

## ABSTRACT

Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) is gradually transitioning from conventional approaches to more innovative methods, largely driven by cost efficiency and sustainability considerations. This process primarily relies on the ability of polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) to take up and store phosphorus (P) beyond their growth requirements, particularly under alternating anaerobic and anoxic conditions. The availability and utilization of carbon sources and electron acceptors, such as dissolved oxygen or nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)/nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), are essential for effective P removal. The discovery of denitrifying phosphate-accumulating organisms (DPAOs) capable of carrying out anoxic phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) uptake reshaped the understanding of EBPR.

The application of DPAOs in EBPR systems offers a sustainable approach for combined phosphorus (P) and nitrogen (N) removal in wastewater treatment plants (WWTPs). Under anoxic conditions, DPAOs use NO<sub>2</sub><sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as an electron acceptor instead of dissolved oxygen, leading to improved carbon use, energy saving, and reduced sludge production. The anaerobic-anoxic conditions are critical for the novel role of DPAOs in P removal. However, due to the limitation of carbon in the influent wastewater, there is a high motivation to use external carbon sources, such as glucose and acetate for the EBPR processes. The role of acetate in EBPR is well understood in literature. In contrast, glucose is traditionally considered a less-preferred carbon source for EBPR, but recent reports suggested its use by *Tetrasphaera*-rich DPAOs. Moreover, the denitrification activity of DPAOs under anoxic conditions has equally raised concerns about nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions, which remain insufficiently understood.

The aim of this study was to investigate the behavior of *Tetrasphaera*-rich sludge in the presence of glucose as a potential substrate for DPAO-driven EBPR. A series of two-phase laboratory batch tests (anaerobic/anoxic) was carried out, using glucose and acetate as carbon sources under either NO<sub>2</sub><sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as electron acceptor conditions. Activated sludge was sourced from Debogorze WWTP in Gdynia (northern Poland), with biomass concentrations ranging between (2-5 g MLVSS/L) (adjusted for cuvette-based tests). Glucose and acetate were supplied in variable amounts based on the COD:P ratios (>2.5 vs. <2.5). The functional performance of the *Tetrasphaera*-rich sludge was evaluated by measuring phosphate release/uptake rates (PRRs and PURs), and nitrate utilization rates (NURs/NiURs), while also monitoring N<sub>2</sub>O production in some experiments. The process temperature was set to 20°C and pH was kept closely to the neutral conditions.

The results showed that acetate greatly enhanced DPAO activity compared to glucose, achieving PRR values up to 25 times higher. Under NO<sub>3</sub><sup>-</sup> conditions, acetate-fed tests reached PURs up to 1.5 ± 0.6 mg P / (gMLVSS·h) and NURs up to 2.9 ± 0.9 mg N / (gMLVSS·h). N<sub>2</sub>O production was primarily observed with the use of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> electron acceptor. Despite high NUR values, no N<sub>2</sub>O production was observed with the use of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> electron acceptor. DPAOs were associated with the observed reduction of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> to NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and not directly to N<sub>2</sub>O production. N<sub>2</sub>O production was primarily linked to ordinary heterotrophic organisms (OHOs).

In Series I experiments, the exact percentage contribution of DPAOs was not explicitly identified. However, in Series II experiments, N removal rates before and after chemical precipitation of PO<sub>4</sub>-P provided clearer insight into the activity of *Tetrasphaera*-rich sludge under modified anoxic conditions. Based on the calculated NUR values, approximately 26-32% of the total NUR was

attributed to DPAO-driven PHA utilization linked to PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> uptake, whereas 68-74% was attributed to denitrifying OHOs.

**Keywords:** DPAO; EBPR; N<sub>2</sub>O production, carbon sources, glucose; electron acceptor

## STRESZCZENIE

Proces pogłębionego biologicznego usuwania fosforu (ang. EBPR) podlega stopniowej przemianie w kierunku bardziej innowacyjnych metod z uwzględnieniem efektywności ekonomicznej i zrównoważonego rozwoju. Proces ten opiera się przede wszystkim na zdolności organizmów akumulujących polifosforany (ang. PAO) do pobierania i magazynowania zwiększonych ilości fosforu (P), szczególnie w naprzemiennych warunkach beztlenowych i anoksydacyjnych. Warunkiem efektywnego usuwania P jest dostępność oraz wykorzystanie źródeł węgla wraz z akceptorami elektronów, takimi jak tlen lub azotany (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)/azotyny (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Odkrycie denitryfikujących organizmów akumulujących fosforany (ang. DPAO), zdolnych do przeprowadzania anoksydacyjnego poboru fosforanów (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), zmieniło początkową wiedzę na temat procesu EBPR.

