



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



DISEÑO DE UN BIORREACTOR QUE PROMUEVA EL CRECIMIENTO DE LA FLORA Y FAUNA PREDOMINANTE EN LOS OCÉANOS DE LA ZONA SUR DE CHILE PARA EVALUACIÓN DE SISTEMAS ANTIFOULING

Andrés Isaías Sepúlveda Inostroza

Memoria de Título presentada a la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Ingeniero(a) Civil Químico(a)



Profesor(es) Guía
Luis Felipe Montoya Rendón
Profesional Supervisor
Patricio Alfredo Zapata Henríquez

Agosto 2023
Concepción (Chile)

Resumen

El biofouling marino es la colonización de microorganismos (bacterias, arqueas, diatomeas y microalgas) y macroorganismos (algas, percebes, gusanos tunicados, etc.) sobre estructuras, formando una matriz polimérica compleja y que desencadena problemas de corrosión y mayor consumo de combustible en embarcaciones. Los recubrimientos antifouling (AF) son usados para evitar su crecimiento, no obstante, las pruebas "in situ" tienen limitaciones por factores climáticos y ambientales. Este estudio buscó diseñar un biorreactor de biofilm a escala laboratorio para probar cómo los recubrimientos AF afectan la formación de biofouling marino como alternativa a las pruebas "in situ". El presente trabajo se realizó acorde a los objetivos: **(i)** Caracterización biológica de microorganismos y macroorganismos comunes presentes en a nivel nacional (Bio bío) e internacional; **(ii)** Identificación de las de los macronutrientes y parámetros fisicoquímicos de la zona sur de Chile; **(iii)** Planteamiento de dinámica de utilización de sustratos y cambio en la biomasa del biofilm median software AQUASIM; y **(iv)** Selección y diseño de un fotobiorreactor de biofilm que permita describir la dinámica del biofilm marino para la evaluación de recubrimientos AF.

La caracterización biológica de los principales organismos en el biofouling marino a nivel global y nacional (Biobío) revela que en las etapas tempranas del biofilm predominan bacterias particularmente del filo Proteobacteria y Bacteroidetes, vinculadas a procesos corrosivos. También se destaca la presencia de las microalgas y diatomeas de los géneros como *Navicula*, *Nitzschia*, *Pleurosigma* y *Cocconeis*. Estas especies son cruciales en la formación de biofouling, ya que propician la maduración de macroorganismos como algas y percebes, dificultando su remoción. Las simulaciones indican que el comportamiento del biofilm puede ser eficientemente modelado mediante el programa AQUASIM. El biofilm creció de 20 μm a 160 μm , con predominio de organismos heterótrofos en la fase tardía debido a la influencia inhibitoria de la luz y nitrato. Además, se examinó la difusión de sustratos en el biofilm, destacando una mayor difusión de sustratos relacionados con el crecimiento fototrófico en comparación con el crecimiento heterótrofo. Finalmente se realizó una descripción cualitativa de los reactores preseleccionados y sus principales características. Se seleccionó el reactor de tipo flat plate horizontal debido a su versatilidad, facilidad de construcción, control preciso de parámetros, efectiva difusión de sustratos y metabolitos, y una amplia superficie de iluminación. Se identificaron los materiales y equipos requeridos para su construcción, y se realizó los planos y esquemas del reactor seleccionado.

Abstract

Marine biofouling refers to the colonization of microorganisms (bacteria, archaea, diatoms, and microalgae) as well as macroorganisms (such as algae, barnacles, tunicate worms, etc.) on structures, forming a complex polymeric matrix that leads to corrosion issues and increased fuel consumption in vessels. Antifouling (AF) coatings are employed to prevent their growth; however, in-situ testing is constrained by climatic and environmental factors. This study aimed to design a laboratory-scale biofilm bioreactor to assess how AF coatings impact the formation of marine biofouling, offering an alternative to in-situ testing.

This work was conducted in accordance with the following objectives: (i) Biological characterization of common microorganisms and macroorganisms found nationally (Bio Bío) and internationally; (ii) Identification of macronutrient compositions and physicochemical parameters of the southern zone of Chile; (iii) Formulation of substrate utilization dynamics and changes in biofilm biomass through AQUASIM software; and (iv) Selection and design of a biofilm photobioreactor to elucidate marine biofilm dynamics for AF coating assessment.

The biological characterization of key organisms in global and national marine biofouling (Biobío) reveals that in the early stages of biofilm development, bacteria, particularly from the phyla Proteobacteria and Bacteroidetes, are predominant, often associated with corrosive processes. Noteworthy are the presence of microalgae and diatoms of genera such as *Navicula*, *Nitzschia*, *Pleurosigma*, and *Cocconeis*. These species play a pivotal role in biofouling formation, promoting the maturation of macroorganisms like algae and barnacles, impeding their removal. Simulations suggest that biofilm behavior can be effectively modeled using the AQUASIM program. The biofilm grew from 20 μm to 160 μm , with a prevalence of heterotrophic organisms in the later stages due to light and nitrate inhibitory effects. Additionally, substrate diffusion within the biofilm was examined, highlighting greater diffusion of substrates related to phototrophic growth compared to heterotrophic growth.

Finally, a qualitative description of the preselected reactors and their key attributes was carried out. The horizontal flat plate reactor was chosen due to its versatility, ease of construction, precise parameter control, efficient substrate and metabolite diffusion, and extensive illumination surface. The necessary materials and equipment for its construction were identified, and blueprints and schematics of the selected reactor were developed.

Índice de contenido

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS.....	3
2.1.	OBJETIVO GENERAL	3
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	ESTADO DEL ARTE	4
3.1.	BIOFOULING MARINO	4
3.1.1.	Introducción.....	4
3.1.2.	Definición.....	4
3.1.3.	Etapas de Biofouling	6
3.1.4.	Microfouling	9
3.1.5.	Macrofouling	14
3.2.	BIORREACTORES DE BIOFILM	18
3.2.1.	Introducción.....	18
3.2.2.	Modelos de biorreactores de biofilm	19
3.2.3.	Modos de operación	26
3.3.	MODELOS DE BIOFILM.....	26
3.3.1.	Introducción.....	26
3.3.2.	Desarrollo de modelos de biofilm	26
3.4.	PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS	30
3.4.1.	Introducción.....	30
3.4.2.	Temperatura	30
3.4.3.	Salinidad	31
3.4.4.	Radiación lumínica	31
3.4.5.	Gases disueltos	31
3.4.6.	pH.....	33
3.4.7.	Flujo	33
3.4.8.	Nivel de nutrientes	34
4.	METODOLOGÍA	37
4.1.	IDENTIFICACIÓN DE MACRONUTRIENTES Y PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS RELEVANTES EN LA ZONA SUR DE CHILE	37
4.2.	MODELO DINÁMICO DEL BIORREACTOR DEL BIOFILM	37
4.2.1.	Planteamiento.....	38
4.2.2.	Ecuaciones.....	40
4.2.3.	Modelo cinético	41
4.2.4.	Balance de materia en el reactor	43
4.3.	SIMULACIÓN EN AQUASIM 2.0®	44
4.4.	SELECCIÓN DEL BIORREACTOR.....	44

5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1.	PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS ZONA DEL BIOBÍO	45
5.2.	SIMULACIÓN EN AQUASIM 2.0®	45
5.2.1.	Parámetros y condiciones iniciales	45
5.2.2.	Crecimiento de microorganismos	47
5.2.3.	Perfiles de concentración de sustratos en el biofilm.....	48
5.2.4.	Perfiles de concentración de especies en el biofilm.....	50
5.3.	SELECCIÓN Y DISEÑO DEL REACTOR	50
	Criterios de selección.....	53
5.3.1.	Materiales y equipos	54
5.3.2.	Esquema y planos.....	56
6.	CONCLUSIONES	57
7.	BIBLIOGRAFÍA	60
8.	ANEXOS.....	65
	ANEXO 9.1 MODOS DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR	65
	ANEXO 9.3 DETALLE DE ECUACIONES DEL MODELO 1D DEL BIOFILM	67
	ANEXO 9.4 DETALLE DE ECUACIONES CINÉTICAS DEL BIOFILM.....	69
	ANEXO 9.5 FUNCIONAMIENTO DEL PROGRAMA AQUASIM	71
	ANEXO 9.6 PARÁMETROS PARA LA SIMULACIÓN EN AQUASIM.....	77
	ANEXO 9.7 CONDICIONES INICIALES PARA LA SIMULACIÓN EN AQUASIM	78
	ANEXO 9.8 COMPOSICIÓN COMÚN MEDIO DE CULTIVO ORGANISMOS FOTOTRÓFICOS MARINOS [80].....	79
	ANEXO 9.9 PROPIEDADES DE EQUILIBRIO DE GASES DISUELTOS EN AGUA MARINA Y DULCE [80]	80
	ANEXO 9.10 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE REACTORES ANALIZADOS EN ESTADO DEL ARTE	81
	ANEXO 9.11 ANÁLISIS ECONÓMICO	82
	ANEXO 9.12 PLANOS DEL BIORREACTOR	83
	ANEXO 9.13 VISTA ISOMÉTRICA DEL BIORREACTOR	84
	ANEXO 9.14 DIAGRAMA DEL BIORREACTOR.....	85

Índice de Tablas

Tabla 3.1: Campos de comúnmente afectados por biofouling marino en el rubro industrial marítimo y sus principales consecuencias asociadas	5
Tabla 3.2: Composición principal (Bacterias y Archaea) en todas sus etapas de crecimiento sobre superficies metálicas con y sin propiedades AF.....	11
Tabla 3.3: Principales especies de microalgas y cianobacterias presentes en biofouling marino sobre superficies metálicas sumergidas en ambiente marino.....	13
Tabla 3.4: Resultados de muestreo biológico de diatomeas de la zona del Biobío.	14
Tabla 3.5: Principales filos de macroorganismos presentes en el biofilm marino maduro sobre superficies artificiales en el entorno acuático marino.....	15
Tabla 3.6: Principales clases de macroalgas involucradas en el biofilm marino	16
Tabla 3.7: Resultados muestreo de taxones de macrofoulers presentes	17
Tabla 3.8: Clasificación de biorreactores de biofilm.....	19
Tabla 5.1: Parámetros Fisicoquímicos por estación del año	45
Tabla 5.2 Parámetros del periodo de afloramiento en la región del Biobío para el cálculo de concentración de gases.....	46
Tabla 5.3: Ventajas y limitaciones de biorreactores de biofilm analizados	52
Tabla 5.4: Análisis previo de reactores de biofilm preseleccionados y bajo los principales criterios de selección	53
Tabla 5.5: Equipos requeridos y sus características para el biorreactor	54

Índice de Ilustraciones

Ilustración 3.1: Etapas comunes de desarrollo de biofouling marino	7
Ilustración 3.2: Composición de los principales filos bacterianos de una comunidad bacteriana del biofilm marino desarrollado sobre superficie metálica.....	10
Ilustración 3.3: Representación del ciclo de densidad de algas en tres sistemas diferentes: ártico, templado y tropical	12
Ilustración 3.4: Larva cíprida del percebe <i>Balanus amphitrite</i>	16
Ilustración 3.5: Rack de exposición para evaluación de sistemas AF	18
Ilustración 3.6: Reactor de Biofilm Rotatorio Anular	20
Ilustración 3.7: CDC Biofilm Reactor	22
Ilustración 3.8: Contactor biológico rotativo	23
Ilustración 3.9: Reactor de tipo Flat Plate	23
Ilustración 3.10: Reactor de tipo Flat Plate Horizontal (Canal Abierto).....	25
Ilustración 3.11: Secuencia temporal del desarrollo de modelos de biofilm	26
Ilustración 3.12: Relación entre diferentes modelos con respecto a las ecuaciones de balance y su asociación con la complejidad computacional.....	27
Ilustración 3.13: Distribución geográfica de la SST.....	31
Ilustración 3.14: Distribución geográfica de la concentración anual media de nitrato	35
Ilustración 4.1: Esquema de dinámica del biofilm fototrófico-heterotrófico	39
Ilustración 5.1: Curva de crecimiento del biofilm en un periodo de 50 días	47
Ilustración 5.2: Distribución espacial de S1 y S3 en el biofilm para t = 5, 15 y 30 [d]	48
Ilustración 5.3: Distribución espacial de S2 y S4 en el biofilm para t = 5, 15 y 30 [d]	49
Ilustración 5.4: Evolución de concentraciones de especies del biofilm a t = 60 [d].....	50
Ilustración 8.10: Reactor tipo Batch.....	65
Ilustración 8.11: Proceso Fed-Batch.....	66
Ilustración 8.12: Reactor Continuo	66
Ilustración 8.1: Elementos de la estructura del modelo.....	71
Ilustración 8.2: Cuadro de dialogo de selección de variable.....	71
Ilustración 8.3: Cuadro de diálogo de selección de tipo de proceso.....	72
Ilustración 8.4: Cuadro de dialogo de selección de tipo de compartimentos	73
Ilustración 8.5: Cuadro de dialogo de selección de tipo de enlace	74
Ilustración 8.6: Cuadro de dialogo de edición de parámetros numéricos	74
Ilustración 8.7: Menú de cálculo	75
Ilustración 8.8: Menú de Vista de resultados.....	76
Ilustración 8.9: Cuadro de dialogo para edición de definiciones de graficación y resultados gráficos	76

1. Introducción

El biofouling es un fenómeno natural habitual en el entorno marino que resulta de la fijación de materia orgánica, y el subsecuente proceso de colonización de organismos sobre las superficies naturales y artificiales que están en contacto con el medio acuático. El proceso de desarrollo del biofouling marino consta tanto de la acción de microorganismos (microfouling) como la acción de macroorganismos (macrofouling), donde la naturaleza de estos los organismos colonizadores depende de múltiples factores fisicoquímicos y ambientales [1,2].

El proceso de formación del biofouling se da por etapas. En la primera etapa de formación son relevantes las interacciones superficiales (fuerzas hidrofóbicas, electroestáticas y de Van der Waals), las cuales permiten la adhesión de microorganismos primarios que conforman un biofilm constituido principalmente por bacterias, microalgas marinas y diatomeas [3]. Estas últimas son de gran relevancia al ser predominantes en la formación del biofilm debido a la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales forman una matriz extracelular compleja, que permite la adhesión de colonizadores secundarios como Archeas, esporas de algas y larvas de macroorganismos que dan paso al crecimiento y maduración del biofilm [4].

Las consecuencias del desarrollo de biofouling marino están asociadas a industrias como la acuicultura, transporte marítimo, desalinización, industria petrolífera (tuberías de gas y crudo), entre otras. Un estudio realizado por Carvalho en 2018 muestra que el costo estimado por el ensuciamiento de estructuras para la acuicultura (boyas, jaulas de peces y mariscos, etc.) va entre 1,5 a 3 billones de dólares por año a nivel mundial [5]. Algo similar sucede en la industria de desalinización con la formación de biofouling en membranas de osmosis inversa donde se debe destinar entre el 5-30% de los costos operacionales totales para limpieza de las membranas [5].

En el caso de los rubros de transporte marítimo e infraestructura portuaria, una problemática relevante es la corrosión inducida por microorganismos, la cual, si no se maneja correctamente, puede tener consecuencias considerables como fallas en los metales de estructuras y/o equipos [6].

Más en específico, en el transporte marítimo, se genera un aumento de los costos asociado al consumo extra de combustible. Este incremento de los costos se genera por el aumento del peso y fricción debido al desarrollo de biofouling sobre el casco de las naves marítimas. Un estudio realizado por Schultz et. al, en naves marítimas de la Armada de los EE. UU en 2011, estima el aumento de consumo de combustible de estas por presencia de biofouling en hasta en un 20%, alcanzando los 44 millones de dólares extra [7]. Paralelamente genera un gasto adicional asociado al proceso de limpieza y aplicación de recubrimientos antifouling (AF) lo que, según Carvalho, se traduce en un 1.5 al 4% de aumento del costo operacional anual por nave [5].

Los recubrimientos AF se plantean como una forma de prevenir y mitigar el crecimiento de biofouling sobre las superficies metálicas. Sin embargo, en la actualidad muchos tienen efectos adversos para el ecosistema marino o son poco efectivos, lo cual hace necesario el desarrollo de nuevos y novedosos tipos de recubrimientos [8–10]. En la actualidad los métodos comunes de testeo consisten en la utilización de bastidores en los cuales se disponen cupones metálicos y que posteriormente son expuestos directamente al ambiente marino para medir la efectividad de los recubrimientos AF. Sin embargo, en estos métodos existe poco control de parámetros relevantes para el desarrollo de biofouling debido a las condiciones marítimas cambiantes. Estos cambios se han visto acelerados en las últimas décadas debido al fenómeno de cambio climático y contaminación, lo cual se traduce en cambios de pH, temperatura, composición y otros parámetros fisicoquímicos y biológicos del océano. Debido a esto muchos de los estudios pasados sobre cinética de crecimiento de biofilms marinos y eficiencia de los recubrimientos AF han quedado obsoletos [2].

Una solución eficiente a las problemáticas mencionadas sobre los métodos de testeo comunes es el uso de biorreactores de biofilm destinados al desarrollo de biofilms marinos sobre superficies metálicas con recubrimientos AF, el cual permita medir y controlar de manera precisa los parámetros relevantes como el flujo, iluminación y nivel de nutrientes para el desarrollo del biofouling de una manera fácil y asequible.

El objetivo de este estudio es diseñar un biorreactor de biofilm que simule las condiciones marítimas costeras promoviendo el crecimiento de microorganismos para la evaluación de sistemas antifouling. Para tales efectos se realizó una descripción detallada de los principales micro y macroorganismos presentes en comunidades de biofouling a nivel mundial y nacional. Sumado a esto se realizó un estado del arte de las actuales tecnologías asociadas al desarrollo de reactores de biofilm y la identificación de los principales factores y nutrientes asociados al crecimiento del biofilm marino. Posteriormente se desarrolló un modelo matemático que describe el biofilm como un modelo continuo unidimensional, lo que posibilita la descripción de la dinámica de un biofilm mixto de organismos en el contexto del reactor de biofilm. Además, se llevaron a cabo un análisis exhaustivo de las principales alternativas de biorreactores de biofilm para este propósito particular, junto con una descripción de los dispositivos, materiales y características necesarios para el equipo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Diseñar un biorreactor que simule condiciones que promueven el crecimiento de microorganismos y macroorganismos, para la evaluación de sistemas antifouling

2.2. Objetivos específicos

- Determinar y caracterizar las especies predominantes de micro y macroorganismos de la zona costera en el mar y específicamente de la zona sur de Chile.
- Exponer los nutrientes y parámetros asociados al crecimiento de biofouling marino en el mar y específicamente zona costera del sur de Chile.
- Desarrollar el balance de materia de materia del biorreactor de biofilm que maximice el crecimiento de micro y macroorganismos
- Modelar y diseñar un biorreactor que promueva el crecimiento de los microorganismos del sector estudiado con capacidad de evaluar 3 placas de 7 x 15 cm y 2 mm de espesor que contengan recubrimientos AF

3. Estado del arte

3.1. Biofouling marino

3.1.1. Introducción

La presente sección muestra el estado del arte asociado al biofouling marino partiendo por su definición general y principales problemáticas asociadas a campos industriales marítimos. Posteriormente se muestran las etapas identificadas en su desarrollo mediante la transición de estilo de vida sésil a estacionario. Esto nos da pie para identificar las principales especies de microorganismos en etapas tempranas del biofouling, implicadas en las problemáticas como corrosión y desarrollo de biofilm. Sumado a esto se identifican las principales especies de macroorganismos, asociados a la formación de biofouling maduro.

Las especies identificadas se obtuvieron de estudios tanto a nivel nacional como internacional y tienen como objetivo plantear una base hipotética de lo que se puede esperar en estudios prácticos posteriores de identificación de especies en biofilm, asociado al primer objetivo de este estudio.

3.1.2. Definición

Se entiende por biofouling marino a la acumulación de materia biológica indeseada sobre la superficie de estructuras naturales o artificiales que están en contacto con el medio acuático. Este proceso inicia con la adhesión de microorganismos que forman un biofilm, denominado microfouling, y que da paso a la adhesión posterior de macroorganismos, llamado comúnmente macrofouling. El biofouling marino generalmente incluye una combinación de biofilm, macrofouling e incrustaciones inorgánicas [11]. La morfología del biofouling se caracteriza por su grosor, densidad, estructura, composición, fuerza adhesiva y peso de los organismos incrustantes. Debido a que la composición de biofouling va desde microorganismos a macroorganismos, se necesitan variadas técnicas de medición para la caracterización de esta misma [11].

La **Tabla 3.1** muestra ejemplos de campos susceptibles al biofouling y sus principales problemas asociados. Las superficies en contacto de manera prolongada con agua marina son susceptibles a la contaminación por biofouling marino. Tanto en estructuras móviles (barcos) como fijas (equipo de acuicultura, puertos, intercambiadores de calor) el biofouling genera un aumento de peso por la fijación de organismos, el cual se traduce en un desgaste de las estructuras, y en el caso de los barcos, un aumento del consumo de combustible asociado al peso y fricción extra

|

Tabla 3.1: Campos de comúnmente afectados por biofouling marino en el rubro industrial marítimo y sus principales consecuencias asociadas

Tipo	Problema	Referencia
Casco de barco	Incremento de consumo de combustible	[12]
	Pérdida de ingresos por no operación	[13]
	Costo de mano de obra de procesos de limpieza	[14]
	Costo de recubrimientos	[15]
	Corrosion	[16]
Motor de barco	Mayor estrés del motor por mayor arrastre	[13] [17]
Plataformas marinas	Aumento de la carga de la estructura	[13]
	Costo de inspecciones	[16]
Sistemas de intercambio de calor	Contaminación y disminución de eficiencia por inhibición de transporte convectivo	[18] [17]
Equipos de acuicultura (Bayas, redes, paneles, cuerdas, flotadores)	Hundimiento por aumento de peso	[18]
	Perdida de equipos	[19]
	Costos de mantenimiento	
Cultivos de mariscos	Deterioro y daño de los cultivos	[19]
	Competencia biológica por nutrientes y espacio	
Ecosistemas	Daño, modificación de ecosistemas y hábitats	[18]
	Taxones exóticos marinos transportados en cascos de barcos	[20]
		[19]
Procesos ecosistémicos	Daños por competencia con biota nativa	[18]

La rugosidad debido a la presencia de biofouling o revestimientos AF para prevenir el mismo, genera un costo de funcionamiento de la embarcación debido al aumento de la potencia de eje necesaria para alcanzar la velocidad deseada, y subsecuentemente el aumento de consumo de combustible. Un estudio sobre gastos acumulativos para naves de la Armada de los EE. UU publicado el 2011 y que comprende un periodo de 15 años, evidencia el aumento de costo debido al uso de recubrimientos AF (sin presencia de biofouling) de tipo naval traducido a un costo acumulativo extra de USD\$ 3,33 millones por barco, o, en otras palabras, cerca de \$USD 150.000/año por barco. Por otro lado, en el caso de presencia de biofouling, el costo acumulativo asciende valores que van desde los USD\$ 22,7 a \$USD 43,8 millones por barco, dependiendo de la gravedad del ensuciamiento sobre el casco del barco [7], lo cual es equivalente a aumento en el consumo de combustible de entre el 10,3% a 20,4% comparado con un barco sin ensuciamiento ni recubrimiento [7].

Otro problema común es la corrosión inducida por microorganismos presentes en el biofouling. La corrosión ocurre por la presencia de células planctónicas que se adhieren a la superficie. Las superficies sumergidas son rápidamente colonizadas por grupos de microorganismos de múltiples especies. La alta densidad celular presente en los biofilm que crecen sobre superficies metálicas promueve una intensa competencia por nutrientes y recursos, además del cambio de condiciones micro ambientales como gradientes de oxígeno y pH. Esto desemboca en la depredación de recursos y especies, y por consiguiente una estructura estratificada donde las capas más profundas son anóxicas y progresivamente dominadas por especies capaces de utilizar el metal como su fuente de recurso para la supervivencia [16]. Se estima que la corrosión en las zonas costeras es 10 veces mayor que en aguas profundas, con tasas de corrosión que pueden superar 1 mm/año [16].

Para limitar los costos medioambientales y económicos asociados al biofilm, se han desarrollado varios métodos de tratamiento. En el día de hoy las tecnologías AF incluyen técnicas biocidas y no biocidas como superficies antiincrustantes, compuestos AF naturales y sistemas físicos para prevenir este fenómeno [21]. En general los métodos antifouling se pueden dividir en 3 categorías; químicos, físicos y biológicos.

Los métodos químicos involucran el uso de compuestos en pinturas de recubrimiento que inhiben el asentamiento de organismos sobre la superficie. El principal compuesto usado desde la década de los 60 ha sido el tributilo de estaño (TBT) y otros compuestos organoestánicos, como el óxido de tributilestaño (TBTO) y el fluoruro de tributilestaño. Estos inhiben el crecimiento de la mayor parte de los organismos de biofouling a bajas concentraciones y tienen la particularidad de poseer alta resistencia mecánica, y ser estables a la oxidación y la foto degradación[1]. Sin embargo, estos se difunden fácilmente en el agua de mar, son altamente venenosos al no ser específicos a microorganismos perjudiciales, y tienen baja degradación [1]. Debido a esto, el TBT está prohibido en todo el mundo desde el 2008 debido a su alta toxicidad [21]. Otros compuestos se han desarrollado con el paso de las décadas como la tecnología de copolímeros autopulimentalbes (SPC) libre de estaño, pinturas de silicato o capsaicina [8,22].

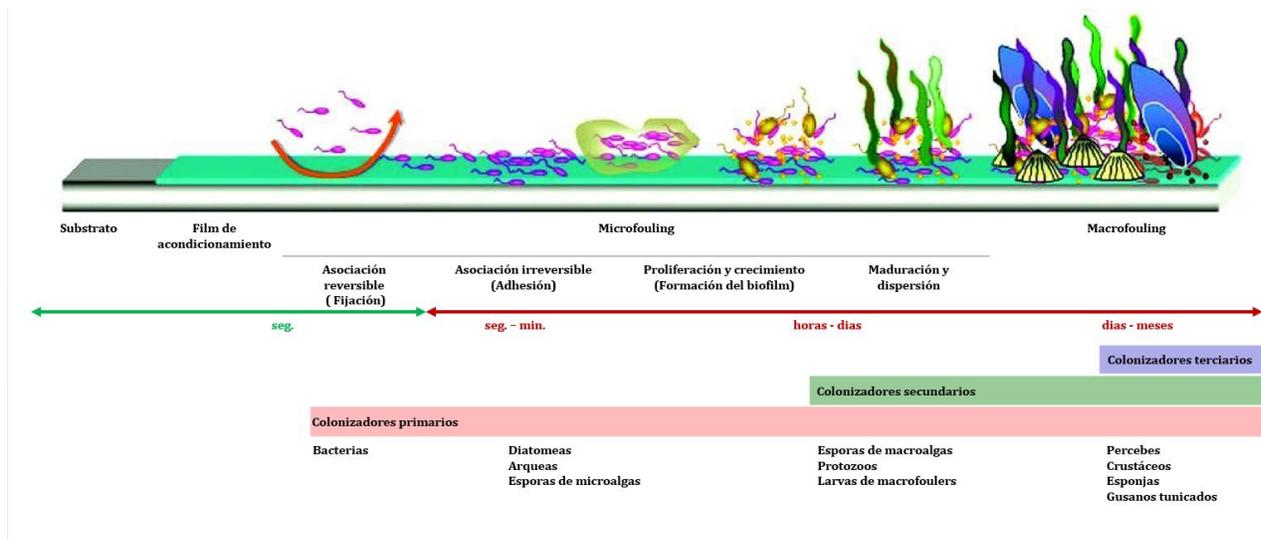
Los métodos biológicos se basan en el uso de enzimas y metabolitos de algunos organismos como algas, hongos, esponjas y algunas bacterias que inhiben el crecimiento de biofouling de manera no toxica ni bioacumulable [22]. Entre estos compuestos se pueden encontrar oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas [22].

Finalmente, los métodos físicos incluyen procesos mecánicos de remoción de las incrustaciones biológicas sobre los cascos, uso de radiación, modificación de las superficies y sus propiedades hidrofóbicas, entre otras [22].

3.1.3. Etapas de Biofouling

En la **Ilustración 3.1** se observa el proceso de desarrollo del biofouling. El proceso de formación del biofouling ocurre cuando los microorganismos hacen la transición de un estilo de vida planctónico libre a un estilo de vida sésil estacionario. Este proceso da paso a la formación de un biofilm mediado por reacciones físicas y bioquímicas [22,23]. Hoy en día, la teoría de formación del biofilm sobre superficies metálicas hace referencia a las siguientes etapas: **(a) formación de film de acondicionamiento; (b) asociación o reversible con la superficie (fijación); (c) asociación irreversible con la superficie (adhesión); (d) proliferación y crecimiento del biofilm; (e) maduración y dispersión; y (f) asentamiento de macrofouling** [3,22]. Las etapas de la (b) a (e) pertenecen a la formación del biofilm.

