

04-033

STUDY OF THE KINETICS AND STOICHIOMETRY IN THE MODELING OF THE METABOLIC SHIFT OF POLYPHOSPHATE ACCUMULATING ORGANISMS (PAO)

Mateo Llosá, Óscar ⁽¹⁾; Robles Martínez, Ángel ⁽²⁾; Barat Baviera, Ramón ⁽¹⁾

⁽¹⁾ CALAGUA-Unidad Mixta UV-UPV, Institut Universitari d'Investigació d'Enginyeria de l'Aigua i Medi Ambient-IIAMA, Universitat Politècnica de València, ⁽²⁾ CALAGUA-Unidad Mixta UV-UPV, Departament d'Enginyeria Química, Universitat de València

The work aims to assess the effect of influent characterization, kinetics and stoichiometry in the modeling of metabolic shift of PAOs (model proposed by Acevedo et al., 2014). This model was implemented in Matlab® software using two methods of Global Sensitivity Analysis to identify the factors with the greatest influence on the model predictions: the Standardized Regression Coefficient (SRC) and the Modified Morris Screening Method. The SRC method did not represent all the output factors because it does not provide information about the interacting factors. The Morris Method, based on trajectories, obtains better results in less time and computational cost, avoiding the exclusion of influential factors, as happens with the SRC. The inclusion of the initial characterization (IC) in the Morris Method may exclude the factors that represent the shift in PAM-GAM metabolism. Therefore, the combination of the Morris Method (with and without IC) is recommended for the detection of high-influence parameters, minimizing type II error. A large number of non-influential factors are detected, 36 (anaerobic phase) and 27 (aerobic phase) and thus the calibration needs of the model parameters can be reduced, prior to its employment in real cases.

Keywords: sensitivity analysis; Morris screening method; Standardized Regression Coefficients (SRC) method; Polyphosphates accumulating organisms (PAOs); Polyphosphate Accumulator Metabolism (PAM); Glycogen Accumulator Metabolism (GAM)

ESTUDIO DE LA CINÉTICA Y ESTEQUIOMETRÍA EN LA MODELACIÓN DEL CAMBIO METABÓLICO DE LOS ORGANISMOS ACUMULADORES DE POLIFOSFATOS (PAO)

El trabajo tiene como objetivo la evaluación del efecto de la caracterización afluente, la cinética y la estequiometría en la modelación del cambio metabólico de los PAO (modelo propuesto por Acevedo et al., 2014). Este fue implementado en el software Matlab® aplicando dos métodos de Análisis de sensibilidad global para identificar los factores de mayor influencia sobre las predicciones del modelo: el Coeficiente de Regresión estandarizados (SRC) y el Método de Cribado de Morris Modificado. El SRC no representó todos los factores de salida al no proporcionar información de los factores que interactúan. El Método Morris, basado en trayectorias obtiene mejores resultados en menor tiempo y costo computacional, evitando la exclusión de factores influyentes, como pasa con SRC. La inclusión de la caracterización inicial (CI) en el Método Morris puede excluir factores que representan el cambio de metabolismo PAM-GAM. Por tanto, se recomienda la combinación del Método Morris (con y sin CI), para la detección de los parámetros de alta influencia, minimizando el error tipo II. Así, se detecta gran cantidad de factores poco influyentes, 36 (fase anaerobia) y 27 (fase aerobia), reduciéndose las necesidades de calibración de los parámetros del modelo, previo a su empleo en casos reales.

Palabras clave: análisis de sensibilidad; método de cribado de Morris; Método de Coeficientes de Regresión Estandarizados (SRC); Acumulador de Glucógeno (GAM)

Correspondencia: Óscar Mateo Llosá osmallo@cam.upv.es



©2020 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introducción

El fósforo (P) es de gran importancia para la vida debido a que desempeña un papel esencial en los procesos biológicos (Van Dijk et al., 2016) y al tratarse de un recurso no renovable, su control y adecuado manejo se convierte en una preocupación mundial. Además, su vertido, proveniente de las aguas residuales no tratadas, la disolución de rocas fosfáticas y el uso excesivo de fertilizantes produce un problema de contaminación por eutrofización; provocando la reducción de oxígeno en la columna de agua, floración de algas y formación de depósitos de P en sedimentos (Roldán et al., 2020).

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). La modelación matemática de los procesos EBPR es una herramienta con la que es posible conocer y comprender el comportamiento del sistema, permitiendo diseñar esquemas de tratamiento eficaces y adecuados al agua residual a tratar. Los procesos EBPR están descritos típicamente por dos tipos de modelos matemáticos, los modelos metabólicos y modelos de fangos activos (ASM). Ambos están compuestos por una serie de expresiones estequiométricas y cinéticas que describen las transformaciones bioquímicas del proceso EBPR y otros procesos de eliminación de nutrientes (Oehmen et al., 2007). Las principales diferencias radican en la observación del proceso y la obtención de los coeficientes de rendimiento (Oehmen et al., 2007). Existen diversos modelos para descripción del proceso EBPR, tales como ASM2 (Henze et al., 2007), the Technical University of Delft Phosphorus model (TUDP model) (Meijer, 2004), ASM3-bio P model (Rieger et al., 2001), UCTPHO+ (Hu et al., 2007).

Respecto a los modelos metabólicos, estos se basan en el conocimiento de las reacciones estequiométricas de las rutas metabólicas, siendo los coeficientes de rendimiento obtenidos teóricamente a partir de los balances de sustrato, energía y poder reductor, minimizando la necesidad de calibración de parámetros (Oehmen et al., 2007). En el proceso EBPR, las PAO (organismo acumulador de polifosfato) y GAO (organismo acumulador de glucógeno) compiten por la toma de VFA en condiciones anaerobias. La similitud en los metabolismos de PAO y GAO, llevó a Schuler and Jenkins (2003) a plantear la hipótesis de que bajo ciertas condiciones de operación el metabolismo acumulador de glucógeno (GAM) típico de las GAO, podía ser el proceso dominante en el cultivo de PAO, corroborado posteriormente en diversos estudios. Se ha observado que las rutas metabólicas empleadas por las PAO con objeto de obtener energía y poder reductor necesario para la síntesis de PHA podría variar dependiendo de la cantidad de polifosfato almacenado en las células. Por ejemplo, Erdal et al. (2008) and Zhou et al. (2008) propusieron el empleo del glucógeno como principal fuente de energía para la toma de acetato y almacenamiento como PHA en condiciones anaerobias. Por otra parte, Barat et al. (2006, 2008), observaron un cambio de metabolismo desde metabolismo acumulador de polifosfato (PAM) a GAM en un sistema SBR (Sequencing Batch Reactor) operado con EBPR, donde se apreció un claro efecto en la cantidad de fosfato liberado por unidad de acetato absorbido durante la fase anaerobia, relacionado con la concentración influente de Ca.

