

Creació d'un consorci de microorganismes per l'eliminació de fòsfor a partir de fonts de carboni alternatives

Autora: Helena Guasch . Directors: Albert Guisasola i Carlota Tayà

ABSTRACT

The presence of suitable carbon sources for enhanced biological phosphorus removal plays a key role in phosphorus removal from wastewaters in wastewater treatment plants (WWTP). For waste waters with low volatile fatty acids content, an external carbon source is necessary. Methanol is the most common carbon source used in WWTP processes due to his low cost, but some studies suggest that it does not work successfully. This study develops a consortium between anaerobic digestion biomass and polyphosphate accumulating organisms (PAO) with the purpose to degradate methanol in volatile fatty acids (VFA), to obtain enhanced biological phosphorus removal EBPR activity. In addition, other sources of carbon to replace methanol are considered.

RESUM

La existència d'una font de carboni adequada per l'eliminació biològica de fòsfor, és un factor decisiu per l'eliminació de fòsfor de les aigües residuals urbanes. Per a les aigües residuals amb baix contingut d'àcids grassos volàtils és necessària l'addició d'alguna font de carboni externa. El metanol és la font de carboni més utilitzada en processos a EDAR (p.ex. desnitrificació), degut al seu baix cost. Malgrat això, varis estudis proven que per l'eliminació biològica de fòsfor, aquest, no és una bona alternativa. En aquest estudi es desenvolupa un consorci amb la biomassa de digestió anaeròbia i biomassa acumuladora de polifosfat (PAO). El propòsit del consorci és la degradació de metanol en AGV, per obtenir l'activitat EBPR. A més, aquest estudi mostra la viabilitat de substituir en el consorci el metanol per altres fonts de carboni.

PARAULES CLAU

Eiminació biològica de fòsfor, consorci, acidògens, acetògens, Polyphosphate Accumulating Organisms (PAO), metanol, acides grassos volàtils.

1. INTRODUCCIÓ I JUSTIFICACIÓ

Dins de la problemàtica general de la contaminació del medi ambient, la contaminació de l'aigua i consegüentment dels sistemes aquàtics és de gran importància, ja que són aquests un factor fonamental tant pel desenvolupament de l'ésser humà com per la resta de formes de vida.

Amb l'augment de la utilització de l'aigua, tant en l'àmbit domèstic com en l'àmbit industrial, ha augmentat també la quantitat d'aigua residual generada i habitualment contaminada. Les característiques d'aquestes aigües poden ser molt variables així com els efectes de la seva contaminació (contaminants físics, químics...). Degut a la problemàtica associada al vessament de les aigües (eutrofització, contaminació de sistemes aquàtics i terrestres...), sorgeix la necessitat de depurar els efluent residuals que es generen amb les principals finalitats de:

- Protegir l'estat ecològic dels medis receptors (embassaments, rius, barrancs, aqüífers, mar, etc.)
- Evitar riscos per la salut pública de la població
- Produir efluent amb característiques físiques, químiques i microbiològiques aptes per la reutilització

Aquests tractaments, venen determinats per les característiques **físiques** (color, olor, temperatura, sòlids...), **químiques** (pH, oxigen dissolt, potencial redox, demanda química d'oxigen (DQO), concentracions de nutrients, concentracions de metalls pesats, etc) i **biològiques** (quantitat d'organismes patògens, demanda biològica d'oxigen (DBO)) de les aigües en qüestió, i el grau de depuració esperat depenent de si l'aigua s'ha d'abocar a la llera (on cal distingir-ne zones amb protecció especial) o es vol reutilitzar per a fins urbans, industrials, agrícoles, recreatius o ambientals (recàrrec d'aqüífers, reg de boscos, etc).

La concentració de cada un dels components que pot contenir l'efluent de sortida ve determinada per la legislació. En les aigües que s'aboquen a la llera es controlen paràmetres com DBO5, DQO, SST, P i N totals, en canvi a les aigües reutilitzades en controlen altres paràmetres com els nematodes intestinals, *E.coli*, SST i terbolesa.

El tractament es pot dur a terme de diverses maneres depenent del volum d'aigua a tractar i la metodologia a seguir. Existeixen, per exemple, sistemes de llacunatge en el que es recull l'aigua i es deixa reposar per tal d'estabilitzar la matèria orgànica mitjançant l'acció de les plantes i microorganismes que habiten en el "llac artificial". El sistema anàleg a aquest, seria l'EDAR convencional, en la que es tracten volums més grans amb més càrrega orgànica, nutrients i altres compostos dissolts. El control dels diferents paràmetres al llarg de les instal·lacions fa possible detectar pics de

contaminació i procedir correctament. En aquestes són habituals els tractaments biològics per tal d'extreure aquells nutrients dissolts capaços de ser absorbits per microorganismes.