Ilustración 3.1: Etapas comunes de desarrollo de biofouling marino [24]



(a) Film de acondicionamiento, (b) asociación reversible y (c) asociación irreversible. En primera instancia se forma una capa de acondicionamiento a través de reacciones físicas simples como el movimiento Browniano, interacción electrostática, gravedad, flujo de agua y fuerzas de van der Waals [22]. Este film está compuesto por materiales orgánicos como proteínas, polisacáridos y proteoglicanos sobre la superficie del sustrato [22]. La interfaz de moléculas adsorbidas proporciona una superficie más adecuada para la adhesión de microorganismos propiciando la fijación irreversible de otros tipos de microorganismos y la interacción entre ellas [3,22]. Tanto la formación del film de acondicionamiento como la primera etapa de adhesión (reversible) se han informado en la literatura como la primera etapa de formación de biopelículas al ocurrir casi de manera simultánea. En el agua de mar natural, poblaciones microbiológicas y componentes del film de acondicionamiento se exponen simultáneamente a la superficie, por lo cual estos procesos son casi inmediatos (aprox. 1 minuto) [3].

Un factor microbiológico que influye en fijación de los primeros microorganismos es la secreción de moléculas de adhesión (adhesinas), las cuales son expresadas por casi todas las bacterias, incluyendo las marinas, y permite una adhesión efectiva de estas [3]. Otros factores influyentes son la topografía de la superficie, donde las superficies más rugosas y con mayor área superficial favorecen la fijación inicial y la tolerancia de las bacterias al estrés cortante de las corrientes marinas, además de las propiedades electroquímicas asociadas a la composición de la superficie de adhesión[3].

La premisa de cambio fenotípico entre el estado de fijación reversible y la siguiente etapa catalogada adhesión irreversible es un sistema dependiente de la densidad celular llamado quorum Sensing (QS). Este proceso consiste en que las células son capaces de sentir que es parte de una concentración de células mediante el reconocimiento de compuestos “señal” específicos de bajo peso molecular secretados y acumulados en las células [22]. El QS desempeña funciones importantes en la regulación de interacciones iniciales entre microorganismos y superficies, la adhesión microbiana a la superficie, y el desarrollo del

biofilm [25]. Una vía típica de QS se caracteriza por la producción, liberación y detección de pequeñas moléculas de señal llamadas auto inductores resultando en el comportamiento coordinado de microorganismos una vez que se alcanza una concentración de señal suficiente. Esta tiene como objetivo lograr el beneficio grupal [26].

(d) Proliferación y crecimiento del biofilm. Posterior a la fijación de los microorganismos, es necesario la producción de sustancias poliméricas extracelulares, denominadas EPS, para que estas puedan replicarse con éxito, atraer miembros de nuevas especies y se formen biofilm robustos [3]. En biofilm marinos con presencia de EPS se identifican proteínas, eDNA (ADN extracelular), polisacáridos y otras moléculas orgánicas e inorgánicas que brindan protección a la población microbiana [27]. La configuración molecular de las EPS posee una estructura tridimensional que da lugar a funciones dentro de la matriz, incluyendo la adhesión célula-sustrato y adhesión célula-célula o célula-matriz [3].

Las moléculas que componen los EPS tienen diversas funciones. El eDNA proporciona andamiaje importante para la estructura del biofilm en muchos casos. También estudios indican su función de regulación de la lisis celular. Los exopolisacáridos por otro lado son cadenas de azúcares clave para la formación de la matriz y la maduración de este [3]. También representan una gran reserva de carbono orgánico tanto para comunidades planctónicas como para biofilms y fijación a superficies [28]. Finalmente, las proteínas tienen un papel crítico en la estructura de la EPS y la formación del biofilm, por sus roles estructurales y de distribución espacial [3].

(e) Maduración y dispersión. La maduración del biofilm depende de las condiciones ambientales. Temperatura, salinidad, pH, disponibilidad de nutrientes, entrada de nuevas especies exógenas y la composición de la superficie serán determinantes en la composición del biofilm maduro [16]. Después de la maduración del biofilm, estos dispersan células en el agua para expandir las especies a otros lugares de asentamiento [22]. La dispersión puede considerarse como la característica distintiva de un biofilm maduro. Esto ocurre cuando subpoblaciones de células se separan de la estructura original y colonizan nuevas ubicaciones, siendo este un proceso altamente coordinado [3]. Al igual que las etapas anteriores, la dispersión es un fenómeno que involucra estímulos moleculares y ambientales. Por ejemplo, el ADN extracelular puede inhibir la dispersión e impedir la incorporación de nuevas células a la matriz [29].

(f) Asentamiento de macrofouling. El asentamiento de larvas de macrofoulers inicia desde etapas anteriores, sin embargo, la maduración y el proceso metamórfico está relacionado a un mayor desarrollo del biofouling. Posterior a la colonización de microorganismos y su proceso de maduración, macroorganismos son capaces de unirse a estas superficies [21]. Los efectos más problemáticos del biofouling surgen debido a la colonización de estos macroorganismos [22].

3.1.4. Microfouling

Microfouling. El microfouling es esencial en las etapas iniciales de formación, adhesión y maduración del biofilm. Es posible destacar el predominio de especies procariotas y algunos hongos en la acción corrosiva de superficies metálicas. La distribución de especies capaces de reducir y oxidar hierro alcanza a casi todos los grupos bacterianos, entre, así como una gran parte del superreino *Archaea* [16]. La formación de una comunidad bacteriana inicial de estos microorganismos, en conjunto con especie de microalgas, da paso al desarrollo películas de algas y microorganismos posteriormente[30]. Se han reportado resultados similares en la composición de comunidades bacterianas en 2 superficies distintas, acero inoxidable y policarbonato [31].

En el caso del superreino Bacteria, las más comunes son las Proteobacterias, perteneciente al tipo Gramnegativas. En el caso de éstas últimas, el papel corrosivo de metales está asociado con la producción de ácido y la oxidación del hierro en condiciones aeróbicas y anaeróbicas [16]. Las especies de Proteobacteria se clasifican taxonómicamente en clases α -, β -, δ -, ϵ -, γ -, ζ - *Proteobacteria*, sin embargo, las especies más relacionadas a la oxidación del hierro son las de clase β -*Proteobacteria*, que están compuestas por bacterias litotróficas, oxidantes de hierro, aeróbicas y con una preferencia para crecer en un ambiente ligeramente ácido[16,32]. Otro grupo predominante en la corrosión de superficies metálicas es el grupo δ - *Proteobacteria* en condiciones anaeróbicas, por lo que la acción corrosiva ocurre principalmente bajo reacciones de reducción de hierro, asociada a las especies del género *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfotignum* y *Desulfomonas* reductoras de sulfato [16,32,33]. Por otro lado, el orden Rhodobacterales perteneciente a la clase α - *Proteobacteria* son las más relevantes en cuanto a nivel de abundancia en la colonización de biofilms sobre superficies metálicas [30]. Especialmente en aguas cálidas, son los colonizadores superficiales primarios dominantes, atribuido a su capacidad de reaccionar a un bajo nivel de enriquecimiento de nutrientes [31].

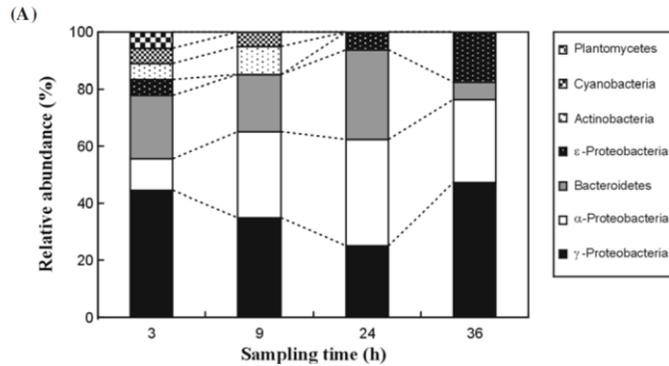
Otros filos comunes de tipo gramnegativa en las etapas iniciales de formación de biofilm en superficies metálicas, pero que sin embargo no hay tenido una implicancia grande en el proceso corrosivo son los filos *Plantomycetotas*, *Pseudomonadota (Laktonella)* y *Cyanobacteria*. Si bien el filo *Cyanobacteria* no clasifica como bacterias Gramnegativas, presentan características similares a estas [32]. También se destaca la presencia de los filos *Acidobacteria* y *Verrumicrobia* [31].

Si bien las especies de bacterias Grampositivas no están comúnmente asociada a procesos corrosivos, se han descrito cepas presentes en biofilms corrosivos. Las especies más representativas de este tipo de bacterias son las pertenecientes a los filos *Actinobacteria*, *Chloroflexy*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* [16,30-32].

Es importante destacar que, en su etapa inicial, la composición de especies no es constante. En la **Ilustración 3.2**, se presenta la variación temporal en un lapso de 36 horas y 4 etapas de la distribución de composición bacteriana del biofilm en su etapa inicial. Se observan 7 filos bacterianos con las γ - *Proteobacteria*, α - *Proteobacterial* y *Bacteroidetes* como los grupos principales, siendo este último el único de tipo Grampositivo [32]. La proporción de α - Proteobacterias incremento de un 11% a 38%,

mientras que la de γ – *Proteobacteria* paso de 44% a 25% en 24 h [32]. *Laktonella* fue el grupo de mayor relevancia en la segunda etapa pasando de un 12% a 18%[32]. Otros miembros de grandes grupos identificados fueron *Arcobacter* (17% a 36h), *Pelagibacter* (15% a 9h), *Alteromonas* (15% a 9h), *Pseudoalteromonas* (10% a 9h) y γ -*Proteobacteria* (22% a 3h) [32].

Ilustración 3.2: Composición de los principales filos bacterianos de una comunidad bacteriana del biofilm marino desarrollado sobre superficie metálica. Los cupones se colocaron en bastidores a 2 m de profundidad a la cubierta de un muelle en Puerto de Sacheon (37°53'N, 128°49'E), ubicado en la costa este de la península de Corea. [32]



Por otro lado, como se mencionaba anteriormente, el reino Archaea es el segundo grupo de microorganismos más importantes en el proceso de corrosión de aleaciones metálicas en ambientes marinos. Los miembros del grupo participantes en procesos corrosivos están incluidos en el filo Euryarchaeota, donde las cepas metanogénicas (generadoras de metano) son las más asociadas con la corrosión de metales en el agua de mar. Fisiológicamente, los metanógenos son anaerobios que generan metano en el proceso de corrosión mientras usan CO_2 como aceptor final de electrones, donde se destacan las especies de órdenes *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, entre otros [16].

Existe una marcada diferencia en la composición entre superficies con recubrimientos sin propiedades AF y con propiedades AF. En el primer caso, la composición bacteriana de las etapas tempranas es casi idénticas, independiente del material de la superficie estudiada (acero, vidrio y policarbonato)[31]. Estas son dominadas principalmente por *Rhodobacterales* (α -*Proteobacteria*) y *Alteromonas* (γ -*Proteobacteria*). También se identificaron otros grupos menores y patógenos de origen humano [20]. Por otro lado, la composición sobre superficies con recubrimientos a base de biocidas está basada en tres filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacterias* (α y γ), pero con una diversidad más baja que los resultados en superficies no AF [31].

En la **tabla 3.2** se resume la composición común de los reinos Bacterias y Archaea, en todas sus etapas de crecimiento en superficies metálicas con propiedades AF y sin propiedades AF.

Tabla 3.2: Composición principal (Bacterias y Archaea) en todas sus etapas de crecimiento sobre superficies metálicas con y sin propiedades AF.

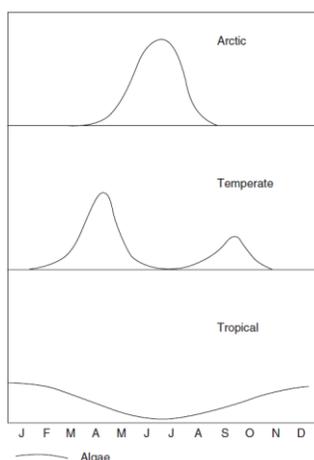
Reino	Filo	Clase	Orden	Genero	Especie	
Bacteria	Proteobacteria	α –		<i>Pelagibacter</i>	<i>P. ubique</i>	
			<i>Rhodobacterales</i>		<i>Roseobacter</i>	
		β –		<i>Leptothrix</i>		
				<i>Gallionella</i>	<i>Gallionella ferruginea</i>	
				<i>Sideroxydans</i>		
		δ –		<i>Desulfovibrio</i>		
				<i>Desulfobacter</i>		
				<i>Desulfotignum</i>		
			ϵ –		<i>Desulforomonas</i>	
		γ –		<i>Arcobacter</i>		
			<i>Mariprofundus</i>	<i>Mariprofundus ferroxydans</i>		
		ζ –		<i>Alteromonas</i>		
				<i>Pseudoalteromonas</i>		
		<i>Planctomycetota</i>				
	<i>Pseudomonadota</i>			<i>Loktanella</i>		
	<i>Acidobacteria</i>					
	<i>Furmicutes</i>	<i>Bacilli</i>		<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus Cereus</i>	
	<i>Bacteriodetes</i>	<i>Falvobacteriia</i>			<i>Bacillus subtilis</i>	
		<i>Sphingobacteriia</i>				
	<i>Actinobacteria</i>					
	<i>Chloflexi</i>					
	<i>Cyanobacteria</i>					
Archaea	<i>Euryarchaeota</i>		<i>Methanobacteriales</i>			
			<i>Methanococcales</i>			
			<i>Methanomicrobiales</i>			
			<i>Methanosarcinales</i>			
			<i>Methanomassiliicoccales</i>			

Otro grupo de gran importancia son las microalgas y diatomeas. En general, las algas tienen una rápida velocidad de crecimiento que les otorga ventaja considerable en la competencia por la colonización de superficies [21].

Los principales factores que afectan la distribución y crecimiento de algas son la luz y la disponibilidad de nutrientes. Las algas al ser organismos fotosintéticos dependen absolutamente de la luz. Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes es un factor clave para la regulación del crecimiento algal. Nitrógeno, carbono y fósforo son esenciales [21]. Otros nutrientes secundarios importantes son el silicio (componente esencial para las diatomeas), hierro, calcio, cobalto, magnesio y manganeso.

En aguas cálidas generalmente la producción de algas es homogénea durante todo el año a lo largo de las zonas tropicales. En aguas más templadas, se observan 2 periodos de flotamiento importante en marzo-abril y septiembre-octubre. El primer flotamiento está dominado por diatomeas, y el segundo por otros grupos de algas propiciado por las condiciones favorables de temperatura y concentración de nutrientes [21]. La disponibilidad de nutrientes asociado con la temperatura influye en los patrones de producción de algas y determina los ciclos de floración en diferentes latitudes (**Ilustración 6.2**) [21].

Ilustración 3.3: Representación del ciclo de densidad de algas en tres sistemas diferentes: ártico, templado y tropical [21]



En el caso de Chile, los periodos de “afloramiento” (SST \sim 12°C, SSS < 33.8) y “No afloramiento” (SST > 13°C, SSS > 34.0) de algas son generalmente entre meses de noviembre-abril y mayo-septiembre respectivamente [34].

Un estudio realizado por Landoulsi et. al (2011) destacan la predominancia de las diatomeas en la formación de biofilms sobre acero inoxidable especialmente cuando la superficie está expuesta a luz [4]. Estas desarrollan una relación mutualista con bacterias en ambientes marinos. Aunque generalmente los biofilms primarios están dominadas por bacterias, la gran acumulación de biomasa en etapas maduras se atribuye a las diatomeas y microalgas [4].

Existe una marcada diferencia entre las comunidades de diatomeas planctónicas y la de biofilms, con diatomeas pennadas dominando en los biofilms y diatomeas céntricas en las columnas de agua [31]. Se destacan las especies en incrustaciones de diatomeas *Pennatea* como *Navicula*, *Nitzschia*, *Cocconeis*, *Licmophora*, *Synedra*, *Amphora*, *Achnanthes*, *Bacillaria*, *Biddulphia*, y los géneros *Centricea* *Fragilaria*, *Grammatophora*, *Rhabdonema* y *Berkelaya* [31]. Sumado a esto, existen diferencias en cuanto a las especies y abundancia de microalgas y diatomeas dependiendo de si la superficie tiene recubrimientos AF o no. En el caso de superficies metálicas con recubrimientos AF la composición de estas es más variables dependiendo de la superficie de adhesión, sin embargo, es dominada por diatomeas (78%), seguido de cianobacterias (19%), flagelados verdes (1%), dinoflagelados (1%), con otros grupos taxonómicos que representan el 1% restante. En el caso con recubrimientos AF se destaca la predominancia del género *Amphora*, seguido de *Achnanthes*, *Amphiprora*, *Navicula* y *Stauroneis* [31]. Las principales especies de microalgas y cianobacterias identificadas se muestran en la **tabla 3.3**.

Tabla 3.3: Principales especies de microalgas y cianobacterias presentes en biofouling marino sobre superficies metálicas sumergidas en ambiente marino [21]

Filo	Subclase	Genero	Especie
<i>Ochrophyta (Diatomea)</i>	<i>Pennatea</i>	<i>Achnanthes</i>	<i>Achnanthes brevipes</i>
			<i>Achnanthes longipes</i>
		<i>Amphiprora</i>	<i>Amphiprora paludosa</i>
		<i>Amphora</i>	<i>Amphora coffeaeformis</i>
		<i>Bacillaria</i>	
		<i>Berkeleya</i>	
		<i>Biddulphia</i>	
			<i>Bleakeleya notata</i>
		<i>Cocconeis</i>	
		<i>Climacosphenia</i>	
		<i>Cylindrotheca</i>	
		<i>Diploneis</i>	
		<i>Fragilaria</i>	
		<i>Grammatophora</i>	
		<i>Licmophora</i>	<i>Licmophora abbreviata</i>
		<i>Licmophora sp.</i>	
	<i>Melosira</i>		
		<i>Manguinea rigida</i>	
		<i>Pleurosigma sp.</i>	
		<i>Striatella unipunctata</i>	
	<i>Centricea</i>	<i>Navicula</i>	<i>Navicula sp.</i>
		<i>Nitzschia</i>	<i>Nitzschia pusilla</i>
		<i>Rhabdonema</i>	
		<i>Stauroneis</i>	
		<i>Synedra</i>	
<i>Cyanobacteria</i>			<i>Oscillatoria sp.</i>
			<i>Phormidium sp.</i>
<i>Chlamydomonas (Flagelados verdes)</i>			
<i>Dinoflagellata</i>			

En cuanto a nivel nacional, en un estudio de caracterización biológica realizado en la zona costera del Biobío, llevado a cabo a 33 km de la costa de concepción entre el periodo de septiembre de 2003 y agosto el 2004 [34], se identificaron los siguientes componentes y se registró su frecuencia de aparición durante el periodo de muestreo: (a) 22 géneros de diatomeas (rango de tamaño: 15-200 μm), principalmente en la fracción micro planctónica; (b) ocho géneros de dinoflagelados (8-60 μm), dos de ellos con algunos componentes en la fracción de nano plancton; (c) cuatro géneros de ciliados y tres tipos no identificados (15-100 μm), y cuatro géneros tintínidos (50-150 μm); y (d) 12 morfotipos flagelados, en su mayoría en el rango de tamaño de Nanoplancton (3-25 μm), pero uno en fracción de microplancton (5-80 μm), clasificados según la forma, el rango de tamaño y el número y posición de los flagelos. Las abundancias integradas para cada fecha se muestran en la **Tabla 3.4**

Tabla 3.4: Resultados de muestreo biológico de diatomeas de la zona del Biobío. (Fuente: [35])

Diatomeas	Taxones		
	Ciliados	Dinoflagelados	Flagelados
Microplancton (25-250 lm)			
Pleurosigma (23)	Ci 1 (8)	Girodinio (100)	Tipo Euglena (10)
Navicula (71)	Ci 2 (6)	Diplospalis (17)	
Pseudo-nitzschia (71)	Ci 3 (10)	Prorocentro (2)	
Caetoceros (88) *	Estrobilidio ((79)	Ceracio (4)	
Talassiosira (88) *	Estrombidio (31)	Gonyaulax (33)	
Thalassiotrix (29) *	Labea (58)	Dinófisis (6)	
Odontella (23) *		Protoperidinio (40)	
Asterionelopsis (40) *	Tintínidos	Gimnodinio (83)	
Esqueletoma (46) *	Helicostomella (33)		
Talasionema (48) *	Daayiella (2)		
Gramórfos (6)	Tintinnidio (4)		
Actinocildo (19)	Codonela (6)		
Detónula (25) *			
Guinardía (38) *			
Cilindroteca (50)			
Coscinodisco (40)			
Eucampía (35) *			
Cerataulina (10) *			
Rizosolenia (10)			
Leptocilindro (27) *			
Coretron (6)			
Laudería (6)			
Nanoplancton (3-25 lm)			Ollicola (15)
Nanodiatomeas (40)	Estrobilidio	Girodinio	Fl 3 (s) 3-5 lm (100)
	Mesodinio (36)	Gimnodinio	Fl 8 (s) 6-11 lm (100)
			Fl 23 (s) 12-15 lm (56)
			Fl 9 (s) 16-25 lm (10)
			Fl 2 (p) 3-5 lm (79)
			Fl 4 (p) 5-15 lm (90)
			Fl 7 (p) 16-20 lm (29)
			Fl 30 (p) apical f (21)
			Fl 5 (e) (56)
			F1, tipo de flor (10)
			Florida, Pyramimonas (50)

Ci, Ciliado; Fl, Flagelado; s, esférico; p, en forma de pera; e, elipsoidal; * formación en cadenas

3.1.5. Macrofouling

Un rasgo común en el asentamiento de macroorganismos es la formación de un biofilm maduro previamente. El estudio realizado por Cao (2011) demostró que el aumento de concentración de diatomeas podría inducir la maduración de larvas de percebes [22], sin embargo, experimentos posteriores han tenido resultados contrarios. El estudio demuestra que, debido principalmente por la competencia de nutrientes y luz, los microorganismos producen metabolitos para repeler larvas de macroorganismos específicos [22]. Sin embargo, los biofilms comúnmente generan una relación mutualista con macroorganismos y parecen aumentar significativamente la fuerza de adhesión de éstos [22]. Por ejemplo, la ascidia *Phallusia nigra*, el gusano tubícola poliqueto *Hydroides elegans*, el serpúlido *Pomatoceros lamarkii*, además de varias especies de mejillones y percebes como *Mytilus edulis* y

Amphibalanus respectivamente, presentaron evidencia de que sus larvas son estimuladas para asentarse y metamorfosearse en presencia de biofilms de EPS, e incluso inhibidas en ausencia de biofilm, como es el caso de *H. elegans* [31].

La **tabla 3.5** resume los principales macroorganismos presentes en el biofouling marino. Existen representantes comunes de los reinos Animalia y Plantae en las comunidades de biofouling marino. Entre los organismos comúnmente encontrados en comunidades macro incrustantes se pueden nombrar especies pertenecientes a grupos de esponjas, hidroides, anemonas, gusanos tubícolas, bivalvos, percebes, briozoos, ascidias y macroalgas [36]. Las clases *Ulva* y *Cirrípedos* (Percebes) se usan comúnmente como representantes de los respectivos reinos para estudios de macrofouling.

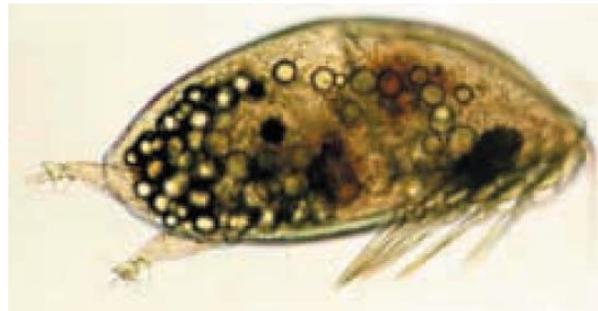
El género *Ulva* es el alga macro incrustante más importante en el proceso de colonización de superficies, la cual sucede mediante la liberación de grandes cantidades de esporas móviles microscópicas [1]. Estas esporas se fijan mediante la secreción de glicoproteínas [22]. La adhesión implica un patrón de comportamiento por parte de la espora nadadora que responde a una variedad de señales fisicoquímicas, como de las bacterias, que pueden guiar a las esporas hacia una superficie adecuada [1]. Una especie relevante de este género es la *Enteromorpha*.

Tabla 3.5: Principales filos de macroorganismos presentes en el biofilm marino maduro sobre superficies artificiales en el entorno acuático marino.

Filo	Especie	Filo	Especie
Arthropoda	<i>Amphibalanus</i>	Cnidaria	<i>Amphisbetia bispinosa</i>
	<i>Balanus amphitrite communis</i>		<i>Ectopleura crocea</i>
	<i>Balanus amphitrite variegates</i>		<i>Ectopleura larynx</i>
Annelida	<i>Boccardia knoxi</i>	Mollusca	<i>Eutima japonica</i>
	<i>Hydroides elegans</i>		<i>Hydractinia angusta</i>
	<i>Polydora hoplura</i>		<i>Obelia bidentata</i>
	<i>Polydora websteri</i>		<i>Tubularia sp.</i>
	<i>Polydora ciliata</i>		<i>Crassostrea sp.</i>
	<i>Polydora vulgaris</i>		<i>Lithophaga sp.</i>
	<i>Pomatoceros lamarkii</i>		<i>Martesia sp.</i>
	<i>Pomatoceros triqueter</i>		<i>Mytilus sp.</i>
Chordata	<i>Botryllus</i>	Turbellaria	<i>Pinctada sp.</i>
	<i>Ciona intestinalis</i>		<i>Pinna sp.</i>
	<i>Dicarpa sp.</i>		<i>Pteria sp.</i>
	<i>Didemnum perlucidum</i>		<i>Saccostrea sp.</i>
	<i>Didemnum sp.</i>		<i>Styela plicata</i>
	<i>Didemnum vexillum</i>	Porifera	<i>Imogine mcgrathi</i>
	<i>Diplosoma sp.</i>		<i>Stylochus sp.</i>
	<i>Mytilus edulis</i>		<i>Stylochus matatsai</i>
	<i>Phallusia nigra</i>		<i>Stylochus frontalis</i>
	<i>Pomatoceros lamarkii</i>		<i>Callyspongia fibrosa</i>
<i>Styela clava</i>		<i>Cliona celata</i>	
		<i>Cliona dissimilis</i>	
		<i>Cliona margaritiferae</i>	
		<i>Cliona orientalis</i>	
		<i>Cliona sp.</i>	
		<i>Cliona vastifica</i>	
		<i>Pione velans</i>	
Fuente: Elaboración propia.			

En el caso de los percebes, el proceso de adhesión es algo diferente. Las larvas de estos nadan libremente en las columnas de agua y necesitan adherirse a la superficie para madurar, Las anténulas de estos se unen mediante la secreción de un “cemento” granuloso que contiene altas concentraciones de proteínas, para luego pasar por una fase de metamorfosis a percebes juveniles y posteriormente de adultos. La **ilustración 3.4** muestra una larva de percebe perteneciente a la subclase de los cirripedos.

Ilustración 3.4: Larva cíprida del percebe *Balanus amphitrite*, donde se aprecian los dos apéndices antenulares por los que la larva “camina” antes de adherirse y metamorfosearse en un percebe adulto [1]



Otros organismos sumamente importantes de las comunidades macro incrustantes son las algas. Las principales macroalgas involucradas en la colonización de superficies artificiales son listadas en la **tabla 3.6** [31,36].

Tabla 3.6: Principales clases de macroalgas involucradas en el biofilm marino (Fuente: [2,31,36])

Clasificación de algas			
Chlorophyta (Algas verdes)	Heterokontophyta	Phaeophyta (algas pardas)	Rhodophyta (Algas rojas)
Bryopsis hipnoides	Dictyota bartayresiana	Desmarestia sp.	Acrochaetium sp.
Bryopsis pennata	Fucus vesiculosus	Ectocarpus sp.	Antithamnion sp.
Caulerpa taxifolia	Laminaria hyperborea	Laminaria sp.	Bangia fuscopurpurea
Chaetomorpha fi brosa	Laminaria rodriguezii	Petalonia fascia	Ceramium rubrum
Chara aspera	Saccharina latissima	Pilayella littoralis	Coralline crustose
Cladophora sp.		Sargassum muticum	Delisea pulchra
Codium fragile		Scytosiphon lomentaria	Furcellaria lumbricalis
Desmidium grevillii		Undaria pinnatifi da	Gracilaria vermiculophylla
Fucus vesiculosus		Vaucheria sp.	Hildenbrandia sp.
Halimeda opuntia			Osmundaria volubilis
Hyalotheca dissiliens			Phyllophoracrispa
Rhizoclonium sp.			Polysiphonia sp.
Siphonales			Porphyrayezoensis
Spondylosium pulchrum			Rhodomela confervoides
Stigeoclonium sp.			
Ulothrix zonata			
Ulva prolifera			
Ulva australis			
Ulva intestinalis			
Ulva lactuca			
Urospora penicilliformis			

En la actualidad, las introducciones biológicas inducidas por el transporte mediado por humanos generan cambios bruscos en la distribución normal de especies, siendo uno de los cambios globales más generalizados [37]. En el ámbito marino, se ha fracasado en los intentos de erradicación de las especies no autóctonas, debido en particular, a la detección tardía, diversos vectores de propagación y alta capacidad de dispersión de estas especies [38].