Los últimos hallazgos, muestran la necesidad de actualizar los modelos PAO para incorporar esta característica. Por ello, Acevedo et al. (2014) propusieron la extensión del modelo metabólico PAO desarrollado previamente (Smolders et al., 1994a y b; Murnleitner et al., 1997; López-Vázquez et al., 2009), incluyendo la capacidad de las PAO para cambiar sus rutas metabólicas de acuerdo con la disponibilidad de polifosfato, permitiendo el cambio de PAM a GAM. Para ello, se emplearon las mismas ecuaciones de proceso, pero introduciendo expresiones de tipo Monod, consiguiendo que los parámetros estequiométricos cambien desde coeficientes típicos de PAO a coeficientes típicos de GAO dependiendo del contenido interno de polifosfato (Poly-P). Para la elaboración de dicho

modelo se redujo la concentración interna de Poly-P a diferentes niveles (desde PAO altamente enriquecidas con Poly-P a sistemas ausentes de Poly-P) en un reactor SBR operado para EBPR con objeto de estudiar la evolución de los polímeros internos y la dinámica de la población de PAO y GAO (Acevedo et al., 2012).

Esta actualización del modelo EBPR es una herramienta poderosa para el diseño y ajuste de los sistemas de control. Sin embargo, las predicciones del modelo no están libres de incertidumbre puesto que estos modelos están basados en un número considerable de suposiciones. Por este motivo, la aplicación del modelo requiere la determinación de los valores de los parámetros que representan el rendimiento del proceso específico a simular. Sin embargo, la gran cantidad de dichos parámetros, hace poco factible la calibración experimental de todos (Brun et al., 2002) siendo necesario determinar cuáles son los parámetros más importantes para realizar una adecuada calibración. De esta manera, los parámetros a calibrar serán aquellos que presentan mayor influencia en los resultados del modelo, es decir, son sensibles.

Para ello, el análisis de sensibilidad proporciona información útil para el modelador, siendo herramientas para determinar los parámetros más influyentes de un modelo (Brun et al., 2002; Ruano et al., 2007). Las estrategias de análisis de sensibilidad se clasifican en: Análisis de sensibilidad local y análisis de sensibilidad global (GSA). Las primeras se basan en el efecto local de las entradas sobre las salidas del modelo. En las segundas se aplica un método de muestreo y el rango de incertidumbre en la entrada refleja la incertidumbre en las variables de salida. Estas técnicas evalúan la función de sensibilidad en diferentes puntos en el espacio de parámetros (análisis de Monte Carlo, Fourier Amplitude Sensitivity test (FAST), método Morris). Las estrategias GSA son adecuadas cuando el modelo no es lineal y/o la incertidumbre de las entradas es significativa. Siendo la principal desventaja del empleo de las estrategias de GSA respecto de las locales, el considerable aumento de la demanda computacional (Mannina et al., 2016).

El presente trabajo tiene como objetivo la evaluación del efecto de la cinética y la estequiometría en la modelación del cambio metabólico de los organismos acumuladores de polifosfatos a partir del modelo propuesto por Acevedo et al. (2014), mediante el empleo de dos técnicas de análisis de sensibilidad complementarias que permitirán identificar los factores de mayor influencia sobre las predicciones del modelo, permitiendo determinar la robustez del modelo evaluado.

2. Materiales y Métodos

2.1. Descripción del Modelo matemático implementado

El modelo implementado es el desarrollado por Acevedo et al. (2014) para la modelación matemática de las bacterias responsables de la eliminación biológica del fósforo en el tratamiento de aguas residuales. Dicho modelo plantea la capacidad de cambiar de metabolismo de las PAO en función del contenido interno de Poly-P, permitiendo emplear únicamente glucógeno como fuente de energía y poder reductor en condiciones de bajos contenidos de Poly-P, comportándose como GAO. Todas estas observaciones se traducen en expresiones matemáticas que se adaptan al actual modelo permitiendo modelar el cambio de metabolismo PAO a GAO y empleando las mismas ecuaciones de proceso.

El modelo describe los diferentes procesos efectuadas por PAO: dos procesos anaerobios (captación de acético y mantenimiento anaeróbico), y cuatro procesos aerobios (degradación de Polihidroxialcanoato (PHA), formación de Poly-P), acumulación de glucógeno y mantenimiento aeróbico). Además, se contemplan ocho componentes, los componentes solubles: Oxígeno (S_{O_2}), Fosfato (S_{PO_4}) y Acido acético (S_{HAc}) y los componentes intracelulares de la biomasa activa: Glucógeno (X_{GLY}^{PAO}), Polifosfatos intracelulares (X_{PP}^{PA}) y

Polihidroxicanoatos (X_{PHA}^{PAO}), descrito como una mezcla de diferentes fracciones, tales como Polihidroxibutirato (PHB), Polihidroxivalerato (PHV) y polybetahydroxy-2-metilvalerato (PH2MV). El conjunto de los procesos implicados permitió definir una matriz estequiométrica y un conjunto de expresiones cinéticas siguiendo los estándares empleados en el ámbito del tratamiento de aguas residuales del modelo ASM1 (Henze et al., 2007). El modelo completo con la matriz estequiométrica, las ecuaciones cinéticas y el conjunto de parámetros y coeficientes anaerobios y aerobios, se puede consultar en Acevedo et al. (2014).

2.2. Estrategia de simulación

El modelo utilizado en este trabajo ha sido implementado en el software informático Matlab®. El método empleado para la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales del modelo es el método Runge-Kutta mediante la función ode45 basada en un algoritmo que se desarrolló a partir del método de Euler mejorado.