1.1. El fòsfor

El fòsfor és un nutrient essencial per les plantes i els animals. La seva presència doncs, és indispensable en totes les formes de vida. Tot i així un excés en les aigües residuals pot desencadenar problemes d'eutrofització. A més la necessitat d'obtenir-lo per l'ús en diversos àmbits com per exemple l'agricultura, fa més atractiva la idea de poder-lo eliminar de les aigües residuals per poder ser recuperat més endavant.

S'han desenvolupat diversos processos per l'extracció d'aquest fòsfor en les aigües residuals, ja sigui de manera simultània a l'eliminació de matèria orgànica o en processos separats. Els tractaments utilitzats es basen en sistemes fisicoquímics, biològics i combinats. L'elecció de l'alternativa a utilitzar depèn dels objectius a complir en la qualitat de l'efluent, de la flexibilitat, de funcionament i dels costos.

Per l'eliminació de fòsfor en processos biològics s'utilitza habitualment un sistema llots actius. Consisteix en el condicionament de la biomassa per tal de que aquesta acumuli la major quantitat de fòsfor possible (entre un 5-17% del pes sec) (Satoh *et al.* 1992) en forma de grànuls de polifosfat, valors molt per sobre dels nivells requerits per satisfer les seves necessitats biològiques (valors entre 1.5 i 2% del pes sec).

Els microorganismes amb els que s'enriqueix aquesta biomassa són els Polyphosphate Accumulating Organisms (PAO). Aquesta biomassa es capaç de dur a terme aquesta acumulació si se l'exposa a cicles amb fases anaeròbia i aeròbia alternants; sota condicions anaeròbies, els PAO capten substrat orgànic (preferentment AGV) produint consegüentment polihidroxialcanoats (PHA) emmagatzemats intracel·lularment com a forma de reserva energètica. Aquests, en la següent fase aeròbia o anòxica són utilitzats com a única font de carboni.

1.2. La font de carboni

El carboni que entra en forma dissolta habitualment conté una fracció molt baixa d'àcids grassos volàtils, fet que dificulta l'activitat PAO i consegüentment el procés EBPR en aigües residuals reals. Per dur a terme l'eliminació biològica doncs es fa necessària l'adició d'alguna font de carboni externa.

En ser els AGV una alternativa molt cara per l'adició externa, i les altres fonts de carboni una alternativa poc viable ja que no són assimilables pels PAO, es fa necessària la cerca d'un sistema d'EBPR, amb la finalitat d'obtenir en el mateix reactor de treball dels PAO, una generació d'àcids grassos de cadena

curta per tal de poder ser consumits per aquests, i poder evitar així l'addició d'una font externa de carboni. Els microorganismes que a partir de fonts de carboni com glucosa, glicerol o etanol, generen AGV, podrien ser els acidògens i els acetògens. Tots dos, presents en el conjunt de biomassa de digestió anaeròbia.

2. OBJECTIU

Amb la finalitat de millorar el procés EBPR i adaptar-lo a les condicions reals de les depuradores, es proposa la creació d'un consorci amb dos grups funcionals de microorganismes. Els primers, acidògens i acetògens, consumeixen metanol, degradant-lo a àcids grassos volàtils, augmentant-ne així la concentració en el tanc anaerobi. Els segons, els PAO, gràcies a l'aportació d'AGV provinent dels microorganismes de digestió anaeròbia, obtenen suficient font de carboni per tal de dur a terme el procés EBPR que consta de dues fases consecutives.

Finalment, un cop la biomassa està ben seleccionada i el consorci funciona correctament, es proposa la realització d'experiments en discontinu per tal de provar la viabilitat d'altres fonts de carboni en el consorci.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Equipament

La planta pilot consta de dos reactors de tipus SBR (Sequencing Batch Reactor) de 13,5 L i controlats per un sistema PLC (SIMATIC S7-226, Siemens). Cada un dels reactors ha estat inoculat amb una biomassa diferent; el primer, l'SBR A, amb fangs del digester anaerobi de Granollers alimentats amb metanol, i el segon, l'SBR B, amb un fang enriquit amb biomassa PAO. A més cada SBR està equipat amb tres sondes (una d'oxigen, una de pH i temperatura i una de potencial redox), un bany termostàtic per mantenir la temperatura en el reactor, una entrada d'àcid i base per tal de mantenir el pH constant, un difusor de gas i un agitador.