Esto se puede evidenciar en el estudio a nivel nacional llevado a cabo por Leclerc et. al (2020) a lo largo de 100 km. de la línea costera de la región del Biobío entre marzo 2017 y abril 2019. Un total de 78 taxones, dominados por fauna sésil (68 taxones) fueron identificados en los platos de muestreo. De estos, 13 eran no nativos y 12 criptogénicos [38] Los resultados se muestran en la **Tabla 3.7**.

Tabla 3.7: Resultados muestreo de taxones de macrofoulers presentes

Taxones	Filo	Taxones	Filo
No nativas		Nativas	
Bougainvillia muscus	Cnidaria	Austromegabalanus psittacus	Arthropoda
Bugulina flabellata	Bryozoa	Balanus laevis	Arthropod
Exochella sp. nov.	Bryozoa	Crepipatella fecunda	Mollusca
Mytilus galloprovincialis	Mollusca	Semimytilus algosus	Mollusca
Asterocarpa humilis	Chordata	Pyura chilensis	Chordata
Ciona robusta	Chordata	No asignados	
Diplosoma listerianum	Chordata	Amphipod tubes	Arthropoda
Criptogénicas		Spirorbis sp.	Annelida
Amphisbetia operculata	Cnidaria		
Clytia linearis	Cnidaria		
Coryne eximia	Cnidaria		
Obelia dichotoma	Cnidaria		
Alcyonidioides mytili	Bryozoa		
Amathia cf. gracilis	Bryozoa		
Corella eumyota	Mollusca		

Fuente: [35]

3.2. Biorreactores de biofilm

3.2.1. Introducción.

Existen diversos métodos para evaluar la eficiencia de los recubrimientos antifouling, tanto “in situ” como “ex situ” (escala de laboratorio). El método común de evaluación “in situ” común consiste en la exposición de placas de acero con recubrimientos antifouling montadas sobre un bastidor de PVC (**Ilustración 3.5**). El bastidor debe ser posicionado de tal manera que las mareas se muevan de manera paralela a las caras de las placas las cuales deben estar a una profundidad mínima de 0,3 [m] y máxima de 3 [m]. Estas placas pueden ser expuestas en ciclos estáticos o dinámicos mediante el uso de un motor de accionamiento por un periodo de tiempo específico, generalmente 30 días o más. La metodología está estandarizada internacionalmente y es la forma común de evaluación de recubrimientos antifouling [39,40]. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los resultados de pruebas marinas pueden verse influenciadas por factores ambientales como las condiciones climáticas, temperatura y geografía, lo que resulta en la repetición de pruebas y poca confiabilidad de los resultados [41].

Ilustración 3.5: Rack de exposición para evaluación de sistemas AF (Cortesía de Ignacio Muñoz Rivera)



Otro método “in situ” para estos fines, es el uso de un bioreactor de sistema abierto para el crecimiento de biofouling, el cual consta con un sistema de control de parámetros relevantes, y que posee una conexión directa para el suministro de agua marina y una abertura de vaciado para vaciar manualmente el depósito. Este modelo cuenta con un intercambiador de calor para el control de temperatura; un sistema de iluminación regulable, para variar la intensidad, longitud de onda o los tiempos de la iluminación; y un agitador de paleta para favorecer el movimiento fluido por las superficies de crecimiento de los microorganismos [42]. A diferencia del método anterior, este permite un mayor nivel de control de parámetros relevantes como temperatura e iluminación, sin embargo, es necesaria la cercanía a la fuente de alimentación de agua marina lo que limita la realización de experimentos. Sumado a esto, la composición del flujo de agua marina está expuesto a variaciones fisicoquímicas y biológicas no controlables a la entrada del reactor.

Por otro lado, los ensayos “ex situ” realizados en laboratorios, consisten generalmente en biorreactores que reproducen la formación de biofilms de manera muy similar al equipo mencionado en el párrafo anterior, permitiendo su estudio en diversas áreas de investigación. En la actualidad, estos biorreactores son utilizados para la investigación de los efectos de agentes antimicrobianos sobre un biofilm [8,43], análisis de procesos de corrosión influenciada por la formación de biofilms [16] y estudios para tratamiento de aguas residuales de distinta procedencia [44]. Los reactores de biofilm son una herramienta para generar un biofilm que exhibe cualidades particulares deseadas, mediante la simulación de condiciones ambientales de interés. Esto permite estudiar las características químicas y fisiológicas inherentes [45].

Si bien existe un gran desarrollo de biorreactores de biofilm con las finalidades antes mencionadas, los estudios asociados a desarrollo de biorreactores con el objetivo de simular un entorno marino controlado no han tenido un gran desarrollo en los últimos años, por lo cual, se realizó el estado del arte de los modelos de reactores de biofilm para determinar la mejor opción el modelo del reactor para esta finalidad.

En las últimas décadas se han desarrollado variados sistemas de biofilm, los cuales se pueden clasificar bajo distintos criterios como configuración, modo de operación, material de construcción, función, tipo de cultivo, entre otros.

Se han desarrollado muchos tipos de dispositivos para estudiar biofilms a escala autónoma. En ingeniería, los reactores de biofilm son utilizados ampliamente para tratamiento de aguas y eliminación de contaminantes. Los reactores se pueden clasificar bajo distintos criterios, tales como el modo de alimentación (flujo ascendente, o descendente), configuración (de lecho fijo o lecho móvil) o el tipo de soporte para el crecimiento (superficie lisa sumergida o lechos de relleno). La **tabla 3.8** muestra los principales modelos de biofilm analizados en el presente estudio. Las características y los resultados relevantes del uso de biorreactores de biofilm a escala de laboratorio serán analizados en profundidad en **la sección 4 (estado del arte)**.

Tabla 3.8: Clasificación de biorreactores de biofilm

Configuración	Nomenclatura
Reactor anular rotatorio	RAB
Reactor de biofilm CDC	CBR
Reactor de disco rotatorio	RDR
Reactor de panel plano	FPBR
Reactor de panel plano horizontal	h-FPBR

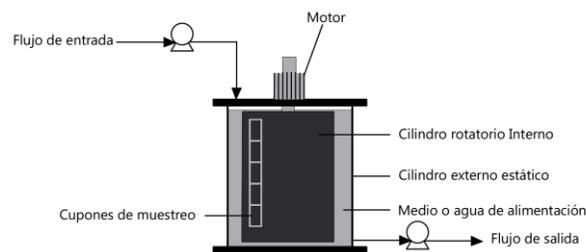
3.2.2. Modelos de biorreactores de biofilm

Los primeros estudios de biorreactores de biofilm surgen en la década de los 60’s con el desarrollo de los reactores anulares rotatorios (RAB). Estos estudios se enfocan en métodos de tratamientos de aguas residuales domésticas y/o industriales [46]. Sumado a esto, se han utilizado para estudiar la velocidad de consumo de sustrato, y características de los biofilm [47,48]. También han sido usados extensamente en evaluación de corrosión inducida por la formación de biofilms bajo condiciones de flujo turbulento [43,49].

Los RAB pueden ser operados como un sistema continuo [49], o en modo Batch inicial con tal de permitir la fijación del biofilm y posteriormente transitar a una configuración continua [46]. Su estructura se compone de un recipiente exterior cilíndrico con otro cilindro interno concéntrico que contiene los cupones de muestreo de biofilms extraíbles en su cara exterior. El cilindro interno tiene la capacidad de ser rotado mediante un motor, el cual permite inducir el mezclado y controlar la velocidad de rotación, otorgando cierto control del esfuerzo cortante sobre el biofilm, simulando el entorno interno de una tubería diferentes velocidades de flujo [47].

El disco externo generalmente tiene un diámetro entre 30 a 116 cm, y una altura entre 125 a 190 cm. Por otro lado, el disco interno puede ir desde 20 a 100 cm de diámetro y entre 25 a 175 cm de altura [48,50]. El volumen de este reactor es variable, dependiendo del estudio, y generalmente varía entre 0,69 L a 4,5 L [48,50]. La configuración de este modelo puede ser visualizada en la **Ilustración 3.6**.

Ilustración 3.6: Reactor de Biofilm Rotatorio Anular [49]



Los materiales más comunes para su fabricación son el cristal [46] o policloruro de vinilo (PVC) [47,48]. Sin embargo, el PVC genera problemas de adhesión de biofilm y el cristal tiene a ser un material delicado para su utilización [47]. Una solución es el uso de Polimetilmetacrilato (PPMA) en el disco interior para evitar este problema [51], o el uso de policarbonato, que tiene mejores resultados en el proceso de adhesión del biofilm [50].

Los valores de parámetros relevantes dentro del reactor dependen de los microorganismos de estudio y las condiciones que se requieren simular. Los parámetros generalmente controlados son **temperatura, pH, oxígeno disuelto, concentración de sustrato, flujo de entrada y velocidad de rotación del disco interno** [46,48,50,51]. El pH generalmente se mantiene entre valores de 6.5 a 7.5, controlado mediante un medidor de pH con un electrodo puesto desde la parte superior en contacto directo con el medio [46,51]. La temperatura usualmente se controla usando un baño térmico y la velocidad de rotación varía entre 100 a 2000 rpm. [50].

La principal ventaja de esta configuración es el control sobre el estrés hidráulico generado en la superficie de los biofilms, además de otorgar un mejor control de la agitación del medio [48]. Sumado a esto, el sistema planteado en el estudio realizado por Capdeville et. al (1990) considera un factor relevante de este modelo la facilidad de muestreo y de medición de valores asociados al biofilm, en especial su densidad [48]. Estos primeros estudios están enfocados en determinar los parámetros influyentes en la

cinética de crecimiento, características y comportamiento de los biofilms. Por otro lado, Capdeville toma los modelos usados por sus predecesores y define 6 fases definidas de crecimiento de los biofilms tomando un modelo de crecimiento nuevo basado en la definición de la biomasa en activada o desactivada, el cual es utilizado en estudios posteriores de modelación de estas. De estos estudios se concluye que la velocidad de crecimiento del biofilm es independiente de la concentración de substrato (oxígeno y fuente de carbono) en el reactor luego de que el biofilm llega a su fase estacionaria de espesor constante, por lo que la velocidad de crecimiento no cambia significativamente ante cambios de concentración de substrato [46,47].

Prototipos más recientes de este tipo de modelo han sido desarrollados a lo largo de las décadas, tales como el desarrollado en el estudio de Paule et. al en 2011, donde se realiza un cultivo de comunidades de biofilms fototrópicos (algas) [51]. Este prototipo presenta características particulares específicas, como una fuente de luz interna modular compuesta de tubos fluorescentes con ciclos de luz/oscuridad protegida por un cilindro hermético al agua [51]. Otra característica relevante es que las placas de muestreo están adheridas a la pared interior del disco externo estacionario del reactor para tener mayor control en el efecto de la fuente lumínica sobre el crecimiento del biofilm. Para tal efecto, una vez por semana se vaciaba el cilindro interno durante 15 minutos para limpiar manualmente la superficie del disco interno con los tubos de luz fluorescente en su interior para asegurar una distribución homogénea de exposición a la luz en el reactor [51]. La finalidad de este modelo es el análisis dinámico del biofilm y análisis de aplicación a nivel industrial. Por otro lado, es recalable la necesidad de realizar estudios con medios de cultivo no selectivos y necesidad de suministro continuo de inóculos de biomasa [51].

Otro modelo bastante utilizado es el Center for Disease Control (CDC) Biofilm Reactor, o más conocido como CBR®. Este reactor consiste en un recipiente de vidrio de 1 L que consta de 8 varillas de polipropileno que soportan los cupones de muestra de biofilm, donde cada una puede portar 3 cupones de 12,7 mm de diámetro cada uno. El modelo cuenta con un puerto de entrada en la parte superior y un puerto de descarga en la parte lateral inferior, por los cuales circula el medio de crecimiento, además de una barra de agitación magnética controlable que genera el cizallamiento requerido sobre el biofilm [52]. Un esquema de este modelo se puede ver la **Ilustración 3.7**.

Este reactor puede ser empleado en diversos usos, tales como la evaluación de biofilms para pretratamiento de agua usadas en plantas de osmosis inversa. En el estudio realizado por Armbruster (2012) se usa este modelo para el desarrollo de un biofilm multiespecie estable y repetible para la evaluación de desinfectantes [53]. Por otro lado, en el estudio de Méndez et. al (2020) evalúa el efecto de la temperatura, medio de cultivo y superficie de crecimiento sobre el desarrollo de un biofilm de múltiples cepas por separado en cada cupón de muestreo [49,53,54].

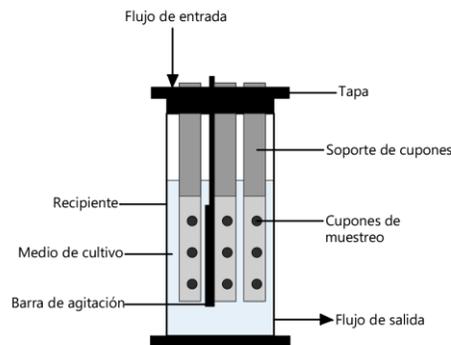
En el estudio realizado por Goeres et. al (2005) utiliza este modelo para la generación de un procedimiento de operación estándar de generación biofilm multiespecies bajo diferentes condiciones de estrés hidráulico, temperatura, velocidad de agitación y concentración de nutrientes del flujo de entrada [43]. El estudio destaca que la implementación del cultivo en modo de operación Batch previo al

experimento en modo continuo, para permitir la fijación y correcta inoculación fue la mejor opción para la correcta generación de los biofilm. Otro factor relevante es que la configuración del biorreactor permite que no haya variaciones altas esfuerzo de corte del fluido sobre la superficie del biofilm entre distintas posiciones de los cupones de muestreo en el reactor.

Otro estudio realizado por Méndez et. al (2020) simula la generación de biofilms en equipos industriales de procesamiento de alimentos, mediante la utilización de cupones de policarbonato y acero inoxidable como superficies de crecimiento. Se estudió el efecto de la temperatura, medio y tipo de superficie sobre la morfología y crecimiento del biofilm multi especie del género *L. monocytogenes* y se demostró que estos factores fueron significativamente relevantes estadísticamente en la formación de biofilm, además de que existe un efecto relevante de la interacción entre temperatura y medio de crecimiento sobre los biofilms [54].

La ventaja de este modelo es que permite tomar muestras de cupones a lo largo del experimento de manera aséptica retirando las varillas de soporte por la parte superior del reactor. Además, el CBR es reutilizable, autoclavables y esterilizable [52]. El modelo CBR proporciona alta repetibilidad bajo cizallamiento constante y con una variedad de microorganismos y cultivos mixtos [45,54].

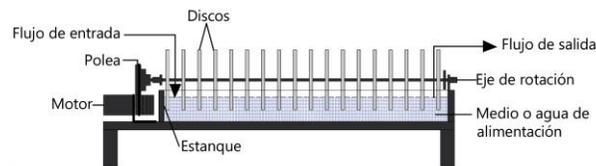
Ilustración 3.7: CDC Biofilm Reactor



Otra alternativa empleada en el tratamiento de aguas residuales es el sistema conocido como contactor biológico rotativo (RBC). Este reactor consiste en un disco o varios discos horizontales contenidos en un tanque y montados sobre un eje, los cuales son rotados mediante un motor. Esta configuración permite que los discos estén parcialmente sumergidos en el medio y que la superficie de estos tenga un contacto alternado entre el medio líquido y el aire, en la cual se adhiere el crecimiento biológico formando el biofilm. Esta configuración tiene como objetivo mantener un buen intercambio de gases y el tratamiento eficiente de aguas residuales [55]. Este modelo también fue desarrollado por Hoehn et. al (1973) para la determinación de parámetros influyentes en el crecimiento de biofilms [56]. Estos estudios respaldan los modelos desarrollados por Kornegay et. al (1968) sobre la disminución de utilización de oxígeno por parte de la biofilm por limitación de difusión interna [46]. Otros estudios utilizan este modelo, tales como Christenson et. al (2012) para el tratamiento de aguas con altas concentraciones de nitrógeno y fósforo

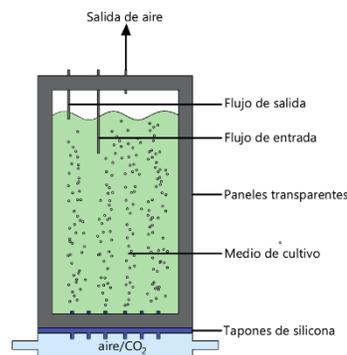
[57]. Este estudio es relevante por la comparación de distintas superficies de crecimiento, donde se destaca el uso de algodón como superficie de crecimiento y la posibilidad de utilización de la biomasa desechada para la generación de biocombustibles. Otro ejemplo es el de Sebestyén et. al (2016), el cual integra una fuente de luz externa para la maximización de los procesos fotosintéticos sobre la superficie del biofilm y la consideración de un sistema de operación continuo para la maximización de producción de biomasa [58]. Un esquema de la configuración de este reactor se puede ver la **Ilustración 3.8**.

Ilustración 3.8: Contactor biológico rotativo



El modelo Flat Plate Bioreactor (FPBR) consiste en placas planas verticales traslucidas, iluminadas por ambos lados y agitadas por aireación (sistema airlift) [59]. Este modelo tiene la ventaja de poseer una gran relación de área superficial/volumen y un paso de luz corto, lo cual otorga un mayor control de la iluminación. Otros criterios claves son la agitación uniforme, la cual puede ser mediante aireación, y una alta superficie de transferencia de interfase de sustratos y metabolitos [60]. Un esquema de este modelo se puede ver en la **Ilustración 3.9**.

Ilustración 3.9: Reactor de tipo Flat Plate



Los estudios asociados a este modelo pueden llevarse a cabo en modos de operación Batch [60] o continua [61–64]. Los materiales comunes de construcción se basan en los requerimientos de iluminación y simplicidad, destacándose el metacrilato (PMMA) o cristal [62]. Las configuraciones de un FPBR son variadas y pueden ser tanto rectangulares (vertical u horizontal) como circulares [60,64].

Existen modelos que utilizan sistemas de bombeo mediante un impulsor, rotor o un sistema de flujo de aire. El diseño más común de PBR es el que emplea de tubos rectos conectados por curvas en U para formar un bucle plano que puede disponerse verticalmente, horizontalmente, inclinado o enrollado en forma cilíndrica o cónica [59].

Una desventaja de la configuración usual es el decaimiento exponencial de la irradiación a medida que aumenta la distancia de la cara iluminada a la fuente de luz, creando zonas con diferentes regímenes de crecimiento en cada una generando efectos de fotoinhibición por exceso o falta de irradiación lumínica [59].

Existen varios estudios de cultivo de biofilm tanto fototrópicos como mixtos. Lin et. al (2003) utiliza este modelo para determinar la cinética de utilización de carbono por un biofilm de microalgas [62]. Otros estudios utilizan bacterias fototrópicas como la *Rhodospseudomonas* sp. para el cultivo de biofilms [60] [63], o bacterias heterotróficas aeróbicas u anaeróbicas [64] como la *Chlorella Sorokiniana* y *Ralstonia basileensis* [61].

En el caso de los cultivos de microalgas o bacterias fototrópicas la iluminación es un factor clave para el desarrollo de los microorganismos por el proceso fotosintético. La densidad de iluminación puede variar según los requerimientos y puede ir desde los 180 a 300 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ [60,61]. Por otro lado, la intensidad de la luz puede ir desde los 4000 lux [61] hasta los 9900 lux [62].

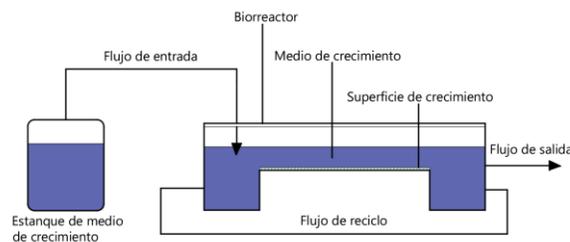
Lin et. al estudia la cinética de utilización de carbono por microalgas. Para modelar la cinética se consideró que existe un transporte de carbono por medio de difusión molecular. Las cepas de microalgas fueron inoculadas en un medio BG11 iluminadas con 5 lámparas fluorescentes de luz blanca de 20 W. Se midió la fijación de carbono utilizando HCO_3^{-1} como sustrato modelo [62]. Das et. al (2018) también estudia la influencia en los patrones de flujo sobre la resistencia interna de transferencia de masa sobre platos de 8.9 x 8.9 cm y 5 cm de espesor en un reactor de 200 ml [60].

También existen modelos matemáticos desarrollados para el estudio de los FPBR. Liao et. al (2012) utiliza un modelo de bidimensional para el estudio de distintos parámetros como iluminación, pH y la inoculación inicial sobre la formación del biofilm y su estructura mediante 3 parámetros de respuesta: porosidad, rugosidad y grosor [63]. El modelo considera que el reactor es alimentado con glucosa (sustrato) el cual entra al biofilm por fenómenos de difusión, donde las bacterias fototrópicas consumen este bajo condiciones de iluminación proveídas por lámparas led. Los resultados demuestran que existe una evidente diferencia en la acumulación de biomasa formados bajo diferentes condiciones de operación. La porosidad decrece durante la formación de biofilm mientras que la rugosidad de la superficie y el espesor alcanzan un valor estable después de un periodo [63].

Una variación de este modelo es el modelo de bioreactor flat plate de canal abierto u horizontal (**Ilustración 3.10**) presentado por un estudio realizado por Lewandowski et. al (2007) [65]. La principal característica de este reactor es que sirve como un “canal” de flujo, el cual esta parcialmente lleno de agua, generalmente fabricado de vidrio, PMMA o PC. Este modelo consta de 2 recipientes, a la entrada y la salida, para el almacenamiento del medio de crecimiento de alimentación y el flujo de salida del reactor respectivamente. Usualmente también se considera una línea de recirculación del flujo de medio líquido en el reactor [65]. Este modelo es particularmente adecuado para cuantificar la relación entre la estructura del biofilm y su actividad [65]. Una función notable es que permite desarrollar biofilm bajo condiciones hidrodinámicas controladas, además de un uso de microsensores y técnicas microscópicas de manera

simple para estudiar y cuantificar la estructura y los gradientes internos del biofilm [65]. Un estudio realizado por Prades et. al (2017) usa estas ventajas para desarrollar un modelo de biorreactor empleando técnicas de modelado hidrodinámico y validando su rendimiento de acuerdo con mediciones experimentales dentro del biofilm usando microsensores de oxígeno disuelto [64]. Para este estudio se utiliza una superficie de crecimiento de biofilm de PMMA de 18 x 3.5 cm y 0,3 cm de ancho. Los resultados demuestran la importancia del comportamiento hidrodinámico en la fase líquida y los fenómenos de transporte en la interfase líquido-biofilm para modelar con precisión el rendimiento de un reactor de biofilm, ya que esta es la principal zona de intercambio de oxígeno y nutrientes [64]. El modelo considera el efecto de los fenómenos de transporte (difusión y advección). Se observó que el flujo horizontal a lo largo del reactor tiene un efecto directo sobre la biomasa y el consumo de sustratos a lo largo del reactor. En todas las mediciones a lo largo del reactor el oxígeno se agotó por completo antes de llegar a la superficie de fijación, siendo las profundidades de penetración de oxígeno en el biofilm de entre 500 y 1500 μm . Además, el grosor de la capa límite de concentración osciló entre 100 y 200 μm .

Ilustración 3.10: Reactor de tipo Flat Plate Horizontal (Canal Abierto)



Existen otros estudios relevantes como el de Ohashi et. al (1996), el cual propone una metodología para evaluar y cuantificar la fuerza de adhesión del biofilm de bacterias desnitrificantes bajo fuerzas de tensión y corte en este modelo [66]. Las dimensiones rectangulares son de 100 cm de largo, 20 cm de ancho y 30 cm de altura. El reactor se mantuvo a 25°C usando calentadores y termostatos. Se pusieron platos hechos de PVC de 5 x 5 cm y 0,6 cm de grosor puestos de manera perpendicular en el reactor para proveer sitios de crecimiento [66]. Los resultados de los experimentos sugieren que en la zona con velocidad de flujo mayor se generó un crecimiento ligeramente mayor en las primeras etapas. Además, la adhesión fue fuertemente afectada por el grado de madurez del biofilm. La fuerza de adhesión determinada por la fuerza de tensión disminuyó abruptamente hasta 1 Pa desde su etapa inicial a la etapa posterior al crecimiento, al igual que la fuerza de corte. Sin embargo, luego de que este maduro, con un retraso de 20 a 30 días en comparación a la disminución de la fuerza de tensión, el desprendimiento del biofilm coincidió con la formación de cavidades, siendo especialmente fuerte cuando el área de cavidades alcanza un nivel de entre 10 a 20% [66].

3.2.3. Modos de operación

Se analizan 3 tipos de modos de operación: Batch, Semi- Batch y Continuo. El detalle de los modos de operación se muestra en el **anexo 9.1**.

3.3. Modelos de biofilm

3.3.1. Introducción

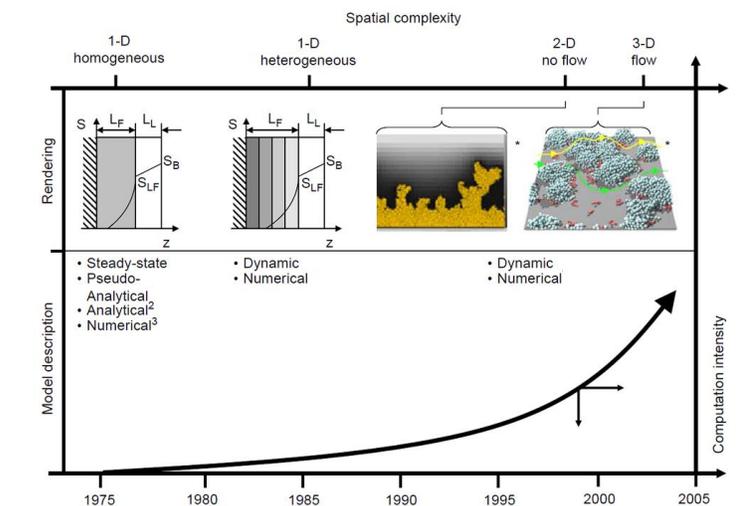
Debido a la complejidad de las interacciones entre especies dentro de una comunidad de biofilm por dado los fenómenos de liberación de EPS creando una red polimérica tridimensional, y respuestas bioquímicas coordinadas, se hace necesario utilizar modelos dinámicos que simulen su crecimiento y utilización de sustratos de manera eficiente. La presente sección tiene como objetivo estudiar estos modelos desarrollado a lo largo de las décadas de investigación para seleccionar el modelo dinámico del biofilm más adecuado para su resolución en el balance de materia del biorreactor.

3.3.2. Desarrollo de modelos de biofilm

Antes del surgimiento de herramientas como el microscopio láser de barrido confocal y las mediciones con electrodos que permitieron una observación detallada, los biofilms se percibían como capas homogéneas de biomasa que podían crecer consumiendo un sustrato desde el medio líquido [67]. Si bien el avance en el estudio y modelación de los biofilm se ha desarrollado bastante, existen obstáculos que deben abordarse, tales como la influencia de factores físicos a macroescala en la composición, proceso de fijación, desprendimiento y el modelo estructural complejo del biofilm.

Los modelos de biofilm se pueden clasificar en cinco principales clases: pseudoanalíticos, analíticos, numéricos unidimensionales, bidimensionales y tridimensionales [68]. La **Figura 3.11** muestra la secuencia temporal del desarrollo de modelos de biofilm a lo largo de las décadas.

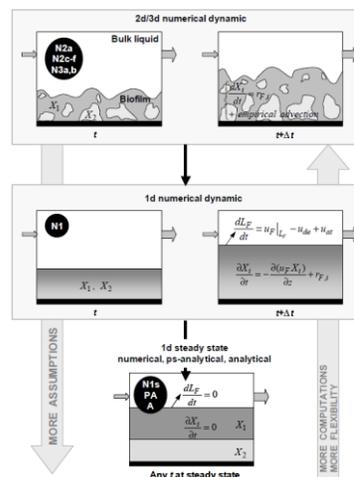
Ilustración 3.11: Secuencia temporal del desarrollo de modelos de biofilm a lo largo de las décadas [68]



Un ejemplo de modelo pseudoanalítico es el utilizado por Williamson et. al (1976), el cual utiliza ecuaciones matemáticas simplificadas para describir el comportamiento de los procesos de formación del biofilm [69]. Sin embargo, este no considera los fenómenos biológicos de colonización, difusión, utilización de sustratos, entre otros fenómenos, lo cual no permite una mayor precisión de la representación del sistema biológico [69]. Estos modelos no han sido aplicados ampliamente para la descripción de reactores de biofilm. Sumadas a estas, las soluciones analíticas a las ecuaciones de difusión-reacción se basan en la suposición de una distribución de biomasa homogénea, siendo el espesor y densidad del biofilm conocido de antemano, es decir, no variables con el tiempo ni espacialmente [68]. Si bien los procesos de difusión y otros procesos bioquímicos son considerados, estos modelos requieren suposiciones simplificadoras que limitan la capacidad de comprensión del sistema. Un ejemplo de modelo analítico es el desarrollado por Chen et. al (2005) para la descripción del proceso de formación de un biofilm en los sistemas de tratamientos de agua [70]. Este modelo considera factores que influyen en la formación y estabilización de biofilm como la dilución, factor de fijación y factor de desprendimiento. Además, plantea de utilización de la superficie de crecimiento mediante una función de probabilidad. López et. al (2015) también ocupa este modelo agregando el análisis de otras cinéticas de crecimiento distintas a la de Monod [71].