El modelo fue validado mediante seis experimentos reportados en Acevedo et al. (2012) y Zhou et al. (2008), que representan la posible oscilación en el metabolismo de las PAO. La validación del modelo implementado en Matlab® se llevó a cabo simulando de forma separada las etapas anaerobias y aerobias, con objeto de asegurar la capacidad del modelo para caracterizar cada fase empleando una estimación inicial apropiada del componente polimérico almacenado en cada caso. Las simulaciones dinámicas implicaron el rendimiento de un SBR de 7 litros alimentado con acético. El tiempo de retención hidráulica (HRT) fue de 12 horas y el tiempo de retención celular (SRT) se ajustó a 8 días. La duración de la fase anaerobia y aerobia fue de 1.5 y 3.5 horas, respectivamente.

2.3. Análisis de sensibilidad

Para llevar a cabo los GSA, se seleccionan 54 factores de entrada (parámetros y variables de entrada), que consisten en la caracterización del afluente (la concentración inicial de cada uno de los componentes considerados en el modelo) y un conjunto de parámetros estequiométricos, parámetros y coeficientes cinéticos que componen el modelo desarrollado por Acevedo et al. (2014). El criterio para la selección de estos parámetros es la elección de valores constantes que no dependan a su vez de otros parámetros, para evitar la introducción voluntaria de interacciones en el análisis de sensibilidad.

La caracterización afluente se seleccionó como factor de entrada para evaluar la sensibilidad del modelo en una amplia gama de escenarios operativos del espacio de muestreo de partida que incluye dicha caracterización. La incertidumbre de los factores de entrada se estableció en un 20% de la variabilidad de los valores predeterminados bibliográficos y el valor medio entre el máximo y el mínimo para las concentraciones iniciales. Las incertidumbres se asignaron de acuerdo con una distribución de probabilidad uniforme. Los GSA se realizaron para fase anaerobia y aerobia por separado para caracterizar completamente la sensibilidad e incertidumbre de cada fase del modelo.

Para reducir el coste computacional de los GSA y verificar los resultados obtenidos por comparación de métodos, se evaluaron dos metodologías diferentes de GSA programadas en Matlab®: Método de los coeficientes de regresión estandarizados (SRC) y Método de cribado de Morris, para los cuales se evaluaron los factores de salida, Acético (S_{HAc}) y su eliminación, Fosfato (S_{PO_4}), Glucógeno (X_{Gly}), Polihidroxicanoato (X_{PHA}) y Polifosfato (X_{PP}), para la fase anaerobia y Fosfato (S_{PO_4}) y su eliminación, Glucógeno (X_{Gly}), Bacterias acumuladoras de polifosfato (X_{PAO}) Polihidroxicanoato (X_{PHA}) y Polifosfato (X_{PP}) para la fase aerobia. Los resultados de ambos métodos serán comparados con objeto de obtener los factores más influyentes a la salida del modelo.

2.3.1. Método de los Coeficientes de Regresión Estandarizados (SRC)

El método SRC consiste en una regresión lineal multivariante entre las salidas del modelo y los factores del modelo considerados empleando simulaciones Monte Carlo mediante un muestreo semialeatorio con Latin Hypercube (Helton & Davis, 2003) y permite en el caso de métodos lineales la disminución del coste computacional, frente a otros métodos de GSA, como los basados en la varianza.

La pendiente de regresión estandarizada (SRC o β_i) representa una medida de la sensibilidad válida siempre y cuando el coeficiente de determinación (R^2) sea superior a 0.7, tal y como sugiere Saltelli et al (2005). En el caso de modelos lineales, R^2 , es igual a 1, y el método SRC puede aplicarse para seleccionar factores del modelo influyentes y no influyentes (Mannina et al., 2016). Contrariamente, cuando R^2 es inferior a 1, los factores del modelo interactúan y el método SRC no proporciona información acerca de los factores que interactúan. Permite identificar factores que pueden afectar a la varianza del modelo, permitiendo realizar la descomposición de (y) y (x) mediante el empleo de simulaciones de Monte Carlo.

El signo de β_i indica si el efecto sobre la variación de salida del modelo es positivo o negativo. Los factores seleccionados como importantes son aquellos cuyo valor absoluto es superior a 0.1. Cuanto mayor sea el valor absoluto de β_i , más sensible será la salida a las variaciones de ese factor de entrada. En el caso de comportamientos lineales ($R^2 > 0.7$) el umbral de 0.1 representa que la variación del factor del modelo produce una variación del 1% en la salida del modelo.

Se siguieron criterios basados en estudios previos (Cosenza et al., 2013) para la selección del número de N simulaciones de Monte Carlo, iniciando las simulaciones a partir de 1000 y con aumento del paso de 500 hasta que se logró la convergencia del método. Los criterios de convergencia para reducir al mínimo el tiempo de cálculo fueron: 1) cumplimiento de la hipótesis nula ($H_0: x_i = y_i$) del ensayo de comparación de resultados apareados entre N sucesivos; y 2) estabilidad en el número de factores influyentes ($\beta_i > 0.1$) entre N sucesivas.

2.3.2. Método de Cribado de Morris

El método de Morris (1991) es un método de one-factor-at-a-time (OAT), que obtiene un número dado de matrices representativas de combinaciones de entrada empleando una eficiente estrategia de muestreo aleatoria (Ruano et al., 2007; Pauw et al., 2008). Se aplica la metodología alternativa desarrollada por Ruano et al. (2012), con bajos requerimientos de cálculo y que genera una combinación de trayectorias (r) a partir de un grupo definido de trayectorias Morris iniciales (M) caracterizadas por estar cerca de las diferencias máximas. Si bien dicho procedimiento no garantiza las máximas distancias globales entre las trayectorias seleccionadas, las maximiza localmente, siendo adecuado para sistemas con elevado número de factores de entrada (presente estudio). Se compone de diferentes pasos iterativos donde r se selecciona de un grupo de todas las posibles combinaciones.

Respecto a las medidas de sensibilidad, se emplea la media (μ), la desviación estándar (σ) y la media absoluta (μ^*) de los valores $SE E_i$ de cada F_i (Saltelli et al., 2005). La medida μ^* se utiliza para clasificar y diferenciar los parámetros no influyentes (baja μ^*) de los influyentes (alta μ^*). Se requiere evaluar simultáneamente μ y σ para determinar de forma fiable factores de entrada que afectan a la salida de forma no lineal o interactiva. Para superar este problema, se emplea μ^* para clasificar los factores de entrada, permitiendo identificar sistemáticamente el número óptimo de repeticiones de cálculos de los efectos elementales (r_{opt}) y diferenciar sistemáticamente entre los factores de entrada influyentes (alto μ^*) de los no influyentes (bajo μ^*) (Campolongo et al., 2007).