Aquests SBRs operen en cicles de 8 hores amb un total de 3 cicles al dia. Els temps de les fases anaeròbia i aeròbia han variat al llarg de l'experiment en l'SBR A per tal de fer la selecció de la biomassa acetogènica. En la primera configuració, el cicle ha estat completament anaerobi. En la segona, s'ha afegit 30 minuts d'aeració al final de fase anaeròbia per començar a eliminar la població metanogènica. Finalment la configuració del reactor queda amb 5h de fase anaeròbia i 2h d'aeròbia. L'hora final de tots els cicles es dedica a la sedimentació i extracció dels fangs.

A l'inici de cada cicle, s'alimenta el reactor amb 5L d'un medi sintètic enriquit amb els següents compostos: $108,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $82,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$, $87,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $320 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Allylthiourea}$, i $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. En el medi s'afegeix també 30mL per cada 100L de medi, d'una sol·lució de micronutrients amb la següent concentració de compostos en aigua: $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KI}$, $0.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, i 68.5 mL d'EDTA 0,5M. Per altra banda entra també a l'inici del cicle 0.03L de la font de carboni corresponent (metanol en l'SBR A i àcid propiònic en l'SBR B)

Un cop feta la selecció de la biomassa, s'ha bioaugmentat l'SBR A amb 4 litres de llots de l'SBR B per la formació del consorci. L'SBR A ha continuat operant amb cicles de 8 hores amb 5 hores de fase anaeròbia i 2 hores de fase aeròbia.

3.2. Experiments en discontinu

Pels experiments en discontinu, s'han utilitzat dos litres de fangs dels SBR, i s'han col·locat al respiròmetre juntament amb una sonda d'OD i una de pH. El respiròmetre es col·loca a un bany termostàtic a 25°C . Per ajustar el pH, es connecta el sistema al programa FlowView i aquest a una microbureta que addiciona àcid i base en les quantitats necessàries per mantenir el pH a $7,5 \pm 0,05$. Al mateix programa també està connectat un cabalímetre que quantifica el cabal d'aire entrant. Durant la fase anaeròbia es manté un cabal de N_2 per mantenir una concentració d'oxigen de $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ i posteriorment en la fase aeròbia es canvia el N_2 per O_2 per tal de mantenir una concentració d'entre 3 i $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Els pols de la font de carboni s'addicionen al sistema a l'instant 0 min amb una micropipeta. La quantitat varia en funció de la concentració de la cada un dels compostos, ja que l'objectiu és obtenir en l'interior una DQO de $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El sistema està agitat mitjançant un sistema d'agitació magnètic que es col·loca sota el bany termostàtic.

3.3. Anàlisi químic i microbiològic

Totes les mostres que s'han extret per l'anàlisi de metanol, AGV i fòsfor, s'han filtrat amb un filtre mil·lex de $22\mu\text{m}$ de porus. La concentració de metanol i AGV, ha estat determinada mitjançant cromatografia de gasos. L'equip utilitzat ha estat un Agilent Technologies 7820 A GC equipat amb una columna INNOWAX (30m de longitud x $0,53\text{mm}$ de diàmetre intern x $1\mu\text{m}$ d'espessor de la pel·lícula interior) i amb un detector de flama d'ionització FID (flame ionisation detector). El pols de mostra injectada es de $1\mu\text{l}$ a 50°C . El gas portador és heli. La temperatura inicial de la columna són 45°C i incrementa a raó de 20°C per minut fins a arribar als 110° .

La concentració de fòsfor s'ha determinat amb l'equip d'anàlisi PHOSPHAX. Aquest equip utilitza la tècnica de quantificació per colorimetria del vanadat/molibdat. Aquests compostos, en reaccionar amb els ortofosfats formen un complex de color groc, que es mesurat mitjançant un fotòmetre de doble feix. El rang de detecció del PHOSPHAX és de 0,05 - 15 mg·L⁻¹ PO₄-P, és per això que després de filtrar les mostres amb els filtres Millex de 0,22 µm, cal diluir-les, ja que en el reactor trobem una concentració de fòsfor de fins a 70 mg·L⁻¹.

S'ha utilitzat la tècnica de *fluorescence in situ hybridization* (FISH), juntament amb un microscopi confocal per descriure i quantificar la biomassa dels reactors. La quantificació de les diferents espècies (PAO i GAO) s'ha fet mitjançant l'anàlisi de 40 imatges preses aleatòriament sobre cada mostra.