Los modelos avanzados de biofilm y modelos multidimensionales se desarrollaron con el paso de los años, los cuales, a medida que aumentaba la capacidad computacional (**Ilustración 4.8**). Por un lado, los modelos multidimensionales requieren un tratamiento numérico y gran potencia informática, mientras que los modelos de 1-D a menudo permiten un análisis matemático simple, pero eficiente en la descripción de los fenómenos bioquímicos del biofilm [67]. Wuertz y Falkentoft (2003) plantean que la utilización de modelos de biofilm de la ingeniería requería de la creación de modelos simplificados pero que sean capaces de capturar los mecanismos fundamentales esenciales teniendo en cuenta la complejidad y diversidad de un biofilm a escala real [72].

Ilustración 3.12: Relación entre diferentes modelos con respecto a las ecuaciones de balance y su asociación con la complejidad computacional [67]



Los modelos unidimensionales (1-D) representan el crecimiento del biofilm en una sola dirección espacial, generalmente siendo la dirección perpendicular a la superficie de crecimiento. Estos representan el cambio de las propiedades, como los gradientes de concentración de sustratos, a través de esta dimensión espacial. Ejemplos de estos son los modelos utilizados por Wanner et. al (1986), Das et. al (2018) y Tenore et. al (2021) [60,73,74]. Wanner presenta un modelo de biofilm multidimensional con múltiples especies entre organismos heterótrofos y autótrofos. Este modelo utiliza la menor cantidad de suposiciones posibles y deriva un modelo dinámico que puede adaptarse a diversas situaciones [73]. Este modelo trata las biomasas como un continuo y se basa en la suposición que todos los cambios de biomasa y compuestos disueltos ocurren en la dirección perpendicular al sustrato. Además, considera la evolución del grosor del biofilm y el proceso de desprendimiento debido a la tasa de muerte y esfuerzo de corte del fluido. Al ser un modelo completamente dinámico, permite estudiar las interacciones microbianas relativamente complejas [73].

Por otro lado, Das et. al (2018) modela un biofilm en un reactor tipo FPBR usando un biofilm bacteriano por la producción de hidrógeno, mediante el uso de *Rhodospseudomonas sp.*, tanto en configuración rectangular y circular. Este modelo considera los procesos de adhesión y proliferación en sus etapas tempranas del desarrollo del biofilm. En este modelo el valor simulado del grosor del biofilm oscila entre 12 y 56 mm, dependiendo de la cantidad de sustrato cargada inicialmente en el reactor Batch [60]. También se observó que hubo una disminución del 64,3% en la producción de hidrógeno en el modelo rectangular en comparación con el circular con la misma área de superficie de crecimiento cubierta por el biofilm [60]. Tenore et. al (2021) retoma el modelo planteado por Wanner mediante un modelo que describe las interacciones microbianas entre un biofilm mixto fototrófico y heterotrófico, considerando fenómenos de crecimiento, decaimiento y colonización de microorganismo, además de la producción, difusión y consumo de sustratos [74]. A diferencia de otros modelos, este considera el efecto de secreción de EPS en la formación del biofilm, el efecto de la luz y la liberación de carbono orgánico por parte de organismos fotótrofos, el cual puede ser utilizado por organismos heterótrofos bajo diferentes condiciones de luz y oxígeno disuelto. Si bien este modelo considera el proceso de atenuación de la luz mediante la ley de Lambert-Beer dentro del reactor, no se considera los ciclos de luz diurna similares a la naturaleza. Sin embargo, este modelo considera un modelo de capa límite de concentración con tal de considerar los efectos de las condiciones hidrodinámicas en el transporte y materia asociada a la difusión de sustrato. Este modelo evidencia que la presencia de organismos pioneros heterotróficos facilita e intensifica el crecimiento fototrófico en el biofilm, demostrando la interacción positiva entre estos tipos de organismos [74,75]. Además, se demuestra que la luz es el factor principal sobre el crecimiento fototrófico y la evolución del ecosistema del biofilm, aumentando el rendimiento fotosintético al acercarse al valor óptimo de intensidad lumínica y aumentando la abundancia heterotrófica [74]. Asimismo, se exhiben el efecto inhibitorio del crecimiento del biofilm para valores superiores al óptimo de intensidad lumínica [74].

Finalmente, los modelos bidimensionales y tridimensionales son los modelos más avanzados y complejos matemáticamente. Los modelos 2-D utilizan generalmente una malla o rejilla para la discretización del espacio. Estos pueden tener en cuenta la difusión de nutrientes y productos de desechos en diferentes zonas del biofilm. Los modelos tridimensionales son los más complejos y realistas, ya que representan el biofilm en sus 3 direcciones espaciales. Para su simulación se utilizan modelos de elementos o volúmenes finitos. Sin embargo, estos modelos son altamente complejos y pueden requerir mucho tiempo de cálculo y recursos de programación. Picioreanu et. al (1999) desarrolla un modelo tridimensional resuelto mediante un algoritmo discreto para la simulación de la formación y el crecimiento del biofilm [76]. Sumado a esto el modelo considera los fenómenos de difusión de sustratos y reacciones bioquímicas en el biofilm. Al igual que Tenore, este modelo considera fenómenos relevantes para el entendimiento del biofilm como la adhesión, disponibilidad de nutrientes, difusión y competencia entre especies. También considera los efectos del esfuerzo de corte sobre la biopelícula sobre la forma y estructura del biofilm. También se observó una distribución heterogénea en los microorganismos, siendo gradualmente menor en las regiones interiores del biofilm. Esto se puede deber a la estructura porosa del biofilm asociada a la secreción de EPS la cual afecta al transporte de nutrientes [76]. Otros ejemplos de modelos tridimensionales son los estudios hechos por Liao et. al (2012) y Jin et. al (2019) [63,77]. Liao et. al se centra en el modelo matemático 2-D para un biofilm fotosintético, además de la caracterización de distribución espacial y estudio dinámico (formación, crecimiento y desprendimiento de biomasa) [63]. Los resultados muestran que hay una diferencia evidente en la acumulación de masa formados bajo diferentes condiciones de luz, flujo y concentración de sustratos [63]. La porosidad del biofilm disminuye durante el proceso de formación del biofilm de bacterias fotosintéticas, mientras que la rugosidad alcanza un valor estable después de cierto tiempo de crecimiento y el espesor aumenta constantemente a medida que pasa el tiempo. La condición optima que se encontró para la iluminación fue de 5000 lux y un valor de pH ~7,0 [63]. Por otro lado, Jin presenta un modelo computacional híbrido para un biofilm bacteriano de 3 fases interactivas: bacterias, EPS y agua, en donde se demostró que el crecimiento del biofilm es sensible al espaciado de poros dentro de la colonia [77]. También se encontró que la presión osmótica es un factor relevante en el espaciado de estos poros, además de estar relacionado con los gradientes de concentración de la EPS, donde los casos con valores bajos de presión osmótica tienden a presentar conglomerados celulares altamente empaquetados, mientras que aquellos con un valor alto de gradiente de presión osmótica tienden a tener células bacterianas más distribuidas [77].

3.4. Parámetros fisicoquímicos

3.4.1. Introducción

La caracterización de las condiciones fisicoquímicas y biológica del ecosistema marino en la zona centro sur de Chile tiene como objetivo desarrollar tecnologías apropiadas para la simulación de condiciones óptimas de crecimiento de los principales organismos de la zona, dada la gran diferencia de condiciones óptimas para cada microorganismo, ciclos de crecimiento, macronutrientes, variaciones estacionales, cambio climático, etc., lo cual **permite extrapolar el uso de este biorreactor de biofilm a otros caso con condiciones fisicoquímicas distintas a la utilizadas en este trabajo**. Esto da respuesta a la problemática mencionada sobre la obsolescencia de estudios “in situ” por el cambio acelerado de las condiciones ambientales marinas asociado al cambio climático y el poco control sobre estas de manera general de facto de las condiciones ambientales en los métodos tradicionales.

Para que la simulación de un entorno marino sea similar a las condiciones reales y generar un biofilm similar al que se podría encontrar en un entorno natural, se deben considerar parámetros como **Temperatura, Salinidad, pH, Radiación lumínica, Oxígeno Disuelto, Nivel de nutrientes y Flujo (esfuerzo de cortante)** [59,78–80].

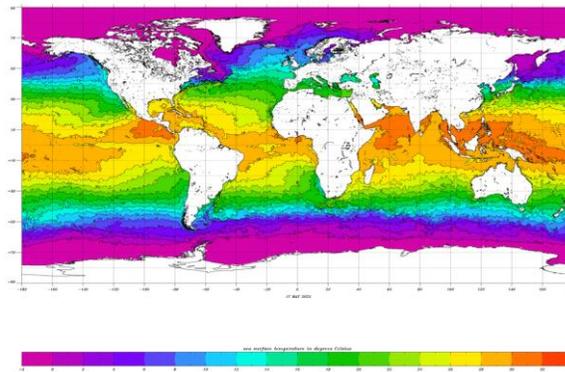
A la par de lo ya mencionado, estudiar estos parámetros “in situ” es una oportunidad de desarrollar estudios entorno la relación entre los microorganismos marinos estudiados y sus condiciones de vida.

3.4.2. Temperatura

La temperatura es un factor importante que afecta el crecimiento celular y por consiguiente su cinética de crecimiento. A medida que aumenta la temperatura hacia la temperatura optima de crecimiento, la tasa de crecimiento también aumenta. Por encima de esa temperatura optima, la tasa de crecimiento disminuye y subsecuentemente sucede una disminución de la biomasa aparente. Esto se debe principalmente la desactivación de enzimas metabólicas altas temperaturas [81].

La **ilustración 3.13** muestra la distribución geográfica de la temperatura superficial del mar (SST) [82]. Los valores comunes de temperatura superficial del mar varían en función de la ubicación geográfica y la época del año. En las latitudes medias las temperaturas varían entre los 10°C en invierno y los 25°C a 30°C en verano. Por otro lado, en las regiones tropicales las temperaturas son más cálidas y suele estar en un rango contante de entre 25°C a 30°C [82]. En las regiones polares las temperaturas pueden ser más extremas, llegando a mínimas bajo los 0°C y con máximas de 10°C en verano.

Ilustración 3.13: Distribución geográfica de la SST [82]



3.4.3. Salinidad

Dependiendo de donde se tomen las muestras de agua y la fecha en la que se toman, la salinidad varía. El rango de salinidad normal del agua de mar varía entre 32 a 35 PSU, costas adentro, mientras que la salinidad en las costas puede ser menor a 30 PSU. La mayor parte de los microorganismos pueden crecer en entornos con una salinidad entre 30 a 35 PSU [83].

3.4.4. Radiación lumínica

El crecimiento de organismos fotosintéticos se limita por el exceso o deficiencia de radiación lumínica (fotoinhibición). Por otro lado, la luz se refracta y refleja cuando pasa a través del medio con un índice de refracción a otro. Por lo tanto, la superficie debe diseñarse con tal de minimizar la reflexión y refracción. Si bien existen sofisticados métodos de suministro de luz, se compensa por su alto costo de implementación.

Las lámparas incandescentes son inferiores a otras lámparas y son pocas usadas para cultivos. En cambio, las lámparas fluorescentes distribuyen la luz de manera más uniforme a lo largo del reactor. Otro tipo usado es las lámparas de descarga de alta intensidad, las cuales emanan desde una fuente puntual, requiriendo mayor distancia entre las lámparas y el cultivo para su dispersión adecuada. Si bien estas últimas son más eficientes energéticamente, las lámparas fluorescentes ofrecen la mejor opción general [83].

En general, las necesidades cualitativas de los organismos fotosintéticos son principalmente determinadas por sus pigmentos fotosintéticamente activos. El espectro de pigmento de algas va del rango de entre 380 a 700 nm. Sin embargo, los organismos son capaces de adaptarse a intensidades de radiación lumínica variada en cortos periodos de tiempo [84].

3.4.5. Gases disueltos

Dos gases son de relevancia para un cultivo marino que involucra organismos fototróficos, el CO_2 disuelto y Oxígeno Disuelto (DO). El oxígeno disuelto (OD) es un sustrato de importancia para la respiración celular, y que puede ser de limitante ya que este está escasamente disuelto en agua. A

concentraciones de microorganismos alta, la velocidad de consumo de oxígeno puede exceder la velocidad de suministro de oxígeno, alcanzando una concentración crítica.

Por otro lado, el CO₂ es vital para organismos fotosintéticos como algas y diatomeas. Estos aprovechan la energía luminosa para catalizar la fijación de CO₂ y la conversión de agua en compuestos orgánicos y oxígeno molecular.

Cuando estos gases son factores de velocidad limitante en estos casos, la velocidad de crecimiento de estos organismos varía por la ecuación de Monod;

$$\mu_i = \mu_{max,x} \frac{S_j}{K_{s,j,i} + S_j} \quad (3.1)$$

Donde μ_x es la velocidad de crecimiento del organismo i , $\mu_{max,i}$ es la velocidad máxima específica de crecimiento, $K_{s,i}$ es la constante de saturación media del sustrato j para la especie i , y S_j es la concentración del sustrato j .

Sobre esta concentración crítica, el crecimiento se vuelve independiente de la concentración DO, donde empieza a depender de otros factores (ej. Amonio, Glucosa, etc.). La concentración de las especies gaseosas disueltas depende de la temperatura y pH del medio. En el caso del oxígeno, la principal especie disuelta es el $O_{2(aq)}$. Por otro lado, las especies de CO₂ disueltas son el carbonato (CO_3^{-2}) y Bicarbonato [Rorrer]. Las ecuaciones algebraicas del sistema de especies de carbono inorgánico en el medio líquido marino permiten determinar las concentraciones de las especies en equilibrio gas-líquido (Lin):



La absorción equilibrada de CO₂ de la fase gaseosa a la fase líquida se describe mediante la ley de Henry

$$P_{CO_2} = H_{CO_2} [CO_2]_{aq} \quad (3.5)$$

Donde P_A es la presión parcial del CO₂ en el gas en contacto con el líquido, $[CO_2]$ es la concentración de CO₂ disuelto en el medio líquido que está en equilibrio con la presión parcial de CO₂ en el gas aireado, y H_{CO_2} es la constante de la ley de Henry. Las subsecuentes expresiones para el CO₂ disuelto en el líquido son:

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]_{aq}} \quad (3.6)$$

$$K_2 = \frac{[CO_3^{-2}][H^+]}{[HCO_3^-]} \quad (3.7)$$

De las expresiones anteriores y de la ley de Henry para la absorción de CO₂, puede demostrarse que las concentraciones de equilibrio redichas de los iones $[HCO_3^-]$ y $[CO_3^{-2}]$ son

$$[HCO_3^-] = 10^{-(+pK_{a,1}-pH)\frac{P_{CO_2}}{H_{CO_2}}}[CO_3^{-2}] \quad (3.8)$$

$$[CO_3^{-2}] = 10^{-(+pK_{a,2}-pH)}[HCO_3^-] \quad (3.9)$$

Finalmente, la concentración total de las especies carbónicas es la suma de todas las concentraciones:

$$C_T = [CO_2]_{aq} + [HCO_3^-] + [CO_3^{-2}] \quad (3.10)$$

Similarmente, la concentración de oxígeno disuelto en el medio puede calcularse como:

$$P_{O_2} = H_{O_2}[O_2]_{aq} \quad (3.11)$$

Donde P_{O_2} es la presión parcial del O₂ gaseoso disuelto en el medio y H_{O_2} es la constante de la ley de Henry para el O₂.

3.4.6. pH

El pH es fundamental para la química del agua de mar, Una disminución del pH puede afectar aspectos como el equilibrio de iones y metales, y su solubilidad. **La variación normal de pH en agua de mar a 35% de salinidad va entre 7.8-8.2**, rara vez decayendo bajo los 7.7 -7.6 en condiciones aerobias [85]. Otros estudios sobre Medios de Cultivo Marinos recomiendan mantener el pH entre 7.0 a 8.5, con un pH típico de agua de mar de 8.2 [83] Por otro lado, la Agencia de Protección Medioambiental de EE. UU. (EPA) indica que actualmente el pH promedio del océano es de 8.1 [86]

3.4.7. Flujo

El flujo de agua continuo es un factor en la formación del biofilm [16]. Las condiciones hidrodinámicas (tasas de flujo, velocidad, esfuerzo cortante) dependen de la geometría de cada reactor[49]. Este puede afectar directamente a la adhesión inicial bacteriana [22]. La velocidad de flujo afecta directamente al desarrollo del biofilm por la interferencia con diversos fenómenos como el transporte de nutrientes,

adhesión bacteriana, crecimiento del biofilm y desprendimiento de estas [49]. Cuando la velocidad de flujo es baja, hay una alta resistencia a la transferencia de masas desde el medio líquido a los microorganismos en la biopelícula. Por otro lado, la alta velocidad de flujo provoca una alta turbulencia del volumen del fluido, lo cual mejora la transferencia de masa, pero genera altas fuerzas de cizallamiento que pueden ser responsable de una mayor erosión y desprendimiento de biopelículas [49].

Biofilms que crecen a bajas velocidades (~ 7.72 cm/s) tienen una baja densidad y alta efectividad de difusión, mientras que los que crecen a altas velocidades (~ 27.78 cm/s) tienen una alta densidad y baja difusión efectiva [31]. Tsai en su investigación sobre el impacto de la velocidad de flujo sobre el comportamiento dinámico del biofilm encontró que la biomasa máxima del biofilm no cambió cuando la velocidad de flujo aumentó de 19,55 cm/s a 39,61 cm/s, pero se afectó significativamente cuando la velocidad se aumentó a más de 59,68 cm/s [87]. Existen evidencias de que también que las comunidades de múltiples especies se ven afectadas por altas fuerzas de cizalle [31]. En cuanto al esfuerzo de corte, existe evidencia de que el aumento del esfuerzo de corte (0,055-0,27 [Pa]) disminuye la composición del biofilm, generando una reducción de la maduración de éste [88].

3.4.8. Nivel de nutrientes

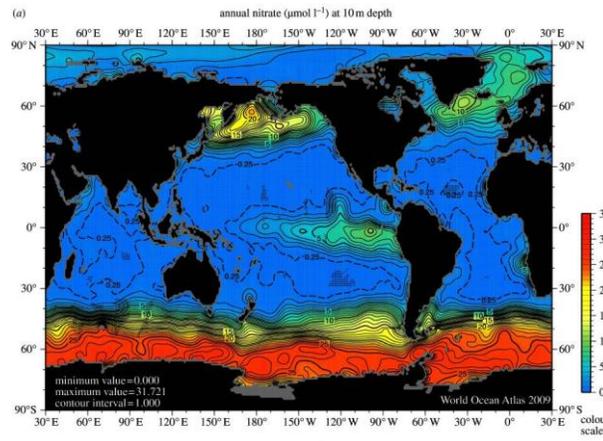
La asociación superficial de microorganismos permite una mayor disponibilidad de macro y micronutrientes al ser “hot spots” para la catálisis microbiana [21]. La disponibilidad de nutrientes es un factor clave en la regulación del crecimiento de algas y bacterias [21]. En el caso de las algas, los macronutrientes generalmente son considerados el nitrógeno, fósforo y silicio. El silicio es requerido en mayor medida por las diatomeas y en menor medida para otras especies. Generalmente estos macronutrientes son requeridos en proporción de 16N:16Si:1P [89]. Otros compuestos en trazas como metales y vitaminas también son requeridos para un correcto crecimiento de los micro y macroorganismos.

(a) Nitrógeno. El nitrógeno, junto al fósforo, son los macronutrientes más importantes en el océano, debido a su importancia en la producción primaria y secundaria, secuestro de carbono y funciones biogeoquímicas [90]. También es un constituyente de aminoácidos, nucleótidos y la clorofila [21]. Generalmente el nitrógeno es el constituyente más limitante para el crecimiento de algas [21]. En el ambiente marino, la quitina es el polisacárido nitrogenado más abundante, y puede ser degradado por muchas especies de bacterias marinas [90].

En el agua de mar, el nitrógeno se presenta principalmente como gas inerte N_2 , siendo más del 95% del total, pero es inaccesible para la mayoría de las especies. El resto del nitrógeno es reactivo, como el nitrato, amoníaco y compuestos orgánicos disueltos [91]. Las concentraciones de las formas reactivas orgánicas se distribuyen de manera uniforme en el océano abierto, pero esta concentración aumenta considerablemente en las zonas costeras con una concentración media de $5,8 \pm 2 \mu\text{mol/l}$ [91]. La **ilustración 3.14** muestra la distribución de concentración anual media de nitrato a una profundidad de 10 [m].

El nitrógeno se agrega al medio en forma de nitrato como $NaNO_3$ [89]. El amonio también puede ser una buena fuente de nitrógeno y puede agregarse como NH_4Cl . Generalmente en el mar con un pH típico, tiene alrededor de un 90% de NH_4 y 10% de NH_3 [89]. En este caso, es ideal agregar el amonio después de la esterilización por autoclave debido a la pérdida por volatilización [89].

Ilustración 3.14: Distribución geográfica de la concentración anual media de nitrato a una profundidad de 10 [m] [91]



(b) Fosforo. El fosforo es esencial para la constitución de ATP, ADP y fosfolípidos [21]. El fosforo se agrega al medio en forma de fosfato como $NaPO_4 \cdot H_2O$ [89]. En algunos medios también se agrega como glicerofosfato de sodio para hacer que las sales de metales en traza sean menos propensas a precipitación.

En aguas marinas, la principal forma en la que está presente el fósforo es como fosfato. La concentración de fosfato ronda los $2 \mu g/L$ en aguas calidas y puede variar entre los 2 a $3 \mu g/L$ en el caso de aguas templadas a frías [92].

(c) Carbono. El carbono es el mayor constituyente celular en todos los micro y macroorganismos. Las especies que dependen del CO_2 como fuente de carbono exhiben una tasa de crecimiento o un rendimiento celular reducidos, por lo cual se puede considerar burbujear con CO_2 en la fase exponencial para garantizar que el carbono no limite el crecimiento de organismos fotosintéticos [89].

(d) Trazas de metales y vitaminas. Los oligoelementos, incluidos los metales (hierro, manganeso, zinc, cobalto, cobre, molibdeno, níquel y cadmio) y el metaloide selenio influyen en el crecimiento de microalgas, macroalgas y cianobacterias debido a sus funciones como micronutrientes limitantes, siendo el hierro el cuantitativamente más importante [89].

Los elementos en traza juegan un papel crítico en procesos metabólicos en cuanto a utilización de recursos esenciales (luz, nitrógeno, fósforo, CO_2), por lo cual los requisitos celulares pueden verse influenciados por la disponibilidad de estos recursos. El hierro es esencial en el transporte fotosintético de electrones y la reducción de algunos compuestos. Asimismo, el manganeso es esencial en los centros de fotosíntesis oxidantes del agua [89].

El zinc es importante para una variedad de funciones metabólicas y en la formación de proteínas. El cobre también es esencial para la formación de proteínas de transporte y el proceso fotosintético. Por otro

lado, el molibdeno y níquel juegan un papel importante en la asimilación de nitrógeno. El molibdeno es esencial para el crecimiento de microalgas y procesos metabólicos [89]

Las trazas de metales se agregan generalmente a partir de una solución madre de alta concentración para permitir el pesaje de cantidades razonables. Estas soluciones pueden consistir en sales de cloruro, o sulfato de zinc, cobalto, manganeso, selenio y níquel, y se mantienen en una solución que contiene el quelante EDTA [89]. El hierro por su parte, generalmente se mantiene como una solución separada y mantenerse en HCL $10^{-2}M$ para evitar precipitación [89].

4. Metodología

4.1. Identificación de macronutrientes y parámetros fisicoquímicos relevantes en la zona sur de Chile

Para la identificación de los valores comunes de macronutrientes y parámetros fisicoquímicos influyentes en la formación del biofouling marino, se obtuvieron datos de **temperatura superficial del agua, pH, salinidad y oxígeno** disuelto de la zona costera del Biobío desde la fuente de datos proporcionada por una boya meteorológica ubicada en (-36° 24'0" S -72° 54'0" W), del Centro de Datos Oceanográficos y Meteorológicos (CDOM) de la Universidad de Concepción. Los datos fueron recogidos en el periodo que comprende mayo de 2019 y abril del 2020. Los datos se dividieron en 2 periodos basados en los ciclos de afloramiento de algas. Los periodos de “no afloramiento” y “afloramiento” comprenden los periodos de mayo-octubre y noviembre-abril respectivamente [34]. El tratamiento estadístico se realizó mediante el programa *Statgraphics 19*[®] para la obtención de parámetros estadísticos de **promedio, desviación estándar y rango** de los 3 parámetros analizados.

4.2. Modelo dinámico del biorreactor del biofilm

Para lograr modelar la cinética de un biorreactor de biofilm marino, se debe lograr simular la dinámica de crecimiento del biofilm y como éste interacciona con el medio del reactor. Los biofilms son una forma de ecosistema microbiano constituido por acumulación de microorganismos, asociados a una superficie o interfase e incrustado en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares de producción propia [93]. Esta matriz protege a las células de medios externos de limpieza, favorece la comunicación bioquímica (QS) entre las especies, y ofrece resistencia a biocidas o antimicrobianos. Casi todas las comunidades de biofilms en la naturaleza comprenden una variedad de microorganismos embebidos en una matriz extra polimérica, funcionando como un consorcio cooperativo coordinado [93]. La complejidad de estos modelos y de las variables ambientales involucradas hacen necesario desarrollar modelos teóricos representativos del medio marino real, lo cual nos permite entender su funcionamiento y fenómenos asociados.

Con la finalidad de lograr una simulación lo más similar a al ambiente marino real, se considera un modelo de microorganismos marinos representativos. Se tiene en cuenta los procesos de utilización de sustratos, crecimiento, muerte por parte de organismos sésiles en el sistema

En base a esto, se desarrollará un modelo teórico que describa los balances de materia del biorreactor de biofilm y la dinámica de crecimiento y utilización de sustratos de los microorganismos mediante un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias y parciales respectivamente. Los sistemas de ecuaciones consideraran los procesos de adhesión celular, crecimiento microbiano, interacción de especies, consumo de sustratos y producción de metabolitos.

4.2.1. Planteamiento

Los biofilm son una forma de ecosistema constituido por la acumulación de microorganismos asociados de manera reversible en una primera instancia, y luego irrevertiblemente, sobre una superficie solida e incrustados en una matriz de polisacáridos de producción principalmente propia [93]. Esta matriz protege a la célula de lavado mecánico, facilita la comunicación entre especies mediante señales bioquímicas, ofreciendo resistencia a biocidas y antimicrobianos [93].

Como vimos en el resultado de caracterización biológica del biofouling marino en la **sección 3.1.4 y 3.1.5** de estado del arte, el microfouling es esencial en las etapas iniciales del biofilm, creando un ambiente propicio para la adhesión de otros organismos más complejos. En estas etapas, se destaca el predominio de grupos bacterianos gramnegativos y en menor medida grampositivos, además de la contribución de organismos pertenecientes al reino Archaea. Estos organismos, junto con las microalgas y diatomeas, las cuales representan una parte importante del volumen de biomasa asociada al biofilm, forman la matriz compleja del biofilm. Estudios destacan la predominancia de diatomeas y microalgas en acero inoxidable especialmente cuando ha y exposición a la luz directa, generando una relación mutualista con bacterias y arqueas en ambientes marinos [4,10]. Estos organismos fotosintéticos dependen fuertemente de factores como la disponibilidad de luz y nutrientes como el nitrógeno, carbono y fosforo, y en menor medida de trazas de otros minerales [21].

Esta situación nos lleva a de generar un modelo dinámico del biofilm para su posterior simulación que considera la representatividad de todos los grupos taxonómicos predominantes en las etapas iniciales del biofouling y que conforman el biofilm. Es decir, se busca un modelo que pueda representar la dinámica de una comunidad mixta compuesta por organismos fototróficos (esporas de macroalgas, microalgas y diatomeas) y organismos heterótrofos (bacterias, arqueas y larvas de macrofoulers). Es relevante considerar la primera etapa del biofouling para su simulación, es decir el biofilm, debido a que estas dan paso a generar el ambiente adecuado para el asentamiento, crecimiento y desarrollo de macroorganismos, los cuales, una vez fijados a la superficie, son más difíciles de tratar y/o eliminar [1,94].

Basándose en lo expuesto anteriormente, el modelo se plantea como un enfoque unidimensional que considera la interacción de múltiples especies y sustratos limitantes. Este modelo se representa en términos del tiempo (t) y el espacio (z), siendo este ultimo la dirección de crecimiento perpendicular a la superficie de adhesión [74].