El número de trayectorias de Morris (r) aumentó desde 10 con un incremento de 10 hasta que se logró la convergencia del método. El criterio de convergencia fue alcanzar la estabilidad en el ranking de factores influyentes entre r sucesivas con una diferencia inferior al 10%, minimizando el error de Tipo II (identificar un factor importante como insignificante). La estabilidad de la clasificación se cuantificó mediante el índice numérico propuesto por Robles et al. (2014). Tras determinar r_{opt} , se emplea el método gráfico de Morris para identificar los factores que influyen en el modelo. Se grafican las de μ y σ para todos los valores de SE_i de cada F_i obtenidos. Además se representan dos líneas gráficamente, correspondientes a $\mu \pm 2SE_i$, donde SE_i es el error estándar de la media que puede calcularse como $SE_i = \sigma_i / \sqrt{r}$. Los factores con bajos valores para μ y σ se consideran menos influyentes o no influyentes, con efectos insignificantes sobre la salida (Morris, 1991).

El método Morris se analiza para los 54 factores antes mencionados (Método Morris con caracterización afluente), y para 43 (Método Morris sin caracterización afluente), con objeto de estudiar si la modificación del espacio de muestreo del que inicialmente se parte puede generar una modificación de los factores influyentes.

3. Resultados y Discusión

3.1. Simulación del Modelo

El modelo propuesto por Acevedo et al. (2014) se aplicó para la simulación de los seis experimentos reportados en Acevedo et al. (2012) y Zhou et al. (2008), abarcando así todo el posible comportamiento metabólico de las PAO. El modelo fue capaz de reproducir satisfactoriamente el funcionamiento de las PAO bajo diferentes escenarios (resultados no mostrados): Desde un metabolismo PAO típico con elevado contenido en Poly-P, pasando por una transición desde metabolismo PAM a GAM hasta un metabolismo GAO típico, en ausencia de Poly-P. Los resultados coinciden con los obtenidos por Acevedo et al (2014). Las ligeras diferencias observadas se deben al distinto método numérico para implementar el modelo (software Aquasim frente a función ode45 Runge-Kutta de Matlab). Esto respalda la transferibilidad del modelo para describir el metabolismo de las PAO en una gama más amplia de situaciones que se encuentran en plantas EBPR (es decir, niveles variables de poly-P). Finalmente, se puede concluir que el modelo es robusto, ya que se logró un óptimo ajuste para los diferentes escenarios propuestos de concentración de poly-P.

3.2. Análisis de sensibilidad: SRC

La aplicación del método SRC de análisis de sensibilidad, se ha desarrollado para 6000 simulaciones de Monte Carlo mediante Latin Hypercube (LHS).

La Tabla 1 muestra los factores influyentes ($\beta_i > 0.1$) identificados mediante SRC para cada salida del modelo analizada para la fase anaerobia y fase aerobia, en la que al menos un factor del modelo aparece como influyente sobre la salida del modelo analizada. Además, muestra los valores de los coeficientes de determinación del modelo lineal (R^2) obtenido por aplicación del método SRC para la simulación seleccionada, tanto para la fase aerobia como anaerobia, estando sombreados cuyos valores son superiores a 0.7, que son los que se considera presentan una linealidad aceptable. Contrariamente, cuando R^2 es bajo (< 0.7), los factores del modelo interactúan y el método SRC no proporciona información acerca de los factores que interactúan. A medida que el valor medio de R^2 es cercano a 0.7 la contribución individual de cada factor de modelo a la varianza total de las salidas de modelo que se tienen en cuenta se pueden calcular por medio de β_i^2 . El alto grado de linealidad se confirma también por el valor de la suma de los cuadrados de los coeficientes de regresión estandarizados ($\sum \beta_i^2$), cuando está próximo a 1. Para la fase anaerobia, los factores X_{PHA} , X_{GLY} y X_{PP} presentan valores de R^2 próximos a 1, y una buena linealidad para S_{PO_4} . Para la fase aerobia, todos los componentes particulados presentan un valor de $R^2 > 0.7$, mostrando

una linealidad próxima a 1 para X_{GLY} , X_{PP} y X_{PAO} , y una linealidad aceptable para X_{PHA} .

De la aplicación de SRC, se obtiene que un 85,2% de los factores (46 de 54) para la fase anaerobia y un 72,2% de los factores (39 de 54) para la fase aerobia, pueden ser fijados dentro de su rango de incertidumbre sin afectar a las variables tenidas en cuenta. Por el contrario un 14,80% (8 de 54) de los factores en fase anaerobia y un 27,8% (15 de 54) de los factores en fase aerobia podrían ser catalogados como influyentes al menos para una variable de salida estudiadas, reduciendo a 8 (fase anaerobia) y 15 (fase aerobia) el número de factores a tener en cuenta para la aplicación del análisis de incertidumbre.

Tabla 1. Factores influyentes sobre las salidas para LHS 6000 (Fase Anaerobia y Aerobia)