Finalment per l'anàlisi de Polihidroxicanoats (PHA), s'ha digerit un extracte liofilitzat dels fangs de la mostra, i un cop filtrat s'ha analitzat mitjançant cromatografia de gasos.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a la creació del consorci PAO-anaerobis, han calgut etapes prèvies per el condicionament de la biomassa en el reactor. Així doncs, a partir de fangs de la depuradora de Granollers s'han anat seleccionant les dues biomasses per separat. El mètode de selecció consisteix en afavorir només les condicions per a que la biomassa desitjada sobrevisqui (aliment, temperatura, OD, pH...).

La selecció dels microorganismes acidògens i acetògens a partir del fang de digestió anaeròbia ha estat la part inicial de la preparació del consorci. Aquesta fase de selecció ha estat dividida en tres períodes en els que s'ha aplicat una quantitat diferent d'oxigen en cada una d'elles. Essent el primer (període 1) totalment anaerobi, el segon (període 2) de 6,5 h de fase anaeròbia i 0,5 de fase aeròbia, i l'últim (període 3), el més aerobi de tots amb 5h de fase anaeròbia, i 2 hores finals d'aeració. L'augment gradual d'oxigen dissolt s'aplicà amb l'objectiu d'adaptar els microorganismes acidògens i acetògens a condicions més aeròbies, i excloure els metanògens del sistema, ja que són anaerobis estrictes i per tant moren amb petites quantitats d'oxigen.

Ha sigut necessari realitzar dues vegades l'experiment, fent canvis en alguns paràmetres, ja que en el primer no s'ha aconseguit eliminar fòsfor un cop fet el consorci amb les dues biomasses.

4.1. Experiment primer

En el primer intent de creació del consorci s'han dedicat 42 dies per a la fase de selecció de la biomassa de digestió anaeròbia dividits. El període 1 i 2 d'aquesta fase de selecció han tingut una durada de 7 dies cada un, i el tercer període de 28 dies. Durant aquesta fase, s'ha donat un consum de metanol correcte però en cap cas s'ha vist formació d'AGV.

Un cop s'ha augmentat l'SBR A, s'observa que la selecció no ha sigut l'adequada i que els PAO no són capaços d'adaptar-se en les condicions donades. Si bé en el primer cicle després de la formació del consorci hi ha una eliminació de $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, fet que indicaria un bon funcionament inicial, dos dies més tard l'eliminació ha disminuït fins a $0.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fet pel qual deduïm que la biomassa PAO no ha estat capaç de competir per la font de carboni amb algun altre microorganisme procedent de la digestió anaeròbia.

La gran varietat d'espècies i la manca de dades de formació d'AGV no ens permet conèixer amb exactitud el motiu pel qual la població de PAO realitza cap activitat ni de captació ni d'alliberació. Tot i així podem suposar varis motius: a) El període de selecció dels organismes fermentadors ha estat massa llarg. Durant aquest temps s'ha vist potenciat el creixement d'alguns microorganismes anaerobis facultatius capaços de consumir AGV. Aquest ha sigut competidor amb els PAO per la font de carboni. b) La excessiva concentració de metanol en el reactor pot causar inhibició i/o toxicitat en els organismes PAO. c) Els fangs de l'SBR B contenen una fracció elevada de GAO i aquests han desplaçat els PAO un cop s'ha bioaugmentat. d) S'han seleccionat microorganismes consumidors de metanol tant anaerobis com aerobis, que no formen AGV com a subproducte.

4.2. Experiment segon

En el segon intent de creació del consorci, s'ha repetit la metodologia en la fase de selecció, però s'ha canviat la duració dels períodes. El període 1 ha durat 10 dies, el període 2, 2 dies, i el període 3, 3 dies. Pel que fa el metanol, s'ha disminuït la concentració d'entrada passant dels $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de l'experiment primer a $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el segon. Tot i així aquesta quantitat ha sigut suficient per no ser consumida abans de l'inici de la fase aeròbia. En els anàlisis no s'ha vist presència d'AGV. Malgrat això, un cop feta la bioaugmentació de l'SBR A les concentracions de fòsfor eliminat han estat positives. En el primer seguiment s'ha obtingut una eliminació de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ i en el següent 7 dies més tard $15.4 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquest valor ha anat oscil·lant fins a quedar-se relativament estable al voltant d'uns $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'eliminació. Es dedueix doncs que durant la fase del consorci la biomassa PAO s'ha anat adaptat favorablement dins del consorci i que els metanògens han sigut eliminats al llarg d'aquest temps, augmentant així la formació d'AGV i incrementant així l'eliminació de fòsfor.