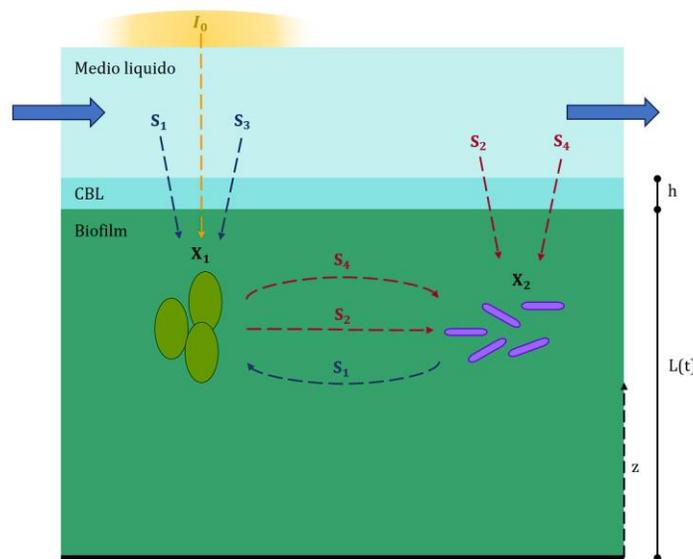
Se analizan dos especies de microorganismos presentes en el biofilm, donde la primera especie representa microorganismos fototróficos y segunda especie considera a los microorganismos heterotróficos [4,10]. En resumen, la primera especie obtiene energía a través de la absorción de luz y carbono, lo que resulta en la producción de oxígeno como subproducto metabólico. Por otro lado, la segunda especie requiere carbono y oxígeno para llevar a cabo sus procesos metabólicos, lo cual conlleva la liberación de dióxido de carbono como producto resultante de dichos procesos.

Dadas las características de las especies analizadas, se identifican cuatro sustratos relevantes en el sistema. En el caso de las diatomeas y microalgas es esencial la disponibilidad de **nitrógeno, carbono**

inorgánico y luz para sus procesos fotosintéticos [21,95]. Por otro lado, en el caso de los microorganismos heterótrofos, éstos se pueden ver beneficiados del **oxígeno y metabolitos carbónicos (principalmente quitina)** producido por algas y diatomeas durante el proceso de fotosíntesis, siendo indispensable para su desarrollo [16,94].

El mecanismo considerado es el planteado por Tenore [74] y se muestra en la **Ilustración 4.1**. Se considera que los microorganismos **fotoótrofos X_1** , mediante el uso de luz **I** , transforman el **carbono inorgánico S_1 , nitratos S_3** en compuestos orgánicos ricos en energía y liberan **oxígeno S_4** como desecho. Además, se considera que los fotoótrofos liberan una fracción del carbono inorgánico fijado durante la fotosíntesis en forma de **carbono orgánico disuelto S_2** . Las cantidades de **S_2 y S_4** liberados y producidos por **X_1** son consumidos por los organismos heterótrofos **X_2** en condiciones aeróbicas. Tanto la actividad metabólica de **X_1 y X_2** en forma sésil secretan EPS **X_3** . Además, se considera los compuestos inertes **X_4** producto del deterioro **X_1 y X_2** y otros compuestos orgánicos no consumibles generados. Se puede asumir que el aumento de volumen del medio líquido derivado de este proceso es despreciable.

Ilustración 4.1: Esquema de dinámica del biofilm fototrófico-heterotrófico [74]



Para el modelo se considera que el transporte de sustratos se modela mediante ecuaciones de difusión-reacción [74]. Además, se incluye la consideración de una capa límite de concentración (CBL) de grosor constante para considerar los efectos de las condiciones hidrodinámicas en el transporte de masa de los sustratos [74,76]. En resumen, los componentes del modelo son:

X_1	Concentración de organismos fototróficos
X_2	Concentración de organismos heterótrofos
S_1	Concentración de carbono inorgánico
S_2	Concentración de carbono orgánico disuelto
S_3	Concentración de nitrato
S_4	Concentración de oxígeno disuelto

4.2.2. Ecuaciones

El modelo dinámico considerado para la simulación es el de Wanner & Gujer (1986) [73] y desarrollado posteriormente por D'Acunto et. al (2021), Mattei et. al (2020) y Tenore et. al (2021) [74,75,93], el cual es un modelo continuo unidimensional, y que considera múltiples especies y sustratos. El modelo se plantea como un problema de frontera libre donde la dinámica del biofilm está descrito por un sistema de ecuaciones diferenciales parciales de tipo hiperbólicas y parabólicas [93].

El modelo tiene en cuenta las siguientes suposiciones [73,74,93]:

- a) Se asume que el modelo esta adherido a una superficie metálica dispuesta en la parte inferior del reactor, el cual está sumergido bajo un flujo constante de medio líquido.
- b) Al ser de tipo 1-D, se asume que el biofilm solo crece en la dirección perpendicular a la superficie de crecimiento (z).
- c) Al ser un modelo continuo la densidad ρ del biofilm es constante para todas las especies sésiles
- d) El dominio de interés se divide en tres compartimentos: el medio líquido, capa límite de concentración (CBL) y biofilm.
- e) La utilización de sustratos dentro del biofilm está dominado por procesos de difusión, el cual es crucial en las tasas de reacción microbianas y en la generación de biomasa.
- f) Existe resistencia externa al transporte de masa desde el medio líquido hacia la superficie del biofilm.
- g) El crecimiento de nueva biomasa es proporcional a la utilización del sustrato.
- h) La pérdida de biomasa en el biofilm se produce por el proceso de desprendimiento del biofilm.

Considerando el crecimiento del biofilm en una sola dimensión, asumida perpendicular a la superficie de crecimiento localizada en $z = 0$, la dinámica está expresada en función del tiempo t y espacio z , y está gobernada por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\partial X_i}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial z}(uX_i) = \rho r_{M,i}(z, t, X, S), \quad i = 1, \dots, 4, \quad 0 \leq z \leq L(t), \quad t > 0, \quad (6.2)$$

$$\frac{\partial u}{\partial z} = \sum_{i=1}^n r_{M,i}(z, t, f, S), \quad 0 \leq z \leq L(t), \quad t > 0, \quad (6.3)$$

$$\dot{L}(t) = u(L(t), t) - \sigma_d, \quad t > 0 \quad (6.4)$$

Donde:

ρ	Constante de densidad	$[ML^{-3}]$
$X_i(z, t)$	Concentración de microorganismo i , $X = (X_1, \dots, X_n)$	$[ML^{-3}]$
$u(z, t)$	Velocidad de la biomasa de microorganismos	$[LT^{-1}]$
$S_j(z, t)$	Concentración del sustrato j , $S = (S_1, \dots, S_m)$	$[ML^{-3}]$
$r_{M,i}(z, t, X, S)$	Velocidad específica de crecimiento	$[ML^{-3}T^{-1}]$
$L(t)$	Grosor del biofilm. Frontera libre	$[L]$
$\sigma_d(t)$	Tasa de desprendimiento desde el biofilm al medio líquido	$[LT^{-1}]$

La ecuación de L define la velocidad a la que se mueve la interfaz película-medio líquido y dependen de la velocidad de crecimiento e intercambio de biomasa entre el medio líquido y el biofilm. La pérdida de biomasa en el modelo se asume solo por pérdida de esfuerzo cortante.

Similarmente, los perfiles de sustratos están gobernados por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\partial S_j}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial z} \left(D_j \frac{\partial S_j}{\partial z} \right) = r_{S,j}(z, t, X, S), \quad 0 < z < L(t), \quad t > 0, \quad j = 1, \dots, m, \quad (6.5)$$

Donde

D_j	Coefficiente de difusión del sustrato j	$[L^2T^{-1}]$
$r_{S,j}(z, t, X, S)$	Velocidad de conversión del sustrato j	$[ML^{-3}T^{-1}]$

El desarrollo de las ecuaciones para especies y sustratos se muestra en el **Anexo 9.2** en más detalle.

4.2.3. Modelo cinético

Para la resolución de los modelos se consideran los procesos microbianos asociados a los términos de reacción bioquímica [74]. Debido a la actividad metabólica microbiana, se consumen y/o producen todos los sustratos S_j , y conduce a la formación de nueva biomasa [74]. Las tasas de conversión de sustrato y las tasas de crecimiento de biomasa se formulan bajo la cinética de tipo Monod [81]. La tasa de descomposición se considera lineal con respecto a la concentración de especies microbianas sésiles [74].

La velocidad neta de crecimiento de biomasa para especies sésiles $\mu_{f,i}$ es la diferencia entre la velocidad de crecimiento $r_{G,i}$ y la velocidad de decaimiento $r_{D,i}$:

$$r_{M,i} = X_i \cdot (\alpha_i r_{G,i} - r_{D,i}), \quad i = 1, 2 \quad (6.6)$$

Donde α_i es el coeficiente positivo ≤ 1 el cual toma en cuenta la liberación de DOC (compuestos orgánicos disueltos) y la producción de EPS (Sustancias poliméricas extracelulares) para las especies $i=1,2$ [74].

La velocidad específica de crecimiento de los organismos se modela mediante la ecuación de Monod modificada. Para dos o más sustratos que son complementarios, todos son necesarios para el crecimiento

de los microorganismos. En este caso para el crecimiento de biomasa de la especie sésil i se aplica la siguiente regla [81]:

$$r_{G,i} = \mu_{max,i} \prod_j \phi_{j,i} \quad (6.7)$$

Donde $\mu_{max,i}$ es la velocidad máxima específica de crecimiento y $\phi_{j,i}$ es la contribución de tipo Monod de los sustratos j al crecimiento de la especie i ,

$$\phi_{j,i} = \frac{S_j}{K_{sj} + S_j}, \quad i = 1,2 \quad (6.8)$$

Donde K_{sj} son las constantes de saturación de velocidad media del sustrato j .

Como vimos anteriormente, la luz juega un papel fundamental en el crecimiento de microorganismos fototróficos de la comunidad del biofilm. Por lo tanto, la velocidad de crecimiento para la especie $i = 1$ puede expresarse en términos de la intensidad de la luz [96]:

$$r_{G,i} = \mu_{max,i} \cdot \phi_{I,i} \cdot \prod_j \phi_{j,i} \quad (6.9)$$

Donde $\phi_{I,i}$ es el factor de intensidad de la luz. La velocidad de crecimiento de los organismos heterotróficos ($i = 2$) no se ve influenciada por la presencia de luz, por lo tanto $\phi_{I,2} = 0$.

La tasa específica de crecimiento de los organismos fototróficos se ve afectado por la intensidad de luz incidente en la superficie del biofilm [80]. Al igual que muchos organismos, la tasa de crecimiento de células fototróficas muestra saturación con respecto a la luz incidente. El modelo de Monod es el más común para describir la cinética de crecimiento por saturación. Según el enfoque de Monod, el efecto de la luz sobre organismos fototróficos está dado por [80]:

$$\phi_{I,1} = \frac{I}{I_k + I + \frac{I^2}{K_i}} \quad (6.10)$$

Donde I es la intensidad de luz incidente sobre el biofilm, I_k es la constante de saturación media para la intensidad de luz y K_i es la constante de fotoinhibición.

La intensidad de luz se denomina formalmente radiación fotosintética activa y está entre el rango de longitud de onda de 400 a 700 [nm]. La irradiancia se expresa como flujo de fotones cuánticos con unidades de $\frac{\mu\text{mol, fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$. Los valores de I_k varían ampliamente, pero oscilan entre los 10 y 200 $\frac{\mu\text{mol, fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ [80].

Los organismos marinos fototróficos están sujetos a un ciclo de iluminación conocido como fotoperiodo. Por lo general se hace referencia con respecto a un día de 24 horas, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Durante la fase oscura del fotoperiodo, se asume que no ocurre producción de biomasa fotosintética. Por lo tanto, el efecto de luz durante el fotoperiodo se puede estimar mediante [80]:

$$\phi_{I,1,\text{fotoperiodo}} = f * \phi_{I,1} \quad (6.11)$$

Donde f es el fotoperiodo fraccional. Para un ciclo de 16:8, f es igual a 0.67

Banerjee [97], incluye la temperatura en la ecuación como factor relevante en el crecimiento de las microalgas [97]:

$$r_{G,i} = \mu_{max,i} \cdot \phi_{I,i} \prod_j \phi_{j,i} 1.066^{(T_{water}-293,15)} \quad (6.12)$$

Por otro lado, el proceso de decaimiento (muerte) es expresado linealmente como

$$r_{d,i} = k_{d,i}, \quad i = 1,2 \quad (6.13)$$

Donde $k_{d,i}$ es la velocidad de decaimiento de la especie i .

Finalmente, para la expresión cinética de utilización de sustratos $r_{S,j}$, esta se expresa como la suma de la utilización y/o generación de sustratos por las especies fototróficas y heterotróficas, asociada de manera directa a su proceso de crecimiento y los parámetros planteados por Wolf [98];

$$r_{S,j} = \sum_{i=1}^2 \beta_i \cdot r_{Gi} \quad (6.14)$$

Donde β_i es el factor de utilización de sustratos. El detalle de las ecuaciones cinéticas planteadas se muestra en el **Anexo 9.3**.

4.2.4. Balance de materia en el reactor

El balance de materia parte de la derivación de las ecuaciones gobernantes en el sistema. El balance de materia general para cualquier reactor puede ser descrito como sigue [81]:

$$\text{Acumulacion} = \text{Flujo de entrada} - \text{Flujo de salida} \pm \text{Generacion por reaccion} \quad (6.15)$$

Luego, la expresión matemática equivalente para la ecuación anterior puede ser escrito como:

$$\frac{dn_j}{dt} = F_{j0} - F_j + r_j V \quad (6.16)$$

Considerando que:

$$n_j = c_j \cdot V$$

$$F_j = Q \cdot c_j$$

Por otro lado, para una configuración Batch,

$$F_{j0} = F_j = 0$$

Y considerando el volumen del biorreactor V constante, la ecuación 5.1.2 puede ser reescrita como sigue:

$$\frac{dc_j}{dt} = r_j \quad (6.17)$$

4.3. Simulación en AQUASIM 2.0®

La simulación del biorreactor de biofilm y la dinámica de este se realizó mediante el programa **AQUASIM 2.0®**. Este programa está diseñado para la identificación y simulación de sistemas acuáticos en laboratorios, plantas técnicas y naturaleza. Las aplicaciones de este programa van desde la simulación de sistemas de biofilm, sistemas de reactor CSTR, reactor de tipo Batch, sistemas de reactor advectivo-difusivo, sistemas de ríos y lagos, entre otros. Este programa realiza las tareas de simulación, análisis de sensibilidad y estimación de parámetros. El manual de usuario del programa y tutorial del programa de computación están dados en [99,100]. El detalle de funcionamiento del programa se muestra en el **Anexo 9.4**.

4.4. Selección del biorreactor

El proceso de selección del modelo del biorreactor se basó en el análisis técnico/cualitativo con la finalidad garantizar la selección idónea del sistema para los objetivos de la investigación, generar un ambiente lo más similar posible al ambiente marino natural y controlar de manera efectiva los parámetros relevantes en el crecimiento de microorganismos marinos en estado sésil (biofilm). En primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica de los modelos de reactores de biofilm analizados en la sección de estado del arte. Para tales efectos se presentan se sintetizan las principales características asociadas, además de las ventajas y limitaciones de cada tipo de reactor, respectivamente. Posteriormente, se establecieron los criterios cualitativos y los requerimientos técnicos para el testeado de recubrimientos antifouling en un ambiente marino simulado, además de la factibilidad de implementación a escala de laboratorio, con lo cual se seleccionó el modelo de biorreactor de biofilm que mejor se adaptará a los criterios y requerimientos. Finalmente, se realizó una revisión de los equipos y materiales necesarios para la construcción del biorreactor, además de un esquema de funcionamiento y los planos del reactor en el programa AutoCAD

5. Resultados y discusión

5.1. Parámetros fisicoquímicos zona del Biobío

Con la finalidad de diferenciar los resultados, se consideraron 2 periodos definidos (de afloramiento y no afloramiento) para la presencia de microalgas y microorganismos (**Tabla 5.1**). El periodo de no afloramiento presenta temperaturas superficiales del agua en promedio más bajas (12,18) que en el periodo de afloramiento (13,24). Esto va de la mano con un nivel de oxígeno disuelto más bajo, siendo aproximadamente un 10,6 % menor que el periodo de afloramiento de microalgas y un nivel de salinidad más bajo que en el periodo de afloramiento (~2,6%).

En cuanto al nivel de pH, este parámetro se mantuvo relativamente constante para ambos periodos, siendo cercanos a 7,6 ~ 7,7, es decir, levemente básico. Las desviaciones estándar para ambos periodos son igualmente pequeños, lo cual es un indicativo de que los datos son cercanos a la media y son homogéneos.

Tabla 5.1: Parámetros Fisicoquímicos por estación del año

Parámetro	Unidad de medida	Periodo	$\bar{x} \pm \sigma$		Límite inferior	Limite Superior
TS	[°C]	No afloramiento	12,18	± 0,728	11,01	14,18
		Afloramiento	13,24	± 1,007	10,96	16,24
pH	-	No afloramiento	7,69	± 0,349	5,74	8,13
		Afloramiento	7,64	± 0,248	6,68	8,05
Oxígeno disuelto	[ml/L]	No afloramiento	5,63	± 1,056	2,99	7,41
		Afloramiento	5,09	± 1,723	1,60	11,26
Salinidad	[PSU]	No afloramiento	33,18	± 1,429	27,80	34,42
		Afloramiento	34,07	± 0,993	28,80	35,51

5.2. Resultados simulación en AQUASIM 2.0®

5.2.1. Parámetros y condiciones iniciales

Las variables utilizadas para la simulación son resumidas en el **Anexo 9.5**. Los valores de condiciones iniciales para la simulación se muestran en el **Anexo 9.6**

Se destaca que los valores de condiciones iniciales de sustratos para la concentración de sustrato 3 se basan en la composición clásica descrita del medio de crecimiento para organismos marinos (**Anexo 9.7**). Los cálculos de concentración de gases disueltos (CO₂ y O₂) se hicieron en base a los parámetros fisicoquímicos obtenidos para el periodo de afloramiento correspondiente a noviembre de 2019 y abril de 2020, por ser el periodo donde existe una mayor biodiversidad de organismos fotosintéticos (**Tabla 4.1**).

Tabla 5.2 Parámetros del periodo de afloramiento en la región del Biobío para el cálculo de concentración de gases

Parámetro	Unidad de medida	$\bar{x} \pm \sigma$		
TS	[°C]	13,24	±	1,007
pH	-	7,64	±	0,248
Salinidad	[PSU]	34,07	±	0,993

En base a lo obtenido en los datos fisicoquímicos en el periodo de afloramiento, se extrapola los valores de equilibrio de CO₂ disuelto con una presión parcial de 35 [Pa] para una salinidad de 34 [PSU] y una temperatura de agua marina de 13.24 °C según la ley de Henry. Los valores utilizados para la constante de equilibrio de la ley de Henry se muestran en el anexo (**Anexo 9.8**).

$$[CO_2]_{aq} = 14.48 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} = 0.637 \frac{\text{g}}{\text{m}^3}$$

Conforme a la **ecuación 3.8 y 3.9**, las concentraciones de equilibrio redichas de los iones $[HCO_3^-]$ y $[CO_3^{-2}]$ son,

$$[HCO_3^-] = 10^{-(+pK_{a,1}-pH) \frac{P_{CO_2}}{H_{CO_2}}} [CO_3^{-2}]$$

$$[CO_3^{-2}] = 10^{-(+pK_{a,2}-pH)} [HCO_3^{-2}]$$

Luego, para una salinidad de 34 [PSU] Y 13.24 °C los valores de $pK_{a,1}$ y $pK_{a,2}$ son 6.059 Y 9.254 respectivamente. Por otro lado, para 13.24 °C la constante de la ley de Henry es de 2.462 [Pa · L/μmol]. Finalmente, con un pH de 7.64, $P_{CO_2} = 35$ [Pa] las expresiones anteriores quedan como se muestra;

$$[HCO_3^-] = 10^{22.476} [CO_3^{-2}]$$

$$[CO_3^{-2}] = 10^{-1.614} [HCO_3^{-2}]$$

Resolviendo el sistema algebraico, se tiene que:

$$[HCO_3^-] = 1.372 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} = 0.085 \frac{\text{g}}{\text{m}^3}$$

$$[CO_3^{-2}] = 6.104 \cdot 10^{-3} \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} = 3.68 \cdot 10^{-4} \frac{\text{g}}{\text{m}^3}$$

Finalmente, la concentración total de las especies carbónicas es la suma de todas las concentraciones:

$$C_T = 0.722 \frac{\text{g}}{\text{m}^3}$$

Similarmente, la concentración de oxígeno disuelto en el medio puede calcularse como:

$$P_{O_2} = H_{O_2}[O_2]_{aq}$$

Con una presión parcial de 20.95 kPa y $H_{O_2} = 82.88 \frac{L \cdot kPa}{mmol}$ para una temperatura de 13.24 °C, la concentración de oxígeno disuelto en el medio, la concentración de oxígeno disuelto es igual a,

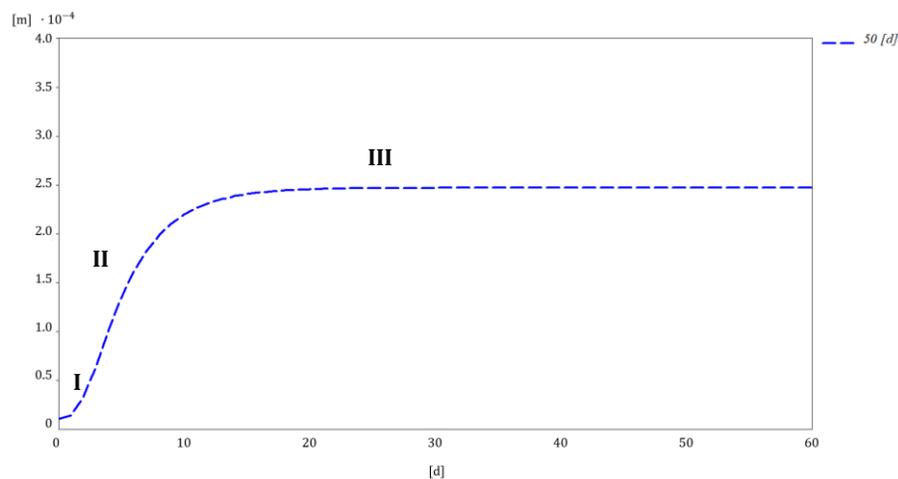
$$[O_2]_{aq} = 0.253 \frac{mmol}{L} = 4.857 \frac{g}{m^3}$$

5.2.2. Crecimiento de microorganismos

La **Ilustración 5.1** muestra el desarrollo del grosor del biofilm mixto en un periodo de 50 días. En el grafico se observa en una primera instancia (**I**) un crecimiento lento corto, asociado principalmente al periodo de asentamiento de los microorganismos. Esta etapa es sucedida por la etapa de crecimiento exponencial (**II**) rápido en los primeros 15 a 20 días, pasando de 10 μm a 250 μm . En este punto los microorganismos han alcanzado la suficiente concentración de sustrato disuelto en el biofilm que les permite multiplicarse de manera más eficiente. La tasa de crecimiento del biofilm deja en evidencia el efecto del modelo cinético de Monod utilizado para múltiples sustratos limitantes.

Finalmente se observa la fase de estacionaria (**III**) donde el biofilm alcanza un grosor constante de 160 μm . En esta etapa la tasa de crecimiento de los microorganismos se vuelve estable y se mantiene constante, donde la tasa de decaimiento y tasa de crecimiento se iguala.

Ilustración 5.1: Curva de crecimiento del biofilm en un periodo de 50 días

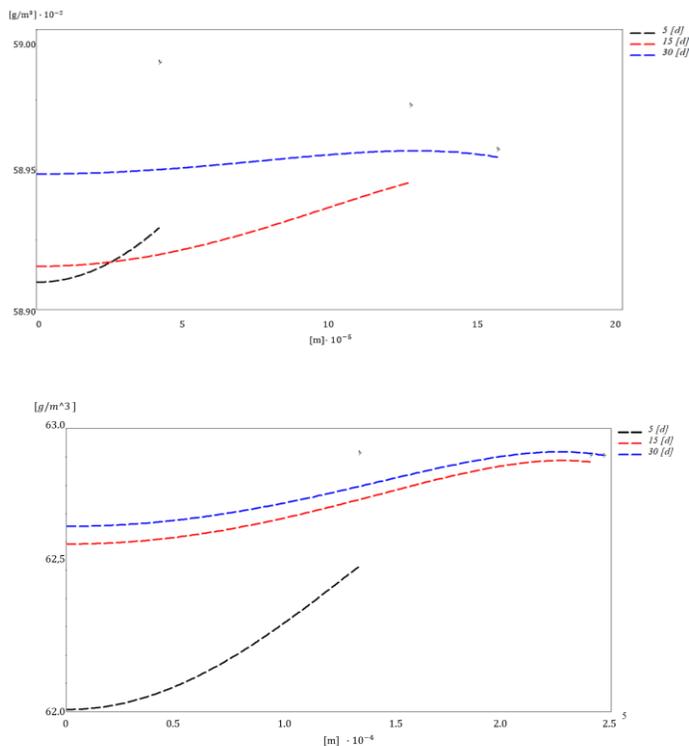


5.2.3. Perfiles de concentración de sustratos en el biofilm

Las **ilustraciones 5.2 y 5.3** muestran la distribución espacial de los sustratos S_1 , S_2 , S_3 y S_4 en el biofilm respectivamente. Se analizaron los perfiles de concentración para cada uno de los sustratos a 5, 15 y 30 días.

Los casos para S_1 y S_3 (CO_2 y NO_3^-) asociados al crecimiento de organismos fototróficos (**Ilustración 6.6**) tienen un comportamiento similar. Se observa el comportamiento esperado para cualquier tiempo donde existe una disminución de la concentración del sustrato conforme se está más cerca de la superficie de crecimiento ($z=0$ [m]), asociado a la resistencia a la difusión del biofilm. Tanto para los sustratos S_1 y S_3 la difusión es relativamente baja. En el caso de $t=5$ [d] se observa una alta concentración a una distancia de $140 \mu m$, la cual disminuye al acercarse a la superficie de crecimiento. Para $t=15$ [d], con el respectivo aumento exponencial del grosor del biofilm ($\sim 250 \mu m$), aumenta levemente la concentración de los sustratos. La concentración es mayor cercana a la parte mas exterior del biofilm y disminuye, al igual que el caso anterior, conforme se acerca a la superficie de crecimiento. Para $t=30$ [d] se ve un aumento considerable en la concentración de los sustratos en comparación para los otros casos, llegando la concentración hasta ~ 58.95 y 62.95 g/m^3 respectivamente. Se observa que el gradiente de concentración de sustratos disminuye a lo largo del paso del tiempo, lo cual se ve reflejado en las pendientes de las curvas de los 3 casos analizados para los dos sustratos. Esto se asocia principalmente a la estabilización de utilización de sustratos por parte de los microorganismos fotosintéticos.

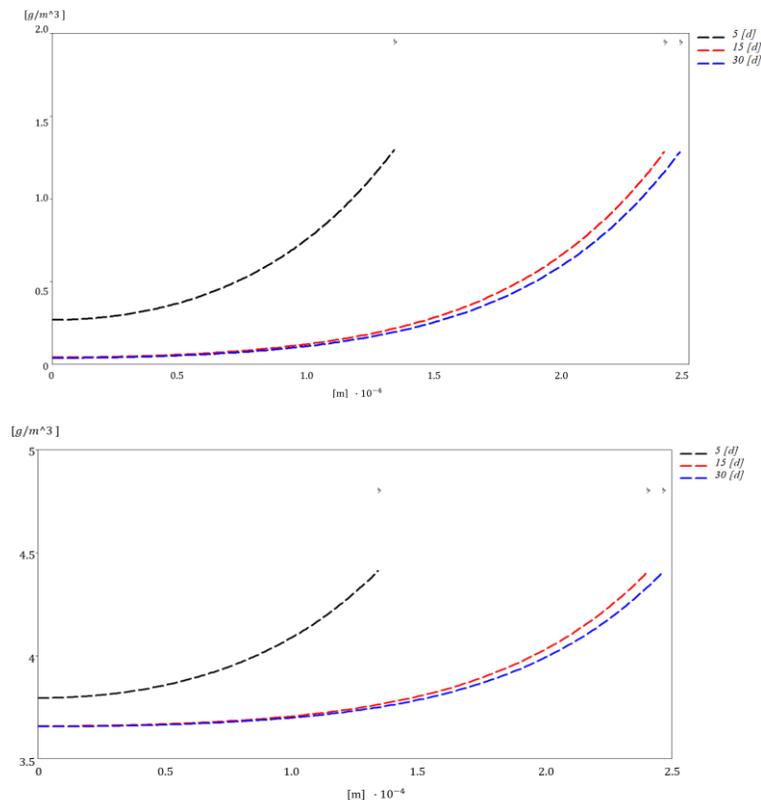
Ilustración 5.2: Distribución espacial de S_1 y S_3 en el biofilm para $t=5, 15$ y 30 [d]



Los casos para S2 y S4 (DOC y O_2) muestran la difusión en el biofilm de estos sustratos asociados al crecimiento de organismos heterotróficos (**Ilustración 6.7**) para $t = 5, 15$ y 30 [d]. Para $t = 5$ [d] el sustrato 1 difunde hasta $140 \mu m$ con una variación de concentración entre 0.3 y $1.3 g/m^3$. Para $t = 15$ [d] y 30 [d] la concentración de este sustrato disminuye considerablemente y variando la concentración dentro del biofilm entre 0.1 y $1.4 g/m^3$.