		FACTORES INFLUYENTES LHS 6000					
Fase Anaerobia	Factor	β					
		S_{HAC}	S_{PO4}	X_{PHA}	X_{GLY}	X_{PP}	Elim_ S_{HAC}
	R^2	0.333	0.777	0.979	0.881	0.979	0.336
	Y_{PHA}^{PAO}	0.023	-0.002	0.186	0.006	0.001	-0.023
	Y_{GLY}^{PAO}	0.040	-0.001	-0.007	-0.230	0.0002	-0.042
	pH_{out}	0.133	0.480	0.019	-0.141	-0.146	-0.136
	$S_{HAC,0}$	0.200	0.193	0.194	-0.311	-0.059	-0.178
	$X_{PHA,0}$	-0.024	0.009	0.948	-0.007	-0.003	0.022
	$X_{GLY,0}$	-0.214	0.012	0.049	0.606	-0.0036	0.219
	$X_{PP,0}$	-0.465	0.711	-0.083	0.565	0.973	0.472
	$X_{PAO,0}$	0.014	-0.046	0.023	-0.101	0.0139	-0.015
	$\Sigma\beta^2i$	0.330	0.787	0.981	0.871	0.973	0.332
Fase Aerobia	Factor	S_{PO4}	X_{PHA}	X_{GLY}	X_{PP}	X_{PAO}	Elim_ S_{PO4}
	R^2	0.420	0.739	0.928	0.992	0.952	0.475
	$i_{BM,H}^{PAO}$	-0.086	-0.111	0.037	0.009	0.052	0.103
	q_{PHA}^{PAO}	0.147	0.018	-0.181	-0.019	-0.029	-0.151
	q_{GLY}^{PAO}	-0.073	-0.095	0.224	0.010	0.083	0.073
	$K_{S_{PHAaer}}^{GAM}$	-0.106	0.011	0.104	0.014	0.009	0.107
	$K_{S_{PHA,aer}}^{GLY}$	0.041	0.073	-0.178	-0.005	-0.069	-0.041
	$f_{PAO,GLY}^{MAX}$	-0.040	-0.048	0.129	0.006	0.043	0.037
	$S_{O2,0}$	-0.183	-0.313	0.099	0.018	0.133	0.182
	$S_{HAC,0}$	0.145	0.216	-0.053	-0.016	0.011	-0.162
	$S_{PO4,0}$	0.114	-0.116	-0.065	0.281	0.057	0.165
	$X_{PHA,0}$	-0.081	0.473	0.607	0.014	0.264	0.078
	$X_{GLY,0}$	0.090	0.145	-0.015	-0.012	-0.135	-0.098
	$X_{PP,0}$	0.360	-0.084	-0.389	0.953	-0.021	-0.392
	$X_{PAO,0}$	-0.262	-0.071	0.492	0.036	0.909	0.264
	$X_{PHB,0}$	0.256	0.524	-0.089	-0.034	0.063	-0.273
	$X_{PHV,0}$	0.074	0.142	-0.021	-0.010	0.018	-0.078
	$\Sigma\beta^2i$	0.4261	0.752	0.944	0.992	0.970	0.485

Adicionalmente, se estudian los valores de sensibilidad de los factores que cumplen el criterio de linealidad ($R^2 > 0.7$), tanto para fase anaerobia como aerobia, mediante figuras (no mostradas) que muestran los factores influyentes para las salidas del modelo con sus respectivos valores de β_i , su peso en la varianza total (β_i^2) de la variable de salida y el efecto sobre la variación de salida del modelo (signo de β_i).

Del análisis global de todas las variables de salida, se observa que:

- El Método SRC no presenta información acerca de S_{HAC} y Eliminación de S_{HAC} , en fase anaerobia y S_{PO4} y Eliminación de S_{PO4} , en fase aerobia, debido a que presentan valores de R^2 bajos.

- En fase anaerobia, las concentraciones iniciales influyen mucho en las variables de salida del modelo. Además, El pH tuvo un efecto significativo en los resultados del modelo.
- En fase aerobia, las concentraciones iniciales influyen mucho en las variables de salida del modelo, en este caso también tienen gran influencia las variedades de PHA (PHB, Polihidroxiacetato y PHV, Polihidroxiacetato). Además, los parámetros cinéticos q_{PHA}^{PAO} y q_{GLY}^{PAO} y los coeficientes cinéticos $f_{PAO,GLY}^{MAX}$, $K_{S,PHAaer}^{GAM}$ y $K_{PHA,aer}^{GLY}$ tienen un efecto considerable sobre el factor de salida X_{GLY} . Siendo $K_{S,PHAaer}^{GAM}$ y $K_{PHA,aer}^{GLY}$, parámetros incluidos en las expresiones de tipo Monod en las cinéticas para modelar el cambio de metabolismo de PAM a GAM.
- La aplicación de GSA mediante SRC proporciona consejos útiles para la identificación de factores, que una vez evaluados y comparados mediante otro método GSA, puede proporcionar una reducción de la varianza del modelo y, en consecuencia, de la necesidad de nuevas medidas experimentales.

3.3. Análisis de sensibilidad: Método de Cribado de Morris

3.3.1. Método Morris con caracterización afluente

Se aplica la versión revisada del Método de Cribado de Morris para diferentes trayectorias (r) (elegidas entre 1000 (M) trayectorias iniciales). La Tabla 2 muestra el factor de posición ($PF_{r_i \rightarrow r_j}$) para los diferentes números de trayectorias evaluadas en fase anaerobia y aerobia.

Tabla 2. Factor de posición de las diferentes trayectorias para los factores de salida evaluados

FASE ANAEROBIA		$r_i \rightarrow r_j$	10 → 20	20 → 30	30 → 40	40 → 50
Eliminación S_{HAc}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		9.9	2.4	4.2	1.1
S_{HAc}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		6.1	2.9	2.2	0.7
S_{PO4}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		3.9	1.6	2.5	0.3
X_{GLY}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		4.9	11.7	12.6	3.1
X_{PHA}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		2.8	2.3	2.9	0.0
X_{PP}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		4.1	0.8	2.7	0.2
FASE AEROBIA		$r_i \rightarrow r_j$	10 → 20	20 → 30	30 → 40	40 → 50
Eliminación S_{PO4}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		11.1	26.1	4.0	9.8
S_{HAc}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		23.3	11.2	1.9	3.5
S_{PO4}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		15.7	11.4	5.9	4.8
X_{GLY}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		13.3	6.1	2.6	2.3
X_{PAO}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		13.3	9.9	7.2	8.8
X_{PHA}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		15.7	12.7	5.6	3.4
X_{PP}	$PF_{r_i \rightarrow r_j}$		15.1	18.6	4.9	5.1

A medida que se incrementa el número de trayectorias (r), se observa una modificación en las medidas de sensibilidad, hasta que de 40 a 50 trayectorias no presenta cambio significativo en el ranking de los factores del modelo. Para $r_{opt} = 40$, se requirieron 2200 simulaciones para la evaluación del modelo mediante el método de Morris. El coste computacional fue de 33 min (fase aerobia) y 12 min (fase anaerobia) utilizando un PC con procesador de 2.6 GHz Intel®CORE™i7, permitiendo estimar las medidas de sensibilidad adecuadamente a partir de un número de repeticiones admisible. Los resultados sugieren una cobertura adecuada del rango de variación de interés de los factores de entrada, y por tanto, los posibles problemas relacionados con el error tipo I quedan reducidos.