Zastosowanie DPAO w układach z EBPR umożliwia zrównoważone podejście do zintegrowanego usuwania fosforu (P) i azotu (N) w oczyszczalniach ścieków. W warunkach anoksydacyjnych DPAO wykorzystują NO<sub>3</sub><sup>-</sup> lub NO<sub>2</sub><sup>-</sup> jako akceptory elektronów, co prowadzi do bardziej efektywnego zużycia węgla, oszczędności energii oraz zmniejszenia produkcji osadów. Warunki beztlenowo-anoksydacyjne mają kluczowe znaczenie dla usuwania P z wykorzystaniem DPAO. Z uwagi na ograniczoną zawartość węgla w ściekach, istnieje potrzeba wykorzystania zewnętrznych źródeł węgla, takich jak glukoza i octan w procesie EBPR. Rola octanu jest dobrze opisana w literaturze. Z kolei glukoza jest powszechnie uważana za mniej preferowane źródło węgla dla procesu EBPR, jednak ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na możliwość wykorzystania glukozy przez DPAO o wysokiej zawartości bakterii *Tetrasphaera*.. Poza tym, aktywność DPAO w warunkach anoksydacyjnych może powodować zwiększone emisje podtlenku azotu (N<sub>2</sub>O), które dotychczas nie zostały wystarczająco poznane.

Celem pracy było zbadanie zachowania się osadu o wysokiej zawartości bakterii *Tetrasphaera* w obecności glukozy jako potencjalnego substratu dla DPAO. W tym celu wykonano serię dwufazowych (beztlenowych/anoksydacyjnych) laboratoryjnych testów wsadowych z wykorzystaniem glukozy i octanu jako źródeł węgla oraz NO<sub>2</sub><sup>-</sup> lub NO<sub>3</sub><sup>-</sup> jako akceptorów elektronów. Do badań wykorzystano osad czynny z oczyszczalni ścieków Debogorze w Gdyni. Badania wykonywano przy stężeniach biomasy w zakresie (2-5 g smo/L). Glukoza i octan były dawkiowane w różnych ilościach przy zmiennych proporcjach ChZT:P (>2,5 lub <2,5). Właściwości osadu o wysokiej zawartości bakterii *Tetrasphaera* badano na podstawie pomiarów szybkości uwalniania/poboru fosforanów (ang. PRR i PUR) oraz szybkości zużycia azotanów/azotynów (ang. NUR/NiUR). Dodatkowo, w niektórych eksperymentach, monitorowano produkcję N<sub>2</sub>O. Zadana temperatura procesu wynosiła 20°C, a pH utrzymywano na poziomie zbliżonym do neutralnego.

Uzyskane wyniki wykazały, że octan znacznie zwiększał aktywność DPAO w porównaniu do glukozy, osiągając nawet 25-krotnie wyższe wartości PRR. W obecności NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, testy z octanem osiągały wartość PUR do 1,5± 0,6 mg P /(gsmo·h) oraz NUR do 2,9 ± 0,9 mg N /(gsmo·h). Produkcję N<sub>2</sub>O obserwowano głównie w obecności NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Pomimo wysokich wartości NUR, nie zaobserwowano akumulacji N<sub>2</sub>O elektronów obecności NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. DPAO były odpowiedzialne głównie za redukcję NO<sub>3</sub><sup>-</sup> do NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, a ich udział w produkcji N<sub>2</sub>O był mniej znaczący. Produkcja N<sub>2</sub>O była wynikiem aktywności innych bakterii heterotroficznych.

W eksperymentach serii I nie zidentyfikowano dokładnego procentowego udziału DPAO. Jednak w serii II było to możliwe w oparciu o obliczone wartości NUR po zastosowaniu chemicznego

strącania PO<sub>4</sub>-P. Około 26-32% całkowitego NUR było związane z aktywnością DPAO, podczas gdy 68-74% było związane z denitryfikacją z udziałem innych bakterii heterotroficznych.

**Słowa kluczowe:** DPAO; EBPR; Produkcja N<sub>2</sub>O, źródła węgla, glukoza; akceptor elektronów