Similarmente al sustrato anterior, para $t = 5$ [d] el sustrato 4 difunde hasta $150 \mu m$ con una variación de concentración entre 3.7 y $4.5 g/m^3$. En cambio, para $t = 15$ [d] y 30 [d] la concentración disminuye variando entre 3.45 y $4.4 g/m^3$. A $t = 15$ [d], donde el sustrato difunde hasta $239 \mu m$, y a $t = 30$ [d] hasta $245 \mu m$.

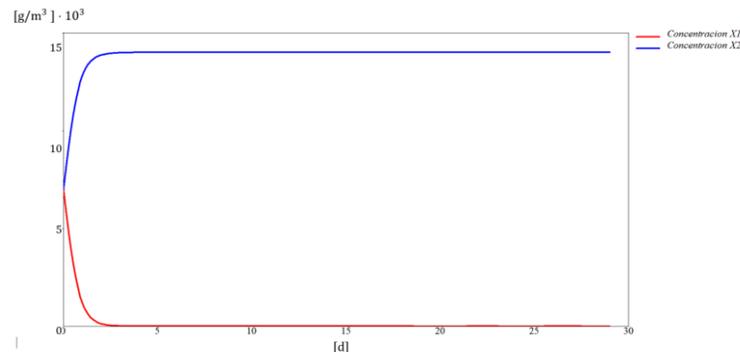
Ilustración 5.3: Distribución espacial de S2 y S4 en el biofilm para $t = 5, 15$ y 30 [d]



5.2.4. Perfiles de concentración de especies en el biofilm

La **ilustración 5.4** muestra el perfil temporal de cambio de la composición de las especies en el biofilm. La concentración inicial se consideró el 10% de la densidad del biofilm para ambas cepas, Se observa que la concentración de organismos heterótrofos aumenta en una primera instancia considerablemente hasta llegar a un valor constante de $15 \cdot 10^3 \text{ g/m}^3$ siendo dominantes en la etapa inicial del biofilm. Al contrario, la concentración de organismos fototróficos disminuye con el paso del tiempo hasta llegar a 0.

Ilustración 5.4: Evolución de concentraciones de especies X_1 (*fototrófos*) y X_2 (*heterotrófos*) del biofilm a $t = 60$ [d]



5.3. Selección y diseño del reactor

El **Anexo 9.9** muestra una síntesis de las principales características de los biorreactores de biofilm analizados. La construcción de biorreactor de biofilm a escala de laboratorio usualmente se hace en vidrio o polímeros plásticos como PE, PC o PMMA, los cuales son relativamente fáciles de conseguir y económicos. En general, el vidrio permite una buena iluminación y visualización del proceso de crecimiento del biofilm, es resistente a la corrosión y agitación, además de ser autoclavable. Sin embargo, este material puede ser propenso a roturas en condiciones de estrés térmico o mecánico. Otros materiales que también son transparentes y permiten una buena visualización es el PMMA y PC, además de ser bastante resistentes y menos propensos a romperse en comparación al vidrio. Un factor para considerar es que el policarbonato puede sufrir alta degradación a la exposición de radiación lumínica, lo cual puede impedir el paso de luz normal, interfiriendo en la ocupación de energía lumínica por parte de los microorganismos en el reactor. Por otro lado, el polietileno tiene como ventaja ser bastante resistente y moldeable, lo cual le permite una mayor versatilidad en el proceso de construcción. Sin embargo, al igual que el policarbonato, este es sensible a la degradación a la exposición prolongada a radiación lumínica, además que, de manera natural, es menos transparente que los materiales anteriormente mencionados. Por lo cual el PMMA se considera la mejor opción al momento de la confección de un biorreactor de biofilm.

En cuanto a los microorganismos utilizados, estos pueden ir desde cultivos mixtos procedentes principalmente de muestras de equipos de procesos de tratamiento de aguas residuales, o cultivos únicos de bacterias o microalgas. En general todos los tipos de cultivos pueden llevarse a cabo en cualquiera de los modelos presentados sin problema. Para organismos fototróficos, es indispensable una buena fuente

de iluminación dentro del reactor, además de control de parámetros relevantes para el crecimiento como la hidrodinámica, temperatura, pH, iluminación y control de nutrientes.

El rango de control de temperatura en estos reactores usualmente va entre los 15 a 35°C y pH entre 6.5 a 7.5. En general la temperatura y pH son relativamente fáciles y sencillos de controlar en todos los modelos de biorreactores analizados. Los nutrientes ocupados son variados. Usualmente se utiliza glucosa, extracto de levadura, proteína de soya, succinato de sodio o melaza como fuente de carbono. La peptona y urea se utiliza principalmente como fuente de nitrógeno en cultivos que involucren organismos fotosintéticos.

Por otro lado, **tabla 5.3** muestra las ventajas y limitaciones de cada modelo de reactor. El modelo RAB usualmente usado para estudios hidrodinámicos sobre el biofilm se destaca por un buen control de estrés hidráulico y parámetros, sin embargo, posee limitaciones en la iluminación y disposición de placas de testeo dada su configuración. Similar a este, el modelo CBR igualmente en general está destinado a estudios hidrodinámicos, sumando entre sus ventajas el estudio simultáneo de varias muestras y la aplicación de alto cizallamiento sobre el biofilm, con limitaciones igualmente similares.

Por otro lado, la principal característica de los reactores de disco rotativo es que permite la exposición alternada entre el medio líquido y el aire de las superficies de crecimiento, además de ser fácil controlar las condiciones relevantes como temperatura, pH e iluminación, sin embargo, este es susceptible a contaminación externa.

En cuanto a las principales ventajas de los reactores de panel plano se destaca por un buen proceso de iluminación debido a el paso corto de la luz y alta área de iluminación, lo cual le otorga un buen control sobre esta. Otra gran ventaja es que es relativamente fácil de construir a escala de laboratorio, con materiales fáciles de conseguir y es altamente escalable. A esto se suma que este modelo permite una alta transferencia de materia, tanto de sustratos como de los metabolitos generados. Sin embargo, este modelo presenta dificultad en la transferencia de gases fundamentales (CO_2 y O_2) con el medio, debido a la baja área de transferencia con el aire, por lo cual es necesario un proceso de aireación para permitir la transferencia de gases entre las fases.

Tabla 5.3: Ventajas y limitaciones de biorreactores de biofilm analizados

Reactor	Ventajas	Limitaciones
RAB	<ul style="list-style-type: none"> • Permite estudiar varias muestras simultáneamente. • Estudio de la hidrodinámica del biofilm. • Buen control de estrés hidráulico. • Buen control de flujo, pH y temperatura. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitaciones de iluminación. • Limitada superficie de crecimiento de biofilm • Formación de película no uniforme por cambio de patrones de flujo asociado a la presencia de los cupones. • Mezclado no ideal.
CBR	<ul style="list-style-type: none"> • Permite estudiar varias muestras simultáneamente. • Buen control de condiciones hidrodinámicas • Permite aplicar alto cizallamiento del fluido sobre el biofilm. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio en el patrón de flujo por la interferencia de cupones de testeo • Limitada superficie de crecimiento de biofilm • Costo de adquisición y/o construcción relativamente caro. • Autoclavable y reutilizable. • Limitaciones de iluminación.
RDR	<ul style="list-style-type: none"> • Buen control de condiciones operacionales. • Permite probar distintos esfuerzos cortantes simultáneamente al poseer varios discos horizontales. • Alternación en la exposición entre el medio acuoso y el aire. • Iluminación externa uniforme, lo cual permite una maximización de la producción de biomasa. • Buen intercambio de gases entre el medio líquido y el aire. • Alta superficie de crecimiento del biofilm. 	<ul style="list-style-type: none"> • Patrón de flujos no uniformes. • Posibilidad de contaminación externa. • Materiales relativamente costosos. • Poco compacto para generar un modelo a escala de laboratorio.
FPBR	<ul style="list-style-type: none"> • Iluminación uniforme y alta superficie de iluminación • Construcción sencilla y escalable • Posibilidad de agitación por aireación. • Alta área de interfase de transferencia de materia 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja área de transferencia de gases con el medio líquido
h-FPBR	<ul style="list-style-type: none"> • Permite desarrollar biofilms bajo condiciones hidrodinámicas controladas. • Fácil disposición de microsensores y técnicas microscópicas • Alta área de transferencia de gases con el medio líquido. • Fácil disposición de placas de testeo • Alta área de iluminación e intensidad lumínica uniforme a lo largo del reactor. • Fácil construcción a escala de laboratorio, y fácil escalabilidad a sistemas más grandes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diseño y construcción relativamente complejo. • Posibilidad de contaminación del reactor. • Posibilidad de obstrucción • Poca flexibilidad para la aplicación de otras funciones del reactor.

En cuanto a la variante horizontal de este tipo de configuración, es ideal para la relación entre la estructura del biofilm y su actividad metabólica, además de permitir el estudio de efectos hidrodinámicos sobre el biofilm y la transferencia de nutrientes entre el medio líquido y el biofilm.

Las principales ventajas que se suman a esta variante es la fácil disposición de microsensores y técnicas microscópicas para estudio de estructuras y gradientes internos del biofilm, poseer condiciones hidrodinámicas más controladas y tener una alta área de transferencia de gases. Las limitaciones de este modelo están asociadas a problemas de operación como la posibilidad de obstrucción, lo cual puede disminuir la distribución de nutrientes y contaminación externa del biorreactor.

Criterios de selección. El biorreactor de biofilm debe cumplir con ciertos parámetros para su selección. Se consideró un conjunto de 2 tipos de microorganismos en su fase sésil los cuales conforman la comunidad de biofilm. En primer lugar, se tiene un microorganismo fotosintético que ocupa el CO_2 como fuente de carbono y luz como fuente de energía para sus procesos metabólicos, y un organismo heterótrofo que consume el carbono orgánico producido por los organismos fotosintéticos como fuente de carbono, además del oxígeno. Dicho lo anterior, para los organismos fotosintéticos es indispensable la **presencia de iluminación** para el proceso de fotosíntesis. Otro factor importante es que, al ser un reactor a escala de laboratorio, sea fácil **controlar parámetros relevantes en el crecimiento e incorporar equipos de mediciones**. Sumado a esta premisa, también debe ser importante que la **disponibilidad de materiales y equipos sea simple, al igual que su proceso de construcción**. También es importante que exista una **buena transferencia de materia, como sustratos y metabolitos**. Finalmente es importante que este modelo sea capaz **de incorporar 3 placas de 7 x 15 cm y 2 mm de espesor dentro del reactor**. Todo esto se resume en la **tabla 5.3**, de los tipos de biorreactores preseleccionados que pueden cumplir con estas características:

Tabla 5.4: Análisis previo de reactores de biofilm preseleccionados y bajo los principales criterios de selección

Criterio	RAB	CBR	RDR	FPBR	h-FPBR
Iluminación externa	-	-	✓✓	✓✓	✓✓
Control de parámetros y equipos de medición	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓
Disponibilidad de materiales	-	-	✓	✓	✓
Facilidad de construcción	-	-	-	✓	✓
Transferencia de materia	✓	✓	-	✓✓	✓✓
Disposición de placas	-	-	✓	-	✓
-: Malo // ✓ : Bueno // ✓✓ : Muy bueno					

Del análisis se puede observar que el modelo que mejor cumple las características para la simulación de un entorno marino controlado para la generación de una colonia de biofilm mixto fotosintético es el modelo h-FPBR.

5.3.1. Materiales y equipos

Finalmente, los equipos necesarios para el funcionamiento del reactor, características y principales, con sus opciones de mercado son descritos en la **tabla 5.5**

Tabla 5.5: Equipos requeridos y sus características para el biorreactor

Equipo	Función	Cantidad	Características principales	Rango de operación
Sistema Chiller	Mantener el medio líquido del reactor en la temperatura deseada	1	Potencia: 72/100 [W] Voltaje: AC110-240 [V] 50-60 [Hz]	10-40 [°C] 1-3 [L/min]
pH-metro	Medir el pH del medio con la finalidad de ajustarlo en caso de salir del rango de valores establecidos	1	Material electrodo: viscoleno Precisión: ± 0.2 pH	0-14
Bomba de flujo líquido	Genera flujo de medio líquido en el reactor	1	Potencia: 11 [W] Altura máxima de bombeo: 1.2 [m]	0 - 16.3 $\left[\frac{m^3}{d}\right]$
Bomba de aire	Bombear aire enriquecido con CO2 al reactor	1	Consumo: 4 [W] 2 salidas	0 - 6.6 $\left[\frac{m^3}{d}\right]$
Lampara fluorescente	Aportar una fuente de iluminación para los organismos fototróficos que permita adaptarse al fotoperiodo asociada a la fuente de iluminación natural	1	Largo: 60 - 90 [cm] Potencia: 34 [W] Lúmenes; 2080 [lm] Entrada: AC100-240V Salida: DC 20V 2A Ciclo: Dia-Noche Temperatura de color: 6000 - 1000 K Vida útil: 50.000 Horas	-
Difusor de aire	Ayuda a dispersar el gas en pequeñas burbujas de aire en el medio de cultivo, aumentando la superficie de contacto y facilitando la transferencia de gases	2	Material: Aluminio Diámetro interno: 4 mm	-
Termómetro	Medir la temperatura del medio de cultivo	1	Precisión: ± 0.2 Material de sonda: Acero Inoxidable Longitud de sonda: 1 [m]	-50 - 150 [°C]
Filtro de agua				
Materiales				
Placas de PMMA	Utilizados para la confección del contenedor del reactor	100 * 80 [cm]	Grosor: 8 [mm] Material: PMMA Color: Transparente	-
Sellador hermético resistente al agua	Aislar las placas de PMMA unidas en la confección del reactor y evitar fugas	1	Cantidad: 50 [ml]	Temperatura aplicable: 15-90 [°C]
Tuberías	Conducir el medio de cultivo a su flujo de entrada, salida y recirculación	3 [m]	Material: Silicona Flexible Diámetro interno: 10 [mm]	-
válvula antirretorno	Permitir o evitar la circulación de flujo	1	Diámetro interno: Material: 10 [mm]	-
Dispensador de CO2	Aportar una fuente de carbono inorgánico para el consumo de organismos fototróficos	3	Cantidad: 95 gramos	-
Filtro para acuario	flujo hasta 300 l/h, volumen	1	3 fases: Biobolas, Anillos cerámicos, Esponja Flujo máximo: 38 m3/d	-

En cuanto al control de temperatura, los sistemas fotosintéticos siempre generan calor debido a la ineficiencia de la fotosíntesis en la conversión de energía lumínica en química, perdiéndose el 69% en forma de calor. La cantidad de enfriamiento depende de la intensidad de la luz incidente y la concentración celular. En principio, es recomendable controlar la temperatura utilizando modelos comerciales. El enfriamiento se logra con un sistema de intercambio de calor; se circula agua fría externa a través de un material de buena conductividad térmica, que luego extrae el calor del fotobiorreactor. El desafío más significativo es instalar un sistema de enfriamiento en un biorreactor. Algunas opciones son una chaqueta de agua externa o bobinas de enfriamiento de acero inmerso en el medio. Sin embargo, este último método puede influir sobre la circulación. De lo observado en estado del arte, el rango de temperatura del agua marina va entre los 10 a 30 °C. Por otro lado, en este trabajo el rango de temperatura entre el periodo de no afloramiento y afloramiento fue de 11 a 16 °C aproximadamente. Si bien la implementación de un baño térmico y un calefactor en conjunto es una buena opción, se consideró un Sistema Chiller de acuario dado su simplicidad en comparación con el primer sistema y rango de control asociado.

Por otro lado, el pH es un factor relevante asociado a la salinidad y concentración de gases disueltos. Si bien su valor podría variar por diversos factores en gran medida este se ve influenciado por el equilibrio de especies carbónicas burbujeadas al medio. El rango de pH en el ambiente marino va desde los 7.8 a 8.2 en promedio. En comparación, los datos de pH medidos en la zona del Biobío varían entre los 5.74 a 8.13, por lo que es necesario ocupar un equipo de medición que permita medir el pH dentro de esos rangos (0 - 14).

Los fotobiorreactores pueden ser inyectados con aire, pero la baja concentración de CO_2 en el aire (0,033%) a menudo limitará el crecimiento fototrópico. El enfoque más simple es mezclar CO_2 con aire, entre un 0,2% a 5% del flujo total de gas. Se debe tener cuidado de que la entrada de CO_2 no disminuya de forma adversa el nivel de pH del cultivo. El tamaño pequeño de las burbujas ayuda a facilitar la difusión. Controlar la concentración de CO_2 de entrada es una manera eficiente de controlar el pH del cultivo. La adición de CO_2 acidifica el medio de cultivo, aunque el consumo de nitrato por algas causa una alcalinización del cultivo. Tan importante como proporcionar CO_2 , es importante eliminar el exceso de O_2 . El exceso de O_2 conduce a daño foto oxidativo y el aumento de tasas de fotooxidación. El valor de concentración de gases disueltos depende de los valores de pH, salinidad y temperatura del medio líquido. En este estudio, conforme a estos 3 parámetros fisicoquímicos, se consideró una concentración de 0.777 g/m³ de especies carbónicas asociadas al CO_2 disuelto en equilibrio y O_2 disuelto en el medio líquido. Para esto, se consideró un dispensador de CO_2 típico de acuario para enriquecer una corriente de aire bombeado mediante una bomba peristáltica. También se consideró un difusor de aire, el cual ayuda a difundir los gases en el medio mediante burbujeo.

Sumado a esto, el control de la iluminación es trascendental. Esta puede suministrarse de manera continua o en ciclo de luz-oscuridad. Simular el entorno de iluminación natural del sol es complejo, ya que esta no está disponible todo el tiempo y está sujeta a fluctuaciones significativas por la geografía, clima y estación,

abarcando un rango de emisión de entre 120 nm a 100 μm [84]. La luz se refracta y se refleja al pasar de un medio a otro en un ángulo de refracción, excepto cuando entra en un ángulo normal perpendicular a la superficie. Siempre que sea posible la superficie del reactor debe diseñarse para minimizarla reflexión y refracción.

Las lámparas incandescentes son inferiores en comparación a otros tipos de fuentes de iluminación y rara vez se utilizan en fotobiorreactores. Tantas lámparas fluorescentes como las lámparas de led tienen una eficacia eléctrica muy buena y una vida útil considerable, sin embargo, las lámparas led se plantean como la mejor opción en general. Las lámparas led distribuyen la luz de manera uniforme desde una fuente puntual, por lo que se requiere una distancia entre la lámpara y el reactor para una correcta dispersión de la luz. Las Luces fluorescentes son rentables y permiten una mejor adaptación al espectro efectivo de fotosíntesis. Además, estas permiten la absorción de radiación lumínica entre el 15% en comparación al 5% de las lámparas incandescentes. Tomando que en este trabajo se consideró un fotoperiodo asociado al ciclo de luz de $f = 0,67$, y lo mencionado anteriormente sobre los tipos de iluminación, se consideró la utilización de un panel de luz fluorescente con programación para ciclos de luz diurnos y que contuviera el espectro requerido de iluminación similar al rango de iluminación natural de 120 nm a 100 μm [84].

En cuanto al flujo, la circulación es importante para garantizar una iluminación óptima, un intercambio adecuado de gases y el control de la temperatura y pH dentro del cultivo. Esto se puede lograr mediante la inyección de aire, creando una circulación natural, o mediante el uso de una bomba peristáltica de flujo.

El rango de velocidades de flujo identificadas en estado del arte en el que un biofilm crece de manera normal en un rango de 7-40 $\left[\frac{\text{cm}}{\text{s}}\right]$. Las tuberías vistas en el comercio utilizadas en este trabajo son de silicona y tienen un diámetro interno de 10 [mm]. Considerando un flujo de velocidad de 30 $\left[\frac{\text{cm}}{\text{s}}\right]$ el flujo volumétrico dentro de las tuberías será de 2.036 $[\text{m}^3/\text{d}]$, el cual es el valor utilizado en este trabajo. Las bombas peristálticas seleccionadas tienen un rango de trabajo de 0 a 16.3 m^3/d , lo cual se encuentra dentro del rango requerido. Finalmente, el material de construcción del biorreactor se hizo en base al análisis previo de las principales características de biorreactores de biofilm, donde se destaca el PMMA como material resistente a la degradación lumínica, estrés mecánico y térmico, además de ser moldeable y fácil de trabajar. El detalle de costo económico estimado asociado a los materiales y equipos para la confección del biorreactor se muestra en el **anexo 9.10**

5.3.2. Esquema y planos

Los planos del biorreactor con sus medidas asociadas, la vista isométrica y el diagrama de funcionamiento del biorreactor se muestran en los anexos **9.11**, **9.12**, **9.13** respectivamente.

6. Conclusiones

La determinación de las especies predominantes de micro y macroorganismos de la zona costera permite identificar patrones de composición biológica con el fin de realizar estudios posteriores sobre las cinéticas de crecimiento y utilización de sustratos de estos organismos, además de observar las dinámicas de asentamiento e interacción en el biofilm, en pruebas a escala de laboratorio. Esto se realizó mediante un estudio bibliográfico de caracterizaciones biológicas a nivel internacional y de dos estudios nacionales en la zona costera del Biobío, Chile.

En general se observa que en las primeras etapas de formación del biofilm son predominantes las especies bacterianas gramnegativas y en menor medida grampositivas. Las gramnegativas están asociadas principalmente a los procesos corrosivos, donde se destaca las especies pertenecientes al filo *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. Esto las hace predominantes en superficies metálicas susceptibles a la corrosión, inclusive si estas presentan recubrimientos AF. Otro grupo que se destaca son las microalgas y diatomeas, las cuales generan una relación mutualista con las bacterias y dependen en gran medida de la exposición a la luz. Se desatacan los géneros *Navicula*, *Nitzschia*, *Cocconeis*, entre otros. Entre las especies de macrofouling identificadas se desatacan las clases de algas *Ulva* y los Cirrípedos (percebes).

En los estudios de caracterización realizados en Chile, se destaca la presencia de los géneros micro y nano planctónicos de diatomeas como *Navicula*, *Pleurosigma*, *Nitzschia*, *Caetoceros*, entre otros.

Es de importancia centrarse en estos 2 grandes grupos para la prevención de deformación de biofouling, debido a que estudios demuestran que la formación de este biofilm induce a la maduración de macroorganismos como algas y percebes, dificultando su proceso de limpieza. Es por lo anterior que se da pie a realizar una simulación dinámica que represente ambos grupos en las etapas tempranas de formación de biofilm. Por una parte, los organismos fotosintéticos (diatomeas y microalgas) y por otra, los organismos heterotróficos (arqueas y diatomeas).

También se realizó una identificación de los parámetros fisicoquímicos relevantes en el crecimiento del biofilm. Se realizó un estado del arte de estudios asociados al crecimiento de biofilm de donde se determinó que para que la simulación de un entorno marino sea similar a las condiciones reales y generar un biofilm similar al que se podría encontrar en un entorno natural, se deben considerar parámetros de **Temperatura, Salinidad, pH, Radiación lumínica, Oxígeno Disuelto, Nivel de nutrientes y Flujo (esfuerzo de cortante)** [59,78–80]. Sumado a esto, para la identificación de los valores comunes de se obtuvieron datos de **temperatura superficial del agua, pH, salinidad y oxígeno disuelto** de la zona costera del Biobío desde la fuente de datos proporcionada por una boya meteorológica ubicada en (-36° 24'0" S -72° 54'0" W), del Centro de Datos Oceanográficos y Meteorológicos (CDOM) de la Universidad de Concepción. Los datos recogidos se dividieron en periodos de “no afloramiento” y “afloramiento” comprenden los periodos de mayo-octubre y noviembre-abril respectivamente [34]. El periodo de no afloramiento presenta temperaturas superficiales del agua en promedio más bajas (12,18) que en el periodo de afloramiento (13,24). Esto va de la mano con un nivel de oxígeno disuelto más bajo, siendo

aproximadamente un 10,6 % menor que el periodo de afloramiento de microalgas y un nivel de salinidad más bajo que en el periodo de afloramiento (~2,6%). En cuanto al nivel de pH, este parámetro se mantuvo relativamente constante para ambos periodos, siendo cercanos a 7,6 ~ 7,7, es decir, levemente básico. Sumado a esto, la salinidad se mantuvo en un promedio relativamente constante entre ambos periodos, fluctuando entre 33,18 a 34,07 [PSU]. Para las simulaciones posteriores y el planteamiento de los equipos posteriores se consideró los valores obtenidos en el periodo de afloramiento debido a la mayor actividad asociada a microorganismos fotosintéticos, especialmente de diatomeas. Estos resultados, en conjunto con los rangos para cada uno de los parámetros estudiados en el estado del arte permite generar un modelo de biorreactor capaz de adaptarse a múltiples casos de estudio.

Posteriormente se estudió el desarrollo de los modelos matemáticos dinámicos de biofilm a lo largo de las décadas. Se observa en general que los modelos han aumentado su complejidad en los últimos años de la mano del desarrollo computacional y entendimiento de la complejidad del biofilm. Los primeros modelos asumían el estado estacionario y eran pseudo analíticos en su gran mayoría, que a pesar de considerar procesos clave como la difusión en el biofilm, realiza suposiciones simplificadoras que limitan la comprensión del biofilm. Posterior a esto se desarrollaron modelos más avanzados multidimensionales, los cuales requieren un tratamiento numérico y gran potencia de simulación, mientras que los modelos unidimensionales dinámicos se plantean como una opción eficiente y simple para la simulación de un biofilm, ampliamente utilizados en el campo de la ingeniería.

En cuanto a la simulación dinámica se utilizó un modelo unidimensional con múltiples especies basado en el planteamiento de Wanner y Gujer. Se considero 4 sustratos relevantes, carbono inorgánico, carbono orgánico, nitrato y oxígeno disuelto asociado al crecimiento de los microorganismos. Además, se consideró la luz como una variable adicional. Sumado a esto, se planteó un modelo cinético de tipo Monod para la utilización de la luz y sustratos, además del efecto de la temperatura en el biofilm. También se considera el proceso de decaimiento microbiano.

El resultado de las simulaciones muestra que se puede modelar eficientemente el comportamiento dinámico del biofilm mediante el uso del programa AQUASIM. El biofilm paso de 20 20 μm a 160 μm comuna predominancia de organismos heterótrofos en la fase tardía. Esto se debe principalmente a los efectos inhibitorios de la luz y nitrato. También se observó el perfil espacial de la difusión de sustratos dentro del biofilm, donde los sustratos asociados al crecimiento fototrófico difunden en mayor medida que los asociados al crecimiento heterótrofo.

Finalmente, en cuanto al diseño del reactor, se observó que en la actualidad la mayor parte de los biorreactores de biofilm son utilizados para investigación de tratamiento de aguas residuales y evaluaciones médicas. Sin embargo, la mayor parte de los biorreactores son extrapolables a otras áreas de estudio y permiten reproducir las condiciones particulares deseadas para la simulación del biofilm de interés. Los reactores de tipo anulares y CDC suelen ser los más utilizados para evaluaciones de varias muestras simultaneas, permitiendo un gran nivel de control sobre la agitación y parámetros clave en el desarrollo del biofilm, sin embargo, no es de gran utilidad cuando existe la necesidad de desarrollar un

biofilm con organismos fotosintéticos ya que no permite la distribución uniforme de la fuente de luz. El sistema de disco rotativo por otro lado, si bien permite un buen intercambio de gases y una mejor iluminación, es relativamente costoso y poco compacto para un laboratorio, además de estar expuesto a contaminación externa y no permitir un patrón de flujo uniforme sobre el biofilm. Finalmente, los reactores de tipo "Flat Plate" o Panel plano se presentan como una buena alternativa para el desarrollo de biofilms con organismos fotosintéticos dada su alta superficie de intercambio de intensidad lumínica y paso de luz corto además de permitir una alta transferencia de sustratos y metabolitos generados. Este reactor tiene una alta versatilidad para distintos tipos de estudios y es relativamente simple de construir. En este sentido se destaca una variación de este tipo de reactor llamada reactor flat plate horizontal o "de canal" el cual tiene mayor control hidrodinámico y permite la fácil disposición de equipos de medición y control en este, por lo cual se seleccionó el reactor de tipo flat plate horizontal debido a sus mejores características cualitativas para el proceso. Con todo esto, se realizó los dibujos técnicos asociados para el diseño del biorreactor de tipo flat plate horizontal con capacidad de evaluar 3 placas de 7 x 15 cm y 2 mm de espesor que contengan recubrimientos AF, además de una descripción detallada de los equipos y materiales necesarios para la construcción del biorreactor.