Tras definir la trayectoria óptima, se procede a la evaluación de los factores de salida mediante el método gráfico de Morris (figuras no mostradas). La tabla 3 muestra los valores de la media absoluta para los factores influyentes determinados a partir del método gráfico de Morris, indicando el tipo de influencia que generan sobre el modelo.

Tabla 3. Factores influyentes mediante Método Morris incluyendo caracterización inicial

		FACTORES INFLUYENTES MÉTODO MORRIS					
Fase Anaerobia	Factor	μ^*					
		S_{HAc}	S_{PO4}	X_{PHA}	X_{GLY}	X_{PP}	Elim_ S_{HAc}
	Y_{PHA}^{PAO}			1.176			
	Y_{GLY}^{PAO}				1.466		
	pH_{out}	0.418			0.632	7.044	0.063
	$K_{S,Y PAO PO4}$					0.663	
	$K_{S,Y PAO GLY}$				0.314		
	$q_{s,HAc}^{max}$	0.128	1.203	1.317	0.240	1.173	
	$S_{HAc,0}$	0.450	0.805	1.905	2.021	4.075	0.051
	$S_{PO4,0}$		1.878				
	$X_{PHA,0}$			6.251			
	$X_{GLY,0}$	0.465			2.821		0.082
	$X_{PP,0}$	0.751	5.672	1.839	2.953	19.086	0.097
	$X_{PAO,0}$	0.083	1.296	1.700	0.167	2.553	
Fase Aerobia	Factor	S_{PO4}	X_{PHA}	X_{GLY}	X_{PP}	X_{PAO}	Elim_ S_{PO4}
	pH_{out}	0.221					
	δ	0.422	0.477	0.405	2.403	1.373	0.280
	K_1	0.254	0.763	0.594		1.954	
	$i_{BM,H}$		0.689	0.359		1.016	
	$i_{BM,O}$	0.285	0.614	0.354		0.848	0.076
	q_{PHA}^{PAO}	1.127	0.662	1.539	2.756	1.512	0.164
	q_{GLY}^{PAO}		0.516	0.666		1.009	
	q_{PP}^{PAO}	0.487					
	$K_{S_{PHA}Aer}^{PAM}$			0.258			
	$K_{S_{PHA}Aer}^{GAM}$	0.472		0.725			
	K_{PHA}^{PAO}		0.234	0.841		0.621	0.082
	$K_{GLY}^{PHA,aer}$			0.651	2.872	1.064	0.307
	$f_{PAO,GLY}^{MAX}$	0.399		1.196	3.050	1.202	0.300
	$S_{O2,0}$	1.044	2.742	1.502	2.876	3.692	0.191
	$S_{HAc,0}$	0.297	1.640	0.560	4.535		0.125
	$S_{PO4,0}$	1.187	0.794		38.455	1.094	0.097
	$X_{PHA,0}$	0.577	2.842	1.051	2.641	3.731	0.067
	$X_{GLY,0}$	0.438	0.843	3.213	1.621	1.718	0.080
	$X_{PP,0}$	1.564	0.256	2.031	20.108	0.648	0.270
	$X_{PAO,0}$	2.048	1.707	3.009	5.532	2.707	0.284
	$X_{PHB,0}$	0.355	2.622	0.977	0.129	0.142	0.157
	$X_{PHV,0}$	0.212	0.984	0.334			

Azul: efectos no-lineales o interactivos; Verde: efectos lineales y aditivos

Para la fase anaerobia se observa que:

- Las concentraciones iniciales (CI) afectan de manera significativa sobre cada una de los factores de salida. Todas las concentraciones de salida afectan sobre el factor de salida referido a su componente, pero además lo hace sobre otros factores de salida. Por ejemplo, la presencia de mayor o menor concentración inicial de acético ($S_{HAc,0}$) es un claro efecto de limitación por sustrato que afectará a todos los factores de salida.
- Las CI (a excepción de $X_{PAO,0}$) y pH_{out} (condición ambiental) presentan un factor no lineal o interactivo que significa que afectan tanto al factor de salida como al resto de procesos y el resto de procesos afectan a la variable de salida.
- Además de las CI, presentan elevada sensibilidad $q_{s,HAc}^{max}$ (sobre todas los factores de

salida del modelo) y pH_{out} (a excepción del factor de salida S_{PO_4} y X_{PHA}).

- El parámetro cinético $q_{\text{S,HAC}}^{\text{max}}$ y la $X_{\text{PAO},0}$ presentan efectos lineales y aditivos y pueden ser optimizados.
- 35 factores se identifican como no influyentes con valores de cero para μ y σ no requiriendo calibrar estos factores de entrada en esta aplicación particular del modelo.

Para la fase aerobia se observa que:

- Las CI afectan a todos los factores de salida, pero su efecto es menos marcado que en la fase anaerobia, excepto $S_{\text{PO}_4,0}$ y $X_{\text{PP},0}$ que tienen un efecto muy marcado sobre la variable de salida X_{Gly} .
- Además destacan como factores influyentes $q_{\text{PHA}}^{\text{PAO}}$, $q_{\text{GLY}}^{\text{PAO}}$ y $i_{\text{BM},0}$.
- 4 factores se identifican con valores de cero para μ y σ no requiriendo calibrar estos factores de entrada en esta aplicación particular del modelo.

El elevado número de factores identificados como poco o nada influyentes (42 en fase anaerobia y 32 en fase aerobia) permite establecer valores por defecto basados en algoritmos de optimización. Estos factores que nada o muy poco tienen que ver con la salida del modelo que se está estudiando, están calculados sobre la base de los datos experimentales o de un conjunto de valores por defecto bien conocidos.

3.3.2. Método Morris sin caracterización afluente

Para el estudio del análisis de sensibilidad sin caracterización afluente (sinCI), se selecciona $r_{\text{opt}} = 40$ requiriéndose 1760 simulaciones para la evaluación del modelo con un tiempo de cálculo de 17 min para la aerobia y 9 min para anaerobia. La tabla 4 muestra los resultados de los factores influyentes.