Pel que fa a la variació de la concentració de metanol a l'entrada, es pot afirmar que per una banda no ha permès que l'alliberació i la captació hagin estat màximes ja que no han tingut suficient font de carboni disponibles pels PAO, tot i que per l'altra banda, ha permès l'adaptació d'aquests ja que no ha inhibit la seva activitat ni el seu creixement

5. CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts es pot dir que:

És possible la formació d'un consorci per a l'obtenció de EBPR amb fonts de carboni diferents a les habituals amb microorganismes de digestió anaeròbia i PAO tot i que és necessària més experimentació per trobar les condicions idònies. Tot i així es pot concloure que: a) Per la posada en marxa del sistema, és necessari un condicionament de la biomassa de digestió anaeròbia. No es pot bioaugmentar sense aquesta etapa prèvia ja que en els llots de digestió anaeròbia hi ha microorganismes que competeixen amb els PAO per la font de carboni. b) La concentració de metanol ha de ser suficient per poder garantir el màxim rendiment EBPR, però un excés pot causar inhibició. c) La majoria del PHA acumulat pels PAO, ha estat en forma d'àcid hidroxibutíric, per tant podem afirmar que la major part de font de carboni captada per la biomassa de digestió anaeròbia, es transforma en àcid acètic. d) En els experiments en discontinu amb la biomassa del consorci i amb la biomassa PAO alimentada amb propiònic, s'ha utilitzant etanol, propiònic, glicerol, glucosa, sacarosa i llet com a fonts de carboni alternatives, i s'ha donat una millor activitat EBPR quan ha funcionat el consorci, i especialment quan s'ha utilitzat metanol ja que se'ls havia aclimatat a aquestes condicions. Es considera doncs, que el consorci és apte per funcionar amb altres fonts de carboni. Tot i així és necessària l'aclimatació prèvia de la biomassa per poder obtenir un bon rendiment.

6. BIBLIOGRAFIA

AMANN R.I., LUDWIG W., SCHLEIFER KH. (1995); "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation"; *Microbiology reviews*; Volum 59, Pàgines 143-169

APHA (1995); "Standard Methods for the examination of water and wastewater", 19th edition, American Public Health Association, Washington DC, USA. ISBN 9780875532356

BARNARD J.L., (1976); "A review of biological phosphorus removal in the activated sludge process"; *Water Research*; Volum 30, Pàgines 769-780.

TAYÀ C., GUERRERO J., VANNESTE G., GUIASOLA A., BAEZA J., (2011) "Methanol-driven enhanced biological phosphorus removal with syntrophic consortium". *En revisió*.

DAVELAAR D, DAVIES TR, WIECHERS SG (1978); "The significance of the anaerobic zone for the biological removal of polyphosphate from wastewater"; *Water SA; Volum 4, Pàgines 54-60*

GREENBURG A.E., KLEIN G, KAUFFMAN W.J., (1955); "Effect of phosphorus on the activated sludge process"; *Sewage and Industrial Wastes, Volum 27, Pàgines 277-282*

GUERRERO J., TAYÀ C., GUIASOLA A., BAEZA J. (2011); "Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal", *Water Research, Volum 46, Pàgines 2983-2991*

LEVIN GV, SHAPIRO J (1965); "Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms"; *J. Water Pollut. Contr. Fed.; Volum 37, Num 6, Pàgines 800-821*.

MARAIS GR, LOEWENTHAL RE, SIEBRITZ IP (1983); "Observations supporting phosphate removal by biological excess uptake. A Review". *Water Sci Technol; Volum 31, Num 6. Pàgines 1430-1438*.

MARTÍN I., BETANCORT J.R., SALAS J.J., PEÑATE B., PIDRE J.R y SARDÓN N. (2006); "Guía sobre tratamientos de aguas residuales urbanas para pequeños núcleos de población" *Proyecto Icrewll. Edición: Instituto Tecnológico de Canarias (ITC)*.

MASSÉ, D.I., DROSTE R.L. (2000); "Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor" *Water Research; Volum 34, Issue 12, Pàgines 3087-3106*

METCALF i EDDY (1995); "Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y reutilización"; 3 ed. *McGraw-Hill, Madrid. ISBN 9788448116071*

PETZET S., PEPLINSKI B., CORNEL P., (2012); "On wet chemical phosphorus recovery from sewage sludge ash by acidic or alkaline leaching and an optimized combination of both" *Water research. Acceptat no publicat*.

POTE D.H., DANIEL T.C. (2003); "Analyzing for Dissolved Reactive Phosphorus in Water Samples" *Southern Cooperative Series Bulletin No. # 396 (www.sera17.ext.vt.edu)*

SATOH. M., RAMEY. W.D., KOCH F. A., OLDMAN W.K., MINO T., MATSUO T. (1996); "Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage"; *Wat. Sci. Tech; Volum 34, Pàgines 9-16*.