7. Bibliografía

- [1] Callow ME, Callow JA. Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist* 2002;49:1–5.
- [2] Dobretsov S. Expected effect of climate change on fouling communities and its impact on antifouling research. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*, Elsevier Ltd; 2009, p. 222–39. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1.222>.
- [3] Tuck B, Watkin E, Somers A, Machuca LL. A critical review of marine biofilms on metallic materials. *Materials Degradation* 2022;25. <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00234-4>.
- [4] Landoulsi J, Cooksey KE, Dupres V. Review - Interactions between diatoms and stainless steel: Focus on biofouling and biocorrosion. *Biofouling* 2011;27:1105–24. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.629043>.
- [5] de Carvalho CCCR. Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications. *Front Mar Sci* 2018;5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>.
- [6] Shi X, Xie N, Gong J. Recent Progress in the Research on Microbially Influenced Corrosion: A Bird's Eye View through the Engineering Lens. vol. 1. 2011.
- [7] Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WM. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 2011;27:87–98. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.542809>.
- [8] Abioye OP, Loto CA, Fayomi OSI. Evaluation of Anti-biofouling Progresses in Marine Application. *J Bio Tribocorros* 2019;5. <https://doi.org/10.1007/s40735-018-0213-5>.
- [9] Jones G. The battle against marine biofouling: A historical review. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*, Elsevier Ltd; 2009, p. 19–45. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1.19>.
- [10] Lewis JA. Marine Biofouling and its Prevention on Underwater Surfaces. *Materials Forum* 1998;22:41–61.
- [11] Bixler GD, Bhushan B. Review article: Biofouling: Lessons from nature. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2012;370:2381–417. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0502>.
- [12] Dobretsov S. Expected effect of climate change on fouling communities and its impact on antifouling research. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*, Elsevier Ltd; 2009, p. 222–39. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1.222>.
- [13] Jones G. The battle against marine biofouling: A historical review. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*, Elsevier Ltd; 2009, p. 19–45. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1.19>.
- [14] Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WM. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 2011;27:87–98. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.542809>.
- [15] Cao S, Wang JD, Chen HS, Chen DR. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin* 2011;56:598–612. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4158-4>.
- [16] Procópio L. The role of biofilms in the corrosion of steel in marine environments. *World J Microbiol Biotechnol* 2019;35. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2647-4>.
- [17] Dobretsov S, Abed RMM, Teplitski M. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling* 2013;29:423–41. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.776042>.
- [18] Lebret K, Thabard M, Hellio C. Algae as marine fouling organisms: Adhesion damage and prevention. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*, Elsevier Ltd; 2009, p. 80–112. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1.80>.
- [19] Fitridge I, Dempster T, Guenther J, de Nys R. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. *Biofouling* 2012;28:649–69. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>.
- [20] Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF. Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2013;15:2879–93. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12186>.
- [21] Lebret K, Thabard M, Hellio C. Algae as marine fouling organisms: Adhesion damage and prevention. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*, Elsevier Ltd; 2009, p. 80–112. <https://doi.org/10.1533/9781845696313.1.80>.

- [22] Cao S, Wang JD, Chen HS, Chen DR. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin* 2011;56:598–612. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4158-4>.
- [23] Bixler GD, Bhushan B. *Biofouling: lessons from nature*. The Royal Society Publishing 2012;370:2381–417. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0502>.
- [24] Grzegorzczak M, Pogorzelski SJ, Pospiech A, Boniewicz-Szmyt K. Monitoring of marine biofilm formation dynamics at submerged solid surfaces with multitechnique sensors. *Front Mar Sci* 2018;5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00363>.
- [25] Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M, Colwell RR. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:244–7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.005>.
- [26] Wright JJ, Konwar KM, Hallam SJ. Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:381–94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2778>.
- [27] Sanz-Lázaro C, Navarrete-Mier F, Marín A. Biofilm responses to marine fish farm wastes. *Environmental Pollution* 2011;159:825–32. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.035>.
- [28] Edwards JL, Smith DL, Connolly J, McDonald JE, Cox MJ, Joint I, et al. Identification of carbohydrate metabolism genes in the metagenome of a marine biofilm community shown to be dominated by Gammaproteobacteria and Bacteroidetes. *Genes (Basel)* 2010;1:371–84. <https://doi.org/10.3390/genes1030371>.
- [29] Berne C, Kysela DT, Brun Y V. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Mol Microbiol* 2010;77:815–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07267.x>.
- [30] Caruso G. Microbial colonization in marine environments: Overview of current knowledge and emerging research topics. *J Mar Sci Eng* 2020;8. <https://doi.org/10.3390/jmse8020078>.
- [31] Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF. Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2013;15:2879–93. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12186>.
- [32] Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *Journal of Microbiology* 2008;46:174–82. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0032-3>.
- [33] Caruso G. Microbial colonization in marine environments: Overview of current knowledge and emerging research topics. *J Mar Sci Eng* 2020;8. <https://doi.org/10.3390/jmse8020078>.
- [34] Anabalón V, Morales CE, Escribano R, Angélica Varas M. The contribution of nano- and micro-planktonic assemblages in the surface layer (0-30 m) under different hydrographic conditions in the upwelling area off Concepción, central Chile. *Prog Oceanogr* 2007;75:396–414. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.023>.
- [35] Leclerc JC, Viard F, González Sepúlveda E, Díaz C, Neira Hinojosa J, Pérez Araneda K, et al. Non-indigenous species contribute equally to biofouling communities in international vs local ports in the Biobío region, Chile. *Biofouling* 2018;34:784–99. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1502276>.
- [36] Richmond MD, Seed R. A review of marine macrofouling communities with special reference to animal fouling. *Biofouling* 1991;3:151–68. <https://doi.org/10.1080/08927019109378169>.
- [37] Simberloff D, Martin JL, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, et al. Impacts of biological invasions: What's what and the way forward. *Trends Ecol Evol* 2013;28:58–66. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.013>.
- [38] Leclerc JC, Viard F, González Sepúlveda E, Díaz C, Neira Hinojosa J, Pérez Araneda K, et al. Non-indigenous species contribute equally to biofouling communities in international vs local ports in the Biobío region, Chile. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 2018;34:784–99. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1502276>.
- [39] ASTM. Standard Test Method for Testing Antifouling Panels in Shallow Submergence. ASTM 2020. <https://doi.org/10.1520/D3623-78AR20>.
- [40] ASTM. Standard Test Method for Subjecting Marine Antifouling Coating to Biofouling and Fluid Shear Forces in Natural Seawater. ASTM 2020. <https://doi.org/10.1520/D4939-89R20>.

- [41] Ogawa A, Hosaka S, Kanematsu H, Yoshitake M. Marine Biofilm Model Comprising a Loop-Type Biofilm Reactor and a Halomonas Strain HIG FST4 1, an Active Biofilm-Forming Bacterium. *Coatings* 2022;12. <https://doi.org/10.3390/coatings12101605>.
- [42] Trueba Ruiz A, García Gomez S, Vega Antolín LM, Madariaga Dominguez E. Reactor para crecimiento de bioincrustación en condiciones controladas, 2017.
- [43] Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology (N Y)* 2005;151:757–62. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27709-0>.
- [44] Environment Federation W. *Biofilm Reactors*. vol. 35. WEF Press; 2010.
- [45] Goeres DM, Pedersen S, Warwood B, Walker DK, Parker AE, Mettler M, et al. Design and fabrication of biofilm reactors. *Recent Trends in Biofilm Science and Technology*, Elsevier; 2020, p. 71–88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819497-3.00003-9>.
- [46] Kornegay BH, Andrews JF. Kinetics of Fixed-Film Biological Reactors. *Water Pollution Control Federation* 1968;40:460–8.
- [47] La Motta EJ. Kinetics of Growth and Substrate Uptake in a Biological Film System. *Applied and Environmental Microbiology* 1976;31:286–93.
- [48] Capdeville B, Nguyen KM. Kinetics and modelling of aerobic and anaerobic film growth. *Water Science and Technology* 1990;22:149–70.
- [49] Gomes IB, Simões M, Simões LC. An overview on the reactors to study drinking water biofilms. *Water Res* 2014;62:63–87. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.039>.
- [50] Gjaltema A, Arts PAM, Van Loosdrecht MCM, Kuenen JG, Heijnen' JJ. Heterogeneity of Biofilms in Rotating Annular Reactors : Occurrence, Structure, and Consequences. *Biotechnol Bioeng* 1994;44:194–204.
- [51] Paule A, Lauga B, Ten-Hage L, Morchain J, Duran R, Paul E, et al. A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures. *Water Res* 2011;45:6107–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.007>.
- [52] Biosurface Technologies Corporation. CDC Biofilm Reactor 2023. <https://biofilms.biz/products/biofilm-reactors/cdc-biofilm-reactor/> (accessed March 21, 2023).
- [53] Armbruster CR, Forster TS, Donlan RM, O'Connell HA, Shams AM, Williams MM. A biofilm model developed to investigate survival and disinfection of *Mycobacterium mucogenicum* in potable water. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 2012;28:1129–39. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.735231>.
- [54] Mendez E, Walker DK, Vipham J, Trinetta V. The use of a CDC biofilm reactor to grow multi-strain *Listeria monocytogenes* biofilm. *Food Microbiol* 2020;92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103592>.
- [55] Christenson LB, Sims RC. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:1674–84. <https://doi.org/10.1002/bit.24451>.
- [56] Hoehn RC, Ray AD. Effects of Thickness on Bacterial Film. *J Water Pollut Control Fed* 1973;45:2302–20.
- [57] Christenson LB, Sims RC. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:1674–84. <https://doi.org/10.1002/bit.24451>.
- [58] Sebestyén P, Blanken W, Bacsa I, Tóth G, Martin A, Bhajji T, et al. Upscale of a laboratory rotating disk biofilm reactor and evaluation of its performance over a half-year operation period in outdoor conditions. *Algal Res* 2016;18:266–72. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.024>.
- [59] Merchuk JC, Garcia-Camacho F, Molina-Grima E. Photobioreactors - models of photosynthesis and related effects. *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier; 2019, p. 320–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00081-1>.
- [60] Das A, Basu S, Ghosh S, Dairkee UK, Chowdhury R. Mathematical modelling of flat plate biofilm photobioreactors with circular and rectangular configurations. *Biosyst Eng* 2018;174:66–79. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.06.004>.

- [61] De Godos I, González C, Becares E, García-Encina PA, Muñoz R. Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:187–94. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1825-3>.
- [62] Lin YH, Leu JY, Lan CR, Lin PHP, Chang FL. Kinetics of inorganic carbon utilization by microalgal biofilm in a flat plate photoreactor. *Chemosphere* 2003;53:779–87. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00509-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00509-5).
- [63] Liao Q, Wang YJ, Wang YZ, Chen R, Zhu X, Pu YK, et al. Two-dimension mathematical modeling of photosynthetic bacterial biofilm growth and formation. *Int J Hydrogen Energy*, vol. 37, 2012, p. 15607–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.056>.
- [64] Prades L, Dorado AD, Climent J, Guimerà X, Chiva S, Gamisans X. CFD modeling of a fixed-bed biofilm reactor coupling hydrodynamics and biokinetics. *Chemical Engineering Journal* 2017;313:680–92. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.107>.
- [65] Lewandowski Z, Beyenal H. *Fundamentals of Biofilm Research*. vol. 1. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. <https://doi.org/10.1201/b15996>.
- [66] Ohashi A, Harada H. A novel concept for evaluation of biofilm adhesion strength by applying tensile force and shear force. *Water Science and Technology*, vol. 34, Pergamon Press Inc; 1996, p. 201–11. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00647-6](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00647-6).
- [67] Mašić A. Investigation of a biofilm reactor model with suspended biomass. Lund University, 2013.
- [68] Boltz JP, Morgenroth E, Sen D. Mathematical modelling of biofilms and biofilm reactors for engineering design. *Water Science and Technology* 2010;62:1821–36. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.076>.
- [69] Williamson K, McCarty PL. A Model of Substrate Utilization by Bacterial Films. *Water Pollution Control Federation* 1976;48:9–24.
- [70] Chen LM, Chai LH. Mathematical model and mechanisms for biofilm wastewater treatment systems. *World J Microbiol Biotechnol* 2005;21:1455–60. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-6565-2>.
- [71] López Buriticá K, Casanova Trujillo S, Acosta CD, Granada Diaz HA. Dynamical Analysis of a Continuous Stirred-Tank Reactor with the Formation of Biofilms for Wastewater Treatment. *Math Probl Eng* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/512404>.
- [72] Wuertz S, Falkentoft CM, Bishop PL, Wilderer PA. Modelling and simulation: Introduction. *Biofilms in Wastewater Treatment—An Interdisciplinary Approach* 2003:3–7.
- [73] Wanner O, Gujer W. A Multispecies Biofilm Model. *Biotechnol Bioeng* 1986;28:314–28.
- [74] Tenore A, Mattei MR, Frunzo L. Modelling the ecology of phototrophic-heterotrophic biofilms. *Commun Nonlinear Sci Numer Simul* 2021;94. <https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2020.105577>.
- [75] D’Acunto B, Frunzo L, Luongo V, Mattei MR, Tenore A. Free boundary problem for the role of planktonic cells in biofilm formation and development. *Zeitschrift Fur Angewandte Mathematik Und Physik* 2021;72. <https://doi.org/10.1007/s00033-021-01561-3>.
- [76] Picioreanu C, Van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Multidimensional modelling of biofilm structure. *Atlantic Canada Society for Microbial Ecology* 1999.
- [77] Jin X, Marshall JS, Wargo MJ. Hybrid Model of Bacterial Biofilm Growth. *Bull Math Biol* 2020;82. <https://doi.org/10.1007/s11538-020-00701-6>.
- [78] Sun Z, Moradi M, Chen Y, Bagheri R, Guo P, Yang L, et al. Simulation of the marine environment using bioreactor for investigation of 2507 duplex stainless steel corrosion in the presence of marine isolated *Bacillus Vietnamensis* bacterium. *Mater Chem Phys* 2018;208:149–56. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.01.047>.
- [79] Hoh D, Watson S, Kan E. Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: A review. *Chemical Engineering Journal* 2016;287:466–73. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.062>.
- [80] Rorrer GL. Bioprocess Engineering of Phototrophic Marine Organisms. *Tools and Methods in Marine Biotechnology*, n.d., p. 257–94.

- [81] Liu S. *Bioprocess Engineering*. 1st ed. Oxford: Elsevier; 2013. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59525-6.01001-5>.
- [82] Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica (NOAA). Sea Surface Temperature (SST) Contour Charts 2023. <https://www.ospo.noaa.gov/Products/ocean/sst/contour/> (accessed May 17, 2023).
- [83] Andersen RA. *Algal Culturing Techniques*. 1st ed. Phycological Society of America; 2005.
- [84] Pulz O, Scheibenbogen K. *Photobioreactors: Design and Performance with Respect to Energy Input Light*. n.d.
- [85] Knutzen J. Effects of Decreased pH on Marine Organisms. *Mar Pollut Bull* 1981;12:25–9.
- [86] United States Environmental Protection Agency (EPA). Understanding the Science of Ocean and Coastal Acidification 2022. <https://www.epa.gov/ocean-acidification/understanding-science-ocean-and-coastal-acidification> (accessed March 21, 2023).
- [87] Tsai YP. Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria. *Biofouling* 2005;21:267–77. <https://doi.org/10.1080/08927010500398633>.
- [88] Rochex A, Godon JJ, Bernet N, Escudié R. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Res* 2008;42:4915–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.09.015>.
- [89] Andersen RA. *Algal Culturing Techniques*. 1st ed. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005.
- [90] Dang H, Lovell CR. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2016;80:91–138. <https://doi.org/10.1128/membr.00037-15>.
- [91] Voss M, Bange HW, Dippner JW, Middelburg JJ, Montoya JP, Ward B. The marine nitrogen cycle: Recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2013;368. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0121>.
- [92] Sverdrup H, Johnson M. *The Oceans Their Physics, Chemistry, and General Biology*. New York: 1942.
- [93] Rosaria Mattei M. Mathematical modelling of multispecies biofilms for wastewater treatment. n.d.
- [94] Mieszkin S, Callow ME, Callow JA. Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: A mini review. *Biofouling* 2013;29:1097–113. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.828712>.
- [95] Guzzon A, Di Pippo F, Bonavita S, Congestri R. Influence of light and flow on taxon composition and photosynthesis of marine phototrophic biofilm in photobioreactors. *Mar Environ Res* 2021;169. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105395>.
- [96] Ranganathan P, Amal JC, Savithri S, Haridas A. Experimental and modelling of *Arthrospira platensis* cultivation in open raceway ponds. *Bioresour Technol* 2017;242:197–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.150>.
- [97] Banerjee S, Ramaswamy S. Dynamic process model and economic analysis of microalgae cultivation in open raceway ponds. *Algal Res* 2017;26:330–40. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.011>.
- [98] Wolf G, Picioreanu C, Van Loosdrecht MCM. Kinetic modeling of phototrophic biofilms: The PHOBIA model. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:1064–79. <https://doi.org/10.1002/bit.21306>.
- [99] Reichert P. AQUASIM 2.0 Tutorial Computer Program for the Identification and Simulation of Aquatic Systems. n.d.
- [100] Reichert P. AQUASIM 2.0 User Manual Computer Program for the Identification and Simulation of Aquatic Systems. n.d.
- [101] Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier Science; 1995.
- [102] Liu S. *Bioprocess Engineering: kinetics, biosystems, Sustainability and reactor design*. vol. 1. 1st ed. New York: Elsevier; 2013. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59525-6.01001-5>.
- [103] Paule A, Lauga B, Ten-Hage L, Morchain J, Duran R, Paul E, et al. A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures. *Water Res* 2011;45:6107–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.007>.
- [104] Mendez E, Walker DK, Vipham J, Trinetta V. The use of a CDC biofilm reactor to grow multi-strain *Listeria monocytogenes* biofilm. *Food Microbiol* 2020;92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103592>.
- [105] Cao B, Ahmed B, Beyenal H. Immobilization of uranium in groundwater using biofilms. *Emerging Environmental Technologies*, vol. 2, Springer Netherlands; 2010, p. 1–37. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3352-9_1.

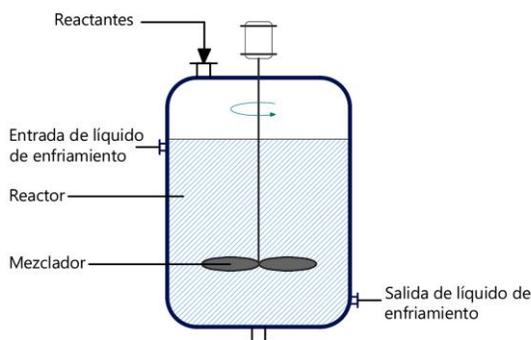
8. Anexos

Anexo 9.1 Modos de operación del biorreactor

(a) Cultivo discontinuo o Batch. El proceso Batch es un sistema cerrado donde todos los reactivos son añadidos al empezar el proceso y los productos son removidos al finalizar el proceso en el reactor [101]. Típicamente consiste en un tanque con agitación y un sistema integral de calefacción/refrigeración. Su tamaño puede variar desde 1 L (Escala de laboratorio) a 15.000 L. Son fabricados generalmente de acero, acero inoxidable, vidrio, plásticos, entre otros. Poseen una conexión en el tope para la carga de líquidos y gases y una conexión en el fondo para la descarga de líquidos y sólidos [81].

Si bien las operaciones aeróbicas no son estrictamente Batch, donde el oxígeno es suministrado continuamente y tiene baja solubilidad en el medio acuoso (mientras que el dióxido de carbono y otros gases escapan), este tipo se consideran como Batch, al no tener entradas ni salidas de líquidos. [101]. La **ilustración 9.3** muestra un sistema de operación Batch.

Ilustración 8.1: Reactor tipo Batch

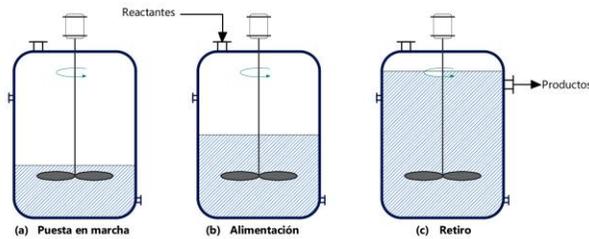


(b) Cultivo semi continuo o FedBatch. Se trata del cultivo en un régimen Batch durante un periodo de tiempo, generalmente hasta que termina el crecimiento exponencial de los microorganismos. En este punto se alimenta una solución con sustratos al nivel óptimo, sin la eliminación del fluido de cultivo. La ventaja de esto es que se puede controlar la tasa de crecimiento específica, mientras se reduce la producción de subproductos no deseados o muerte de microorganismos por exceso de nutrientes. Si el objetivo es el control del crecimiento del cultivo, conviene alargar al máximo la fase de crecimiento, minimizando los cambios en el reactor en cuanto a tasa de crecimiento específica. [81,101,102].

El sistema FedBatch puede ser la mejor opción para sistemas en los que los nutrientes y sustratos son escasamente solubles o demasiado tóxicos para agregar todo desde un principio o en los que se quiere mantener un control del crecimiento celular, a diferencia del cultivo Batch. También evita la inhibición de crecimiento por exceso de sustrato. (Efecto Catbree) [102]. La alimentación puede ser continua, por pulsos o por lotes, simple o multi sustrato, aumento lineal, exponencial o constante. El control de la alimentación puede ser definido en función de un bucle abierto si se dispone de un modelo matemático o

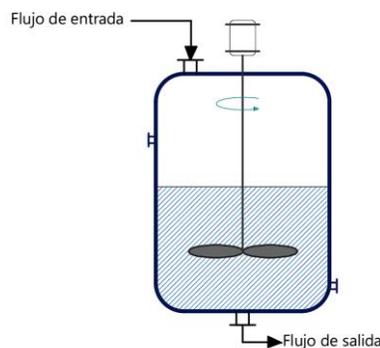
un control de retroalimentación (ej. pH o DO), dependiendo de la cinética específica de cada reacción y su sustrato limitante [102]. La **ilustración 9.4** muestra un esquema del proceso FedBatch

Ilustración 8.2: Proceso Fed-Batch [81]



(c) Cultivo continuo: Las condiciones del medio cambian continuamente en los cultivos Batch debido al metabolismo celular y la falta de control de parámetros. El crecimiento y la utilización de sustrato terminan después de cierto intervalo de tiempo, mientras que, en un cultivo continuo, el medio se mantiene constante [102], por lo cual es ideal si el objetivo es la producción de productos durante periodos prolongados. Si el reactor está bien mezclado, la composición de la corriente de salida es igual a la del medio líquido en el reactor. [101] Después de un período de tiempo, el sistema alcanza un estado estacionario donde la concentración de células, productos y sustratos permanecen constantes [102]. Este sistema es importante para la determinación de la respuesta de microorganismos a su entorno y producir los productos deseados en condiciones óptimas [102]. La **ilustración 9.5** muestra un esquema de un sistema continuo

Ilustración 8.3: Reactor Continuo [81]



Anexo 9.2 Detalle de ecuaciones del modelo 1D del biofilm

Se enumeran las ecuaciones de crecimiento del biofilm.

Especie 1 (Fotótrofos)

$$\frac{\partial X_1}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial z}(uX_1) = \rho r_{M,1}, \quad 0 \leq z \leq L(t), \quad t > 0 \quad (9.1)$$

Especie 2 (Heterótrofos)

$$\frac{\partial X_2}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial z}(uX_2) = \rho r_{M,2}, \quad 0 \leq z \leq L(t), \quad t > 0 \quad (9.2)$$

La ecuación de velocidad de crecimiento de biomasa está dada por:

$$\frac{\partial u}{\partial z} = r_{M,1} + r_{M,2} + r_{M,3} + r_{M,4}, \quad 0 \leq z \leq L(t), \quad t > 0 \quad (9.3)$$

El cambio del grosor del biofilm $L(t)$ está determinado por la velocidad de crecimiento del biofilm sumado al proceso de desprendimiento de biomasa al mismo.

$$\dot{L}(t) = u(L(t), t) - \sigma_d, \quad t > 0 \quad (9.4)$$

El cambio de concentración de sustratos en el biofilm está dado por los procesos de difusión y utilización de estos por las especies en el biofilm,

Carbono inorgánico

$$\frac{\partial S_1}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial z} \left(D_1 \frac{\partial S_1}{\partial z} \right) = r_{S,1}, \quad 0 < z < L(t), \quad t > 0 \quad (9.5)$$

Carbono orgánico disuelto

$$\frac{\partial S_2}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial z} \left(D_2 \frac{\partial S_2}{\partial z} \right) = r_{S,2}, \quad 0 < z < L(t), \quad t > 0 \quad (9.6)$$

Carbono nitrato

$$\frac{\partial S_3}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial z} \left(D_3 \frac{\partial S_3}{\partial z} \right) = r_{S,3}, \quad 0 < z < L(t), \quad t > 0 \quad (9.7)$$

Carbono oxígeno disuelto

$$\frac{\partial S_4}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial z} \left(D_4 \frac{\partial S_4}{\partial z} \right) = r_{S,4}, \quad 0 < z < L(t), \quad t > 0 \quad (9.8)$$

Carbono fosfato disuelto

$$\frac{\partial S_4}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial z} \left(D_4 \frac{\partial S_4}{\partial z} \right) = r_{S,4}, \quad 0 < z < L(t), \quad t > 0 \quad (9.9)$$

Anexo 9.3 Detalle de ecuaciones cinéticas del biofilm

Las expresiones cinéticas correspondientes a los procesos de crecimiento, decaimientos microbianos de especies sésiles son listados a continuación:

Velocidad de crecimiento de especies sésiles

- Fotótrofos

$$r_{G,1} = \mu_{max,1} \cdot \frac{I}{I_k + I + K_i I^2} \frac{S_1}{K_{1,1} + S_1} \frac{S_3}{K_{3,1} + S_3} 1.066^{(T_{water}-293,15)} \quad (9.10)$$

- Heterótrofos

$$r_{G,2} = \mu_{max,2} \frac{S_2}{K_{2,2} + S_2} \frac{S_4}{K_{4,2} + S_4} 1.066^{(T_{water}-293,15)} \quad (9.11)$$

Velocidad de decaimiento de especies sésiles

- Fotótrofos

$$r_{D,1} = k_{D,1} \quad (9.12)$$

- Heterótrofos

$$r_{D,2} = k_{D,2} \quad (9.13)$$

Con esto todas las expresiones cinéticas son,

$$r_{M,1} = X_1 \left((1 - k_{EPS,1} - \gamma_c) r_{G,1} - r_{D,1} \right) \quad (9.14)$$

$$r_{M,2} = X_2 \left((1 - k_{EPS,2}) r_{G,2} - r_{D,2} \right) \quad (9.15)$$

$$r_{S,1} = -0.0313 r_{G,1} + 0.0198 r_{G,2} \quad (9.16)$$

$$r_{S,2} = \gamma_c r_{G,1} - 1.5873 r_{G,2} \quad (9.17)$$

$$r_{S,3} = -0.0053 r_{G,1} \quad (9.18)$$

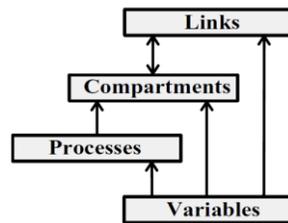
$$r_{S,4} = 0.0419 r_{G,1} - 0.0184 r_{G,2} \quad (9.19)$$

Anexo 9.4 Funcionamiento del programa AQUASIM

Formulación de modelos

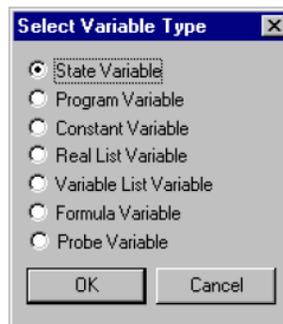
En el programa AQUASIM 2.0, un modelo consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias y/o parciales, además de ecuaciones algebraicas, las cuales describen de manera determinística el comportamiento de un conjunto de variables de estado de un sistema acuático. Las ecuaciones diferenciales se plantean mediante “compartimentos” que se pueden conectar mediante “enlaces”. Además, los procesos dinámicos pueden ser definidos en la sección de “procesos”. Todos los “procesos”, “compartimentos” y “enlaces” se definen con la ayuda de “variables” que representan variables de estado o valores numéricos sensibles. La **Ilustración 9.6** representa las dependencias de los cuatro subsistemas del programa descritos:

Ilustración 8.4: Elementos de la estructura del modelo [100]



(a) Variables. Son los objetos básicos para la formulación del modelo. El cuadro de selección de variables se muestra en la **Ilustración 9.7**.

Ilustración 8.5: Cuadro de dialogo de selección de variable



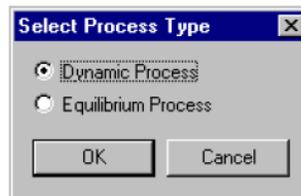
El programa distingue 7 tipos de variables dependiendo de su rango de aplicación:

- **Variables de estado.** Representan concentraciones u otras propiedades que deben ser determinadas por un modelo de transporte y cambio dinámico definido por el usuario.
- **Variables de programa.** Hacen que las cantidades como el tiempo, coordenadas espaciales, caudal, etc., que se utilizan para la formulación del modelo, estén disponibles como variables.