Para la fase anaerobia se observa que:

- La no inclusión de las concentraciones iniciales en el análisis de sensibilidad afecta de manera significativa a las variables de salida del S_{HAC} , S_{PO_4} y X_{PHA} , en las que los factores de entrada $K_{\text{S,GLY}}^{\text{PAM}}$, $K_{\text{S,GLY}}^{\text{GAM}}$ y $K_{\text{S,GLY}}^{\text{PAO}}$, pasan a ser sensibles.
- El factor $q_{\text{S,HAC}}^{\text{max}}$ destaca como más sensible en todos los factores de salida.
- En el caso de los factores de salida X_{Gly} y X_{PP} , los factores seleccionados como sensibles coinciden tanto para el Análisis de Morris incluyendo los componentes iniciales como sin incluirlos.
- 29 factores se identifican como no influyentes con valores de cero para μ y σ , no requiriendo calibrar estos factores de entrada en esta aplicación particular del modelo.

Para la fase aerobia se observa que:

- Los factores sensibles con el Método de Morris en fase aerobia sin tener en cuenta los componentes iniciales guarda mayor grado de coincidencia con el Método Morris en fase aerobia teniendo en cuenta los componentes iniciales que el respectivo análisis en fase anaerobia.
- Para el factor de salida X_{Gly} al final de la fase aerobia, los factores seleccionados como sensibles coinciden tanto para el Análisis de Morris incluyendo los componentes iniciales como sin incluirlos.
- Al no incluir las concentraciones iniciales en el análisis de sensibilidad, se muestran

como sensibles factores como $K_{S,PHAaer}^{PAM}$, $K_{S,PHAaer}^{GAM}$ y $K_{PHA,aer}^{PAO}$.

- 3 factores se identifican como no influyentes con valores de cero para μ y σ .

De los 43 factores de entrada analizados, un número elevado de factores se identifican como poco o nada influyentes (31 en fase anaerobia y 26 en fase aerobia) permitiendo establecer valores por defecto basados en algoritmos de optimización.

Tabla 4. Factores influyentes mediante Método Morris sin incluir la caracterización inicial

		FACTORES INFLUYENTES MÉTODO MORRIS sin CI						
Fase Anaerobia	Factor	μ^*						
		S_{HAc}	S_{PO4}	X_{PHA}	X_{GLY}	X_{PP}	Elim_ S_{HAc}	
Fase Anaerobia	Y_{PHA}^{PAO}			1.208				
	Y_{GLY}^{PAO}	0.007			1.826			
	pH_{out}	0.006	0.480	0.291	0.895	7.717		
	$K_{S,Y PAO PO4}$		0.066			0.696		
	$K_{S,Y PAO PHA}$			0.111				
	$K_{S,Y PAO GLY}$				0.418			
	$q_{s,HAc}^{max}$	0.089	0.0928	1.435	0.279	1.003	0.089	
	m_{ANA}		0.055			0.252		
	$K_{S,HAc}$	0.005					0.005	
	$K_{S,GLY}^{PAM}$	0.008	0.069	0.108				
	$K_{S,GLY}^{GAM}$	0.007	0.056	0.087				
	$K_{S,GLY}^{PAU}$	0.007	0.054	0.083				
	Fase Aerobia	Factor	S_{PO4}	X_{PHA}	X_{GLY}	X_{PP}	X_{PAO}	Elim_ S_{PO4}
		Y_{PHA}^{PAO}		0.140				
δ		0.037	0.055	0.121	0.073	0.882	0.014	
K_1		0.066	0.242	0.247		1.300	0.027	
$i_{BM,H}$		0.089	0.466	0.303		1.071	0.045	
$i_{BM,O}$		$i_{BM,O}$	0.196	0.125		0.440	0.019	
$i_{BM,N}$			0.125			0.282		
m_{ANA}^{PAO}							0.026	
q_{PHA}^{PAO}		0.191	0.188	1.136	0.763	1.421	0.092	
q_{GLY}^{PAO}		0.084	0.429	0.531	0.190	1.275	0.036	
q_{PP}^{PAO}		0.063			2.812			
$K_{S,PHAaer}^{PAM}$			0.032	0.166		0.211	0.013	
$K_{S,PHAaer}^{GAM}$		0.109	0.091	0.663	0.423	0.726	0.054	
K_{PHAaer}^{PAO}		0.086	2.11E-5	0.581	0.385	0.534	0.048	
$K_{S,O2}$							0.014	
$K_{GLY,PHA,aer}^{GLY}$		0.073	0.371	0.514	0.165	1.128	0.033	
$K_{S,PO4}$					0.181			
$f_{PAO,GLY}^{MAX}$		0.097	0.277	0.059	0.390			

Azul: efectos no-lineales o interactivos; Verde: efectos lineales y aditivos

4. Conclusiones

El presente trabajo permite determinar los factores influyentes sobre el modelo de cambio metabólico de los PAO elaborado por Acevedo et al. (2014) a partir de la aplicación de dos métodos de análisis de sensibilidad. El Método SRC no presenta información acerca de S_{HAc} y Eliminación de S_{HAc} (Fase anaerobia) y S_{PO4} y Eliminación de S_{PO4} (Fase aerobia) debido a que presentan valores de R^2 bajos. El método de Morris, basado en trayectorias está más optimizado permitiendo obtener mejores resultados en menor tiempo y costo computacional, evitando la exclusión de factores influyentes, como podría pasar con el método SRC. Al

incluir los componentes iniciales se genera un espacio de muestreo diferente a cuando no se incluyen, por lo tanto, dependiendo de si nuestro objetivo es más local o global, es decir, si desconocemos el comportamiento del modelo, se aconseja la inclusión de los componentes iniciales en el estudio de los factores sensibles al modelo. El hecho de incluir los componentes iniciales, los cuales presentan un elevado peso en la sensibilidad del modelo, puede excluir o enmascarar la sensibilidad de otros factores que representan el cambio de metabolismo PAM-GAM ($K_{S,GLY}^{PAM}$, $K_{S,GLY}^{GAM}$ y $K_{S,GLY}^{PAO}$ y $K_{S,Y_{PHA}}^{PAO}$ en fase anaerobia y $K_{S,PHAaer}^{PAM}$, $K_{S,PHAaer}^{GAM}$ y $K_{S,PHAaer}^{PAO}$ en fase aerobia). Por tanto, se recomienda emplear la combinación del Método Morris incluyendo la caracterización inicial y sin ella para la detección de los factores influyentes, de esta manera, se evita que un parámetro aparezca como no significativo cuando en realidad sí lo es (Error tipo II). Además de los componentes iniciales, destacan como sensibles $q_{S,HAC}^{max}$ y pH_{out} (Fase anaerobia) y q_{PHA}^{PAO} , q_{GLY}^{PAO} , δ , K_1 , $i_{BM,H}$ y $i_{BM,O}$ (Fase aerobia). De la combinación del Método de Morris CI y sin CI se detecta un elevado número de factores de entrada identificados como poco o nada influyentes (36 en fase anaerobia y 27 en fase aerobia), lo que permite establecer valores por defecto basados en algoritmos de optimización o en valores bien conocidos. Los análisis de sensibilidad mediante Morris y SRC mostraron que el modelo es robusto y tiene la capacidad de describir satisfactoriamente el cambio de ruta metabólica PAM-GAM, abarcando así una gama más amplia de condiciones de proceso que se encuentran en las plantas EBPR.

