolismo de las PAOs cuando estas carecen de reservas energéticas en forma de polifosfatos intracelulares (poli-P) y a su efecto sobre la dinámica de las poblaciones de PAOs y GAOs en un sistema de fangos activados.