- **Variables constantes.** Describen cantidades medidas individualmente que también se pueden utilizar para análisis de sensibilidad o estimación de parámetros. Representan, como dice su nombre, valores constantes.
- **Variables de lista real.** Se utilizan para proporcionar datos medidos o formular dependencia con otras variables con la ayuda de pares de datos interpolados.
- **Variables de lista variable.** Se utilizan para interpolar otras variables en valores dados de un argumento arbitrario, por ejemplo, para interpolación multidimensional.
- **Variables de formula.** Permiten al usuario crear nuevas variables como expresión algebraica de otras variables y así disminuir la complejidad de planteamiento de modelos.
- **Variables de sondeo.** Hacen que los valores de otras variables evaluadas en una ubicación dada de un “compartimento” estén disponibles globalmente.

(b) Procesos. Los procesos de transformación pueden ser definidos por un conjunto de velocidades de proceso, cada una de las cuales describen la contribución dinámica del proceso de cambio temporal de la concentración de una sustancia o elemento dado. La **Ilustración 9.8** muestra el cuadro de selección del tipo de proceso.

Ilustración 8.6: Cuadro de diálogo de selección de tipo de proceso [100]



La consecuencia de la existencia de escalas de tiempo muy variables dentro de un sistema es que las concentraciones determinadas por procesos rápidos convergen rápidamente a sus valores de equilibrio actuales, de modo que la fase transitoria no es importante para el comportamiento del sistema en una escala de tiempo más lenta. Esto conduce a que sea más ventajoso la sustitución de ecuaciones diferenciales de los procesos rápidos por ecuaciones algebraicas. Con todo esto, se introducen los siguientes 2 tipo de procesos:

- **Procesos dinámicos.** Describen transformaciones de sustancias cuya dinámica es importante en la escala de tiempo de la simulación. La tasa total de transformación de una sustancia s_j está dada por:

$$r_j = \sum_i v_{i,j} r_{pi} \quad (5.1)$$

donde r_j ($ML^{-3}T^{-1}$) es la velocidad de transformación total de la sustancia s_j , $v_{i,j}$ es el coeficiente estequiométrico de la sustancia s_j para el proceso p_i y r_{p_i} ($ML^{-3}T^{-1}$) es la velocidad de proceso p_i .

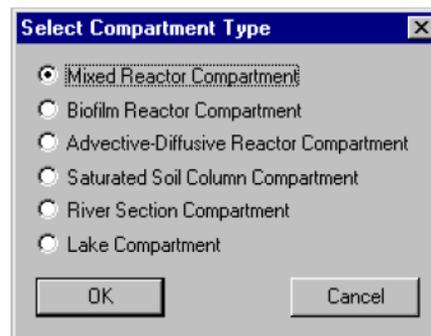
- **Procesos de Equilibrio.** Describen el efecto de procesos muy rápidos que conducen a valores de equilibrio permanentes de las variables de estado correspondientes. Una variable determinada por dicho proceso puede tratarse como si siempre tomara el valor correspondiente a su estado de equilibrio. Por lo tanto, su valor se obtiene como la solución de una ecuación algebraica:

$$r_{eq} = 0 \quad (5.2)$$

Donde r_{eq} depende de la variable involucrada y de otras variables que influyen en el valor de equilibrio.

(c) Compartimentos. La configuración geométrica de un sistema en AQUASIM consiste en un set de compartimentos de tipos específicos. La **Ilustración 9.9** muestra el cuadro de dialogo de selección de tipo de compartimentos.

Ilustración 8.7: Cuadro de dialogo de selección de tipo de compartimentos [100]



Se distinguen 6 compartimentos:

- **Mixed Reactor Compartments.** Se utilizan para describir dominios en los que existe una mezcla ideal
- **Biofilm Reactor Compartments.** Es usado para describir el crecimiento y la dinámica de biofilms en los cuales los gradientes de sustratos a lo largo de la profundidad de este son importantes.
- **Advective-Diffusive Reactor Compartments.** Describen sistemas de flujo longitudinal donde los fenómenos de advección y difusión son relevantes.
- **Saturated Soil Column Compartments.** Se utilizan para modelar el transporte, adsorción y transformación de sustancias en columnas de suelo saturado de agua, incluyendo el intercambio con zonas muertas o el volumen de poro inmóvil.
- **River Section Compartments.** Usados para describir los procesos hidráulicos, de transporte y transformación en ríos.

- **Lake Compartments.** Son usados para modelar los procesos de estratificación, mezcla, transporte y transformación en lagos horizontalmente bien mezclados.

(d) Enlaces. Los compartimentos mostrados en el párrafo anterior pueden ser conectados por enlaces o “links” con la finalidad de modelar el intercambio de agua y sustancia entre ellos. La **Ilustración 9.10** muestra el cuadro de dialogo de selección de tipo de enlaces.

Ilustración 8.8: Cuadro de dialogo de selección de tipo de enlace [100]



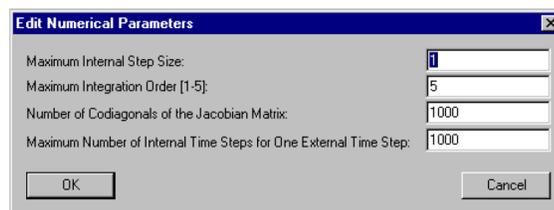
2 tipo de enlaces son distinguidos:

- **Enlaces Advectivos.** Son usados para describir el flujo de agua y transporte advectivo de sustancias desde un compartimento a otro.
- **Enlaces Difusivos.** Modelan las capas límites difusivas o membranas entre compartimentos que pueden ser penetradas difusivamente por ciertas sustancias.

Parámetros numéricos.

Para integrar las ecuaciones diferenciales del modelo especificadas por el usuario en AQUASIM, las ecuaciones diferenciales deben ser discretizadas en el espacio. Luego, las ecuaciones diferenciales parciales discretizadas espacialmente junto con las ecuaciones diferenciales ordinarias, y ecuaciones algebraicas son integradas numéricamente en el tiempo con el algoritmo DASSL el cual se basa en el método de integración implícito de paso variable conocida como **técnica de integración de Gear de orden variable**. La **ilustración 9.11** muestra el cuadro de dialogo que permite editar los parámetros numéricos para la integración temporal DASSL.

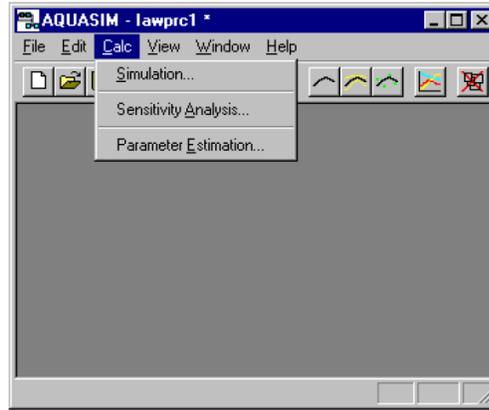
Ilustración 8.9: Cuadro de dialogo de edición de parámetros numéricos [100]



Simulación y análisis de datos.

La **Ilustración 9.12** muestra el menú de Cálculo de AQUASIM donde se distinguen las 3 funciones de cálculo integradas en el programa.

Ilustración 8.10: Menú de cálculo [100]



(a) Simulación. Como se mencionó anteriormente, se utiliza la técnica de integración de Gear de orden y paso variable, mediante una discretización espacial de EDP. La principal ventaja de esta técnica para la solución de sistemas de ecuaciones diferenciales es la propiedad de ser estable a problemas de rigidez (stiffly stable). La implementación del algoritmo DASSL tiene la ventaja de poder resolver sistemas diferenciales-algebraicos.

(b) Análisis de sensibilidad. Como se mencionó anteriormente, el análisis de sensibilidad combina las tareas de análisis de identificabilidad y análisis de incertidumbre. El análisis de identificabilidad permite verificar si los parámetros del modelo se pueden determinar de manera única con los datos disponibles y estimar la incertidumbre de estas estimaciones, mediante error estándar o funciones de sensibilidad. Por otro lado, el análisis de incertidumbre permite analizar si existe una propagación de errores en los resultados del modelo, solamente considerando un método de propagación linealizada de desviaciones estándar de parámetros no correlacionados.

(c) Estimación de parámetros. Los parámetros del modelo representados por variables constantes pueden ser estimados en AQUASIM mediante el método de **minimización de cuadrados** al minimizar la suma de los cuadrados de las desviaciones ponderadas entre las mediciones y los resultados calculados del modelo:

$$\chi^2(p) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{y_{meas,i} - y_i(p)}{\sigma_{meas,i}} \right)^2 \quad (5.3)$$

Donde $y_{meas,i}$ es la medición i-ava, $\sigma_{meas,i}$ es la desviación estándar, $y_i(p)$ es el valor calculado del modelo variable correspondiente con la medición i-ava y evaluada al tiempo y ubicación de esta medición, $p = (p_1, \dots, p_m)$ son los parámetros del modelo y n es el número de puntos de datos. Debido a la posible no linealidad de las ecuaciones del modelo y debido al procedimiento de integración numérica, la suma debe

minimizarse numéricamente en el programa, donde el usuario puede seleccionar hacerlo mediante el **algoritmo simplex** o el **método de secante**.

Visualización de resultados.

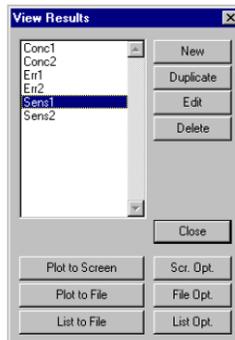
La **Ilustración 9.13** muestra el menú de Vista de resultados de AQUASIM:

Ilustración 8.11: Menú de Vista de resultados [100]



- El ítem "Results" del menú es usado para especificar las definiciones graficas. La **Ilustración 9.14** es usado para editar las definiciones gráficas, graficar y enumerar resultados:

Ilustración 8.12: Cuadro de dialogo para edición de definiciones de graficación y resultados gráficos [100]



En este cuadro de dialogo se contienen las especificaciones generales del grafico como el significado, etiquetas, escalas de ejes, listas de curvas, etc. Cada una de estas curvas contiene especificaciones como el tipo de curva, variable, numero de cálculo, ubicación del compartimento, zona, ubicación espacial, tiempo, etc. Por lo tanto, se recomienda dedicar tiempo para especificar cuidadosamente la serie de definiciones graficas que posteriormente se puedan utilizar.

Anexo 9.5 Parámetros para la simulación en AQUASIM

Tipo de variable	Variable	Definición	Valor	Unidad	Referencia
VP	L	Grosor del biofilm	-	[m]	-
VP	u	Velocidad de crecimiento de biomasa	-	[m/d]	-
VE	X ₁	Concentración de organismos fotótrofos en el biofilm	-	[g/m ³]	-
VE	X ₂	Concentración de organismos heterótrofos en el biofilm	-	[g/m ³]	-
VE	S ₁	Concentración de carbono inorgánico disuelto	-	[g/m ³]	-
VE	S ₂	Concentración de carbono orgánico (Quitina) ^(a)	-	[g/m ³]	-
VE	S ₃	Concentración de nitrato (NO ₃ ⁻)	-	[g/m ³]	-
VE	S ₄	Concentración de oxígeno disuelto (O ₂ disuelto)	-	[g/m ³]	-
VE	I	Intensidad de luz de fuente de iluminación incidente	-	[W/m ²]	-
VF	ρ	Densidad del biofilm	70000	[g/m ³]	[76]
VF	h	Grosor de CBL ^(b)	4 · 10 ⁻⁵	[m]	[76]
VF	D _{s1}	Coefficiente de difusión de carbono inorgánico disuelto	1.65 · 10 ⁻⁴	[m ² /d]	[74]
VF	D _{s2}	Coefficiente de difusión de carbono orgánico	1.04 · 10 ⁻⁴	[m ² /d]	[74]
VF	D _{s3}	Coefficiente de difusión de nitrato (NO ₃ ⁻)	1.47 · 10 ⁻⁴	[m ² /d]	[74]
VF	D _{s4}	Coefficiente de difusión de oxígeno disuelto (O ₂ disuelto)	1.73 · 10 ⁻⁴	[m ² /d]	[74]
VF	D _{1,2}	Coefficiente de difusión de especies en el biofilm	1 · 10 ⁻⁷	[m ² /d]	[74]
VF	rD _{1,2k}	Relación entre coeficiente de difusión biofilm/agua	0.8	-	[68]
VF	μ _{max,1}	Velocidad máxima específica de crecimiento de X ₁	1	[d ⁻¹]	[68]
VF	μ _{max,2}	Velocidad máxima específica de crecimiento de X ₂	6	[d ⁻¹]	[68]
VF	K _{1,1}	Coefficiente de saturación media de carbono inorgánico para X ₁	2.44	[g/m ³]	[68]
VF	K _{3,1}	Coefficiente de saturación media de nitrato para X ₁	0.0744	[g/m ³]	[68]
VF	K _{2,2}	Coefficiente de saturación media de carbono orgánico para X ₂	4	[g/m ³]	[68]
VF	K _{4,2}	Coefficiente de saturación media de oxígeno disuelto para X ₂	0.1	[g/m ³]	[68]
VF	λ	Constante de esfuerzo de corte biomasa	200	[[m ⁻¹ d ⁻¹]	[74]
VF	Tw	Temperatura del agua	286.15	[K]	(*)
VF	pH	pH del medio acuoso	7.64	[-]	(*)
VF	Sa	Salinidad del medio	34.5	[PPT]	(*)
VF	k _{d1}	Constante de decaimiento para X ₁	0.14	[d ⁻¹]	[62]
VF	k _{d2}	Constante de decaimiento para X ₂	0.1	[d ⁻¹]	[74]
VF	γ _c	Factor de liberación de DOC de fotótrofos	0.05	[-]	[74]
VF	I _k	Constante de saturación media para la luz	43.5	[W/m ²]	[97]
VF	K _i	Constante de fotoinhibición	608.7	[W/m ²]	[97]
VF	f	Fracción de fotoperiodo	0.67	[-]	[80]
VF	A	Área de crecimiento del biofilm	0.065	[m ²]	(*)
VF	V	Volumen del reactor	0.016	[m ³]	(*)

(*) Usado en este trabajo
(a) Carbono Orgánico Disuelto
(b) Capa límite de concentración

Anexo 9.6 Condiciones iniciales para la simulación en AQUASIM

Parámetro	Valor	Unidad
Q_{in}	2.036	$[m^3/d]$
$S_{1,in}$	0.722	$[g/m^3]$
$S_{2,in}$	2	$[g/m^3]$
$S_{3,in}$	62	$[g/m^3]$
$S_{4,in}$	4.857	$[g/m^3]$
L_0	$1 \cdot 10^{-5}$	$[m]$
$X_{1,0}$	0.1ρ	$[g/m^3]$
$X_{2,0}$	0.1ρ	$[g/m^3]$

Anexo 9.7 Composición común medio de cultivo organismos fototróficos marinos [80]

Typical medium component & concentration				Major cellular constituents/role or function
<i>Macronutrients</i>				
Nitrogen (nitrate)	N	NaNO ₃	1–10 mM NO ₃ ⁻	Amino acids and proteins (enzymes), purines, porphyrins, amino sugars, amines
Phosphorous (phosphate)	P	Na ₂ HPO ₄	0.05–0.5 mM HPO ₄ ²⁻	Nucleic acids and genetic material, chemical energy carriers (ATP, NADPH), phospholipids
Sulfur (sulfate)	S	MgSO ₄	40 mM SO ₄ ²⁻	Amino acids (methionine, cysteine), sulfated polysaccharides, sulpholipids
<i>Macrosalts</i>				
Sodium	Na	NaCl	450 mM Na ⁺	Major component of seawater/water balance
Magnesium	Mg	MgSO ₄	40 mM Mg ²⁺	Major component of seawater, component of chlorophyll
Potassium	K	KCl	10 mM K ⁺	Osmotic regulation, pH balance, protein conformation
Calcium	Ca	CaCl ₂	10 mM Ca ²⁺	Major component of seawater/enzyme activation, ion transport
<i>Micronutrients – trace elements a</i>				
Boron	B	H ₃ BO ₃	0.4 mM BO ₃ ³⁻	Diverse roles in primary metabolism and reproduction
Cobalt	Co	CoCl ₂	0.2 μM Co ²⁺	Constituent of vitamin B ₁₂
Copper	Cu	CuCl ₂	0.2 μM Cu ²⁺	Constituent of plastocyanin/enzyme co-factor, electron transport (photosynthesis)
Iron	Fe	FeCl ₃	0.02 mM Fe ³⁺	Constituent of ferredoxin and cytochrome/enzyme co-factor for redox reactions including nitrate reductase
Molybdenum	Mo	Na ₂ MoO ₄	5 μM MoO ₄ ²⁻	Enzyme co-factor: nitrate reductase
Manganese	Mn	MnCl ₂	5 μM Mn ²⁺	Constituent of photosystem II, maintenance of chloroplast membranes
Silicon	Si	Na ₂ SiO ₃	0.5 mM SiO ₃ ²⁻	Cell wall component (diatoms)
Zinc	Zn	ZnCl ₂	5 μM Zn ²⁺	Enzyme co-factor: carbonic anhydrase
<i>Micronutrients – vitamins</i>				
Cyanocobalamin		B ₁₂	0.001 μM	Enzyme co-factor/growth factor
Thiamin		B ₁	1 μM	Enzyme co-factor/growth factor
Biotin			0.001 μM	Enzyme co-factor/growth factor

Anexo 9.8 Propiedades de equilibrio de gases disueltos en agua marina y dulce [80]

Equilibrium property	Variable name	T (°C)	Value		Units
			fresh water	35 ppt seawater	
Dissolved CO ₂ concentration in equilibrium with 35 Pa gas phase CO ₂	(CO ₂) or C _A *	5.0	22.43	18.75	μmol L ⁻¹
		15.0	15.95	13.46	
		25.0	11.90	10.18	
		35.0	9.27	8.06	
Henry's law constant for CO ₂	H(CO ₂)	5.0	0.0154	0.0184	L atm mmol ⁻¹
		15.0	0.0217	0.0257	
		25.0	0.0290	0.0339	
		35.0	0.0373	0.0428	
Dissolved O ₂ concentration in equilibrium with 20.95 kPa gas phase O ₂	(O ₂)	5.0	391.5	310.8	μmol L ⁻¹
		15.0	298.3	240.8	
		25.0	236.0		
Henry's law constant for O ₂	H(O ₂)	5.0	0.5280	0.6651	L atm mmol ⁻¹
		15.0	0.6930	0.8584	
		25.0	0.8759	1.0683	
Dissociation constant for bicarbonate (HCO ₃ ⁻)	pK _{a,1}	5.0	6.52	6.11	
		15.0	6.42	6.05	
		25.0	6.35	6.00	
		35.0	6.31	5.97	
Dissociation constant for carbonate (CO ₃ ²⁻)	pK _{a,2}	5.0	10.55	9.34	
		15.0	10.43	9.23	
		25.0	10.33	9.10	
		35.0	10.25	8.95	

Anexo 9.9 Principales características de Reactores analizados en estado del arte

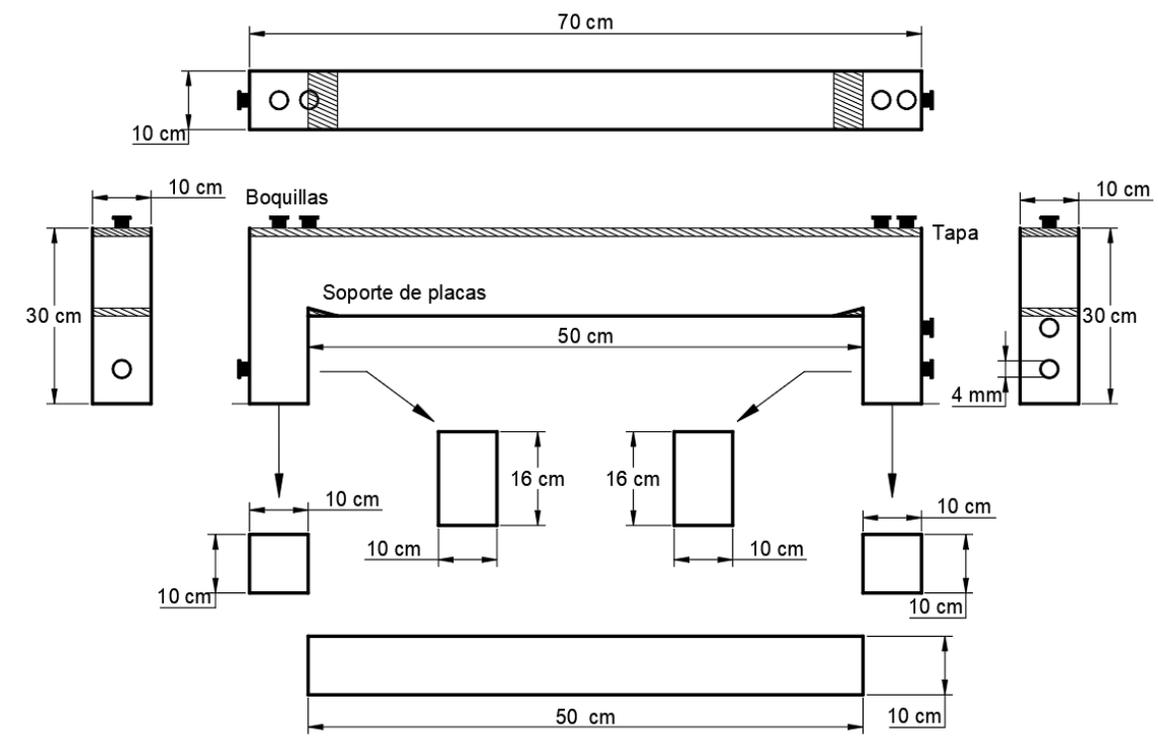
Reactor			Factores					Superficie de crecimiento	Referencia
Tipo	Material	Microorganismos	Hidrodinámica	Temperatura [°C]	pH	Iluminación	Nutrientes	Material	
RAB	Vidrio	Mixto	Velocidad de flujo: 134 ml/min, Velocidad de agitación: 100 rpm	25	6.5	-	Glucosa, Extracto de levadura y Base mineral	-	[46]
RAB	PVC	Mixto	Velocidad de flujo: 100 ml/min, Velocidad de agitación: 150 rpm	-	-	-	Glucosa (5 mg/l) y Base mineral	-	[47]
RAB	PVC	Mixto	Velocidad de agitación: 40 rpm	25	-	-	Vaindiox, Glucosa, Peptona, Extracto de levadura y Oligoelementos	PVC	[48]
RAB	PVC/PMMA	Mixto	Velocidad de agitación: 80 rpm, Re = 17,040,	19,30	7	130, 180 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{m}^2}$	Nitrato, Fosfato y Sílice	PE	[103]
RAB	PC	T. pantotropha, P. Aeruginosa	Velocidad de agitación: 150 rpm	30	7.5	-	Acetato de sodio enriquecido y glucosa	PC	[50]
CDC	Vidrio	P. Aeruginosa, K. pneumoniae, S. pneumoniae	Velocidad de agitación: 100 rpm, Velocidad de flujo: 1 ml min ⁻¹ , Tiempo de residencia: 6 h	30	7,2	-	Extracto de levadura (0.05 g), Peptona (0.03 g), Glucosa (0.3 g) y Base mineral	SS	[43]
CDC	PE	D. acidovorans, A. paucimobilis, M. mucogenicum, Methylobacterium sp.	Velocidad de agitación: 100 rpm, Velocidad de flujo: 2,5 ml min ⁻¹ , Tiempo de residencia: 140 min	18	7.2	-	Agua esterilizada	PVC	[53]
CDC	Vidrio/PE	Mixto	Velocidad de agitación: 60 rpm, Velocidad de flujo: 11 ml min ⁻¹	30,37	-	-	TSB, BD, MD+ 0.6% extracto de levadura	SS	[104]
RDR	PVC	Mixto	Velocidad de agitación: 2 rpm, Velocidad de flujo: 3-4 l min ⁻¹	21	-	-	Acetato de sodio, Glucosa y Trazas minerales	PVC	[56]
RDR	PVC	Mixto	Velocidad de agitación: 4.8 rpm	14-24	9.1-11.0	170, 290 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{m}^2}$	Medio Bristol	Algodón; Nylon; PP; Poliéster	[55]
RDR	PC/PVC	C. Sorokiniana	Velocidad de agitación: 11 rpm, Velocidad de flujo: 10 l min ⁻¹	30	6.7-7	250 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{m}^2}$	M8, Urea (33 mm.)	PVC	[58]
FPBR	Vidrio	Rhodospseudomonas sp.	-	37	6.5-7.0	294 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{m}^2}$	Extracto de levadura (0.3 g), Acetato de amonio (0.5 g), Acido málico (1 g) y Succinato de sodio (1 g + trazas de minerales)	Platos de vidrio	[60]
FPBR	Vidrio	Microalgas	-	25	7.4	20 w, 9980 lux	BG11	Anillos de plástico	[62]
FPBR	-	Mixto	-	30	7	1000-8000 lux	Glucosa	-	[63]
HFPBR	PVC	Bacterias desnitrificantes	Flujo de entrada: 50 ml/min, Reciclo: 20 l/min	25	7	-	Agua residual sintética, nitrato de sodio (1000 mg) y metanol (1200 mg)	PVC	[66]
HFPBR	PC	Bacterias sulfuroreductoras	30 ml/h	-	7	-	Agua desionizada	PC	[105]
HFPBR	PMMA	Mixto	157 ml/h	-	-	-	-	PMMA	[64]

PMMA: Polimetilmetacrilato, PVC: Polivinilo de cloruro, PC: Policarbonato, PE: Polietileno, Re: Numero de Reynolds, SS: Acero Inoxidable, PA: Plástico Acrílico

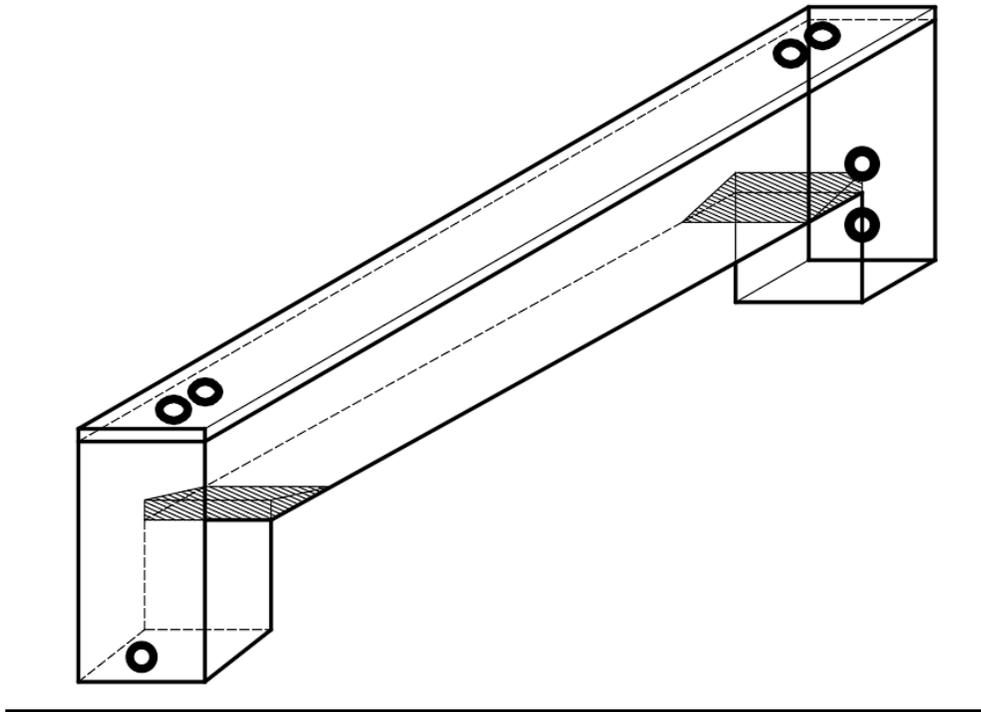
Anexo 9.10 Análisis económico

Equipos	Costo (\$CLP)	Fuente
Sistema chiller	\$42,409	1
Bomba de flujo	\$53,550	2
Bomba de aire	\$14,990	3
Lampara led	\$142,129	4
Difusor de aire (x2)	\$11,990	5
Filtro de agua	\$89,990	6
Dispensador co2 (x3)	\$40,000	7
Costo total equipos	\$395,058	
Equipos de medición		
pH-metro	\$49,256	8
Termómetro	\$56,100	9
Costo total equipos de medición	\$105,356	
Materiales		
placas PMMA	\$34,212	10
sellador hermético	\$34,000	11
Tuberías de silicona	\$7,500	12
Costos materiales	\$75,712	
Costo total	\$576,126	

Anexo 9.11 Planos del biorreactor



Anexo 9.12 Vista Isométrica del Biorreactor



Anexo 9.13 Diagrama del biorreactor