5. Referencias

- Acevedo, B., Oehmen, A., Carvalho, G., Seco, A., Borrás, L., & Barat, R. (2012). Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage. *Water Research*, 46, (6), 1889–1900.
- Acevedo B., Borrás L., Oehmen A., & Barat, R. (2014). Modeling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms. *Water Research*. 65, 235–244.
- Barat, R., Montoya, T., Borrás, L., Seco, A., & Ferrer, J. (2006). Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*, 53, (12), 29–37.
- Barat, R., Montoya, T., Borrás, L., Ferrer, J., & Seco, A. (2008). Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism. *Water Research*, 42, (13), 3415–3424.
- Brun, R., Kühni, M., Siegrist, H., Gujer, W., & Reichert, P. (2002). Practical identifiability of ASM2d parameters—systematic selection and tuning of parameter subsets. *Water Research*, 36, 4113–4127.
- Campolongo, F., Cariboni, J., & Saltelli, A. (2007). An effective screening design for sensitivity analysis of large models, *Environ. Modell. Softw.* 22, 1509–1518.
- Cosenza, A., Mannina, G., Vanrolleghem, P.A., & Neumann, M.B. (2013). Global sensitivity analysis in wastewater applications: A comprehensive comparison of different methods 2013. *Environ. Modell. Softw.*, 49, 40-52.
- Erdal, U.G., Erdal, Z.K., Daigger, G.T., & Randall, C.W. (2008). Is it PAO-GAO competition or metabolic shift in EBPR system? Evidence from an experimental study. *Water science and technology*, 58, (6), 1329–34.
- Helton J.C., & Davis F.J. (2003) Latin hypercube sampling and the propagation of uncertainty in analyses of complex systems. *Reliability Engineering and System Safety*. 81, 23-69
- Henze M, Gujer, W., Mino, T., et al. (2007). Activated sludge models ASM1, ASM2, AMS2d and ASM3. London: IWA Publishing.
- Hu, Z., Wentzel, M.C., & Ekama, G.A. (2007). A general kinetic model for biological nutrient removal activated sludge systems: Model development. *Biotechnology and bioengineering*, 98, 6, 1242–1258.

- López-Vázquez, C.M., Oehmen, A., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J., Yuan, Z., & Loosdrecht, M.C.M. van. (2009). Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature. *Water Research*, 43, (2), 450–462.
- Mannina, G., Cosenza, A., & Viviani, G. (2016). Sensitivity and uncertainty analysis of an integrated membrane bioreactor model. *Desalination and Water Treatment*, 57, 21, 9531-9548.
- Meijer, S.C.F. (2004). Theoretical and practical aspects of modelling activated sludge processes. PhD thesis. Delf University of Technology.
- Morris, M.D. (1991). Factorial sampling plans for preliminary computational experiments, *Technometrics*, 33, 161–174.
- Murnleitner, E., Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. & Heijnen, J. J. (1997). An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal. *Biotechnology and bioengineering*, 54, (5), 534-550.
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z.G., Keller, J., Blackall, L.L., & Reis, M.A.M. (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research*, 41, 11, 2271–2300.
- Pauw, D. De., Steppe, K., & Baets, B. De. (2008). Unravelling the output uncertainty of a tree water flow and storage model using several global sensitivity analysis methods, *Biosys. Eng.*, 101, 87–99.
- Rieger, L., Koch, G., K'uhni, M., Gujer, W., & Siegrist, H. (2001). The EAWAG Bio-P module for activated sludge model No. 3. *Water research*, 35, (16), 3887–3903.
- Robles A., Ruano M.V., Ribes J., Seco A., & Ferrer J. (2014). Global sensitivity analysis of a filtration model for submerged anaerobic membrane bioreactors (AnMBR). *Bioresource Technology*, 158, 365-373.
- Roldán, M., Bouzas, A., Seco, A., Mena, E., Mayor, A., & Barat. R. (2020). An integral approach to sludge handling in a WWTP operated for EBPR aiming phosphorus recovery: Simulation of alternatives, LCA and LCC analyses. *Water Research*, 175, 115647.
- Ruano, M.V., Ribes, J., Pauw, D.J.W. De., & Sin, G. (2007). Parameter subset selection for the dynamic calibration of Activated Sludge Models (ASMs): experience versus systems analysis. *Water Sci. Technol.*, 56, 107–115.
- Ruano, M.V., Ribes, J., Seco, A., & Ferrer, J. (2012). An improved sampling strategy based on trajectory design for the application of Morris method to systems with many input factors, *Environ. Modell. Softw.*, 37, 103–109.
- Saltelli, A., Ratto, M., Tarantola, S., & Campolongo, F. (2005). Sensitivity Analysis for Chemical Models, *Chemical Reviews* 108, 2811–2827.
- Van Dijk, K.C., Peter, J., & Oenema, O. (2016). Phosphorus flows and balances of the European union member states. *Sci. Total Environ.*, 542, 1078-1093.
- Schuler, A.J. & Jenkins, D. (2003). Enhanced Biological Phosphorus Removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, Part II: anaerobic adenosine triphosphate utilization and acetate uptake rates. *Water Environment Research*, 75, (6), 499–511.
- Smolders, G.J.F., Vandermeij, J., Loosdrecht, M.C.M. van., & Heijnen, J.J. (1994a). Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 461–470.
- Smolders, G.J.F., Vandermeij, J., Loosdrecht, M.C.M. van., & Heijnen, J.J. (1994b). Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 837–848.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Huabing, L., & Yuan, Z. (2008). Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)? *Water Research*, 42, 2361–2368.

**Comunicación alineada con los
Objetivos de Desarrollo Sostenible**

