

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Politècnica Superior d'Enginyeria
de Manresa



Departament d'Enginyeria Minera, Industrial i TIC

Tesis doctoral

**DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN
DE MICROELECTRODOS PARA EL ESTUDIO DE
BIOPELÍCULAS SULFUROXIDANTES**

Xavier Guimerà Villalba

Junio de 2016

Directores:

Xavier Gamisans Noguera

Antonio David Dorado Castaño



Acta de qualificació de tesi doctoral

Curs acadèmic: 2015/2016

Nom i cognoms	Xavier Guimerà Villalba
Programa de doctorat	Recursos Naturals i Medi Ambient
Unitat estructural responsable del programa	Departament d'Enginyeria Minera, Industrial i TIC

Resolució del Tribunal

Reunit el Tribunal designat a l'efecte, el doctorand / la doctoranda exposa el tema de la seva tesi doctoral titulada Diseño, caracterización y aplicación de microelectrodos para el estudio de biopelículas sulfuroxidantes.

Acabada la lectura i després de donar resposta a les qüestions formulades pels membres titulars del tribunal, aquest atorga la qualificació:

NO APTE APROVAT NOTABLE EXCEL·LENT

(Nom, cognoms i signatura)		(Nom, cognoms i signatura)	
President/a		Secretari/ària	
(Nom, cognoms i signatura)			
Vocal	Vocal	Vocal	Vocal

_____, _____ d'/de _____ de _____

El resultat de l'escrutini dels vots emesos pels membres titulars del tribunal, efectuat per l'Escola de Doctorat, a instància de la Comissió de Doctorat de la UPC, atorga la MENCIÓ CUM LAUDE:

SÍ NO

(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)
President de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat	Secretari de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat

Barcelona, _____ d'/de _____ de _____



AUTORITZACIÓ DELS DIRECTORS / CODIRECTORS / PONENTS DE TESI PER A LA PRESENTACIÓ DE LA PROPOSTA DE LECTURA

Dades del doctorand que presenta la tesi

Xavier Guimerà Villalba

Diseño, caracterización y aplicación de microelectrodos para el estudio de biopelículas sulfuroxidantes

Director de tesi

Xavier Gamisans Noguera

39345321A

xavier.gamisans@upc.edu

Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Minera, Industrial i TIC

Av. Bases de Manresa, 61-73 08242 Manresa-Barcelona

Codirector

Antonio David Dorado Castaño

39362826M

toni.dorado@upc.edu

Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Minera, Industrial i TIC

Av. Bases de Manresa, 61-73 08242 Manresa-Barcelona

El director/ la directora de tesi abans esmentat autoritza la presentació de la tesi per la seva admissió a tràmit de lectura.

Signatura del director de tesi

Signatura del codirector

Manresa, a 15 de Juny del 2016

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de:

- Proyecto financiado por el ministerio de Economía y Competitividad:
“Monitorización, modelización y control para la optimización de biofiltros percoladores de desulfuración anóxicos y aeróbios” (CTM2012-37927-C03/FEDER).
- Beca pre-doctoral FPI-UPC

Parte de este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM) bajo la supervisión de la Doctora Gemma Gabriel

*“Por naturaleza, los hombres
buenos desean saber”*

Leonardo da Vinci

Agraïments

Encara que en aquest document se m'atribueix l'autoria de la feina presentada, aquesta tesi no hagués estat possible sense la participació (activa i passiva) de molta gent. Per aquest motiu abans de començar voldria agrair i compartir els (possibles) mèrits amb tots vosaltres. He intentat estructurar els agraïments de forma cronològica, i per tant l'ordre d'aparició no té (necessàriament) relació amb la importància en el treball presentat dels que hi apareixen.

En primer lloc voldria agrair a les persones que van fer possible la meua arribada a Manresa, tant a en Xavier i en Toni per la confiança que van dipositar en mi el Febrer del 2012, com a en Luís que va pensar en mi quan va saber que buscaven a algú i va donar la cara per mi recomanant-me.

A en Xavier i en Toni també voldria agrair-los el coneixement que m'han transferit durant aquests 4 anys, així com la seva dedicació durant tot aquest temps a formar-me, tant professionalment com personalment. Ha sigut un plaer haver compartit aquest camí amb vosaltres.

Una gran part de la investigació que es presenta en aquesta tesi ha estat realitzada a l'Institut de Microelectrònica de Barcelona. Per aquest motiu voldria agrair el treball i l'ajuda durant tota la tesi dels membres del Grup d'Aplicacions Biomèdiques (Gemma, Rosa, Eli, Anna, Antón, Xavi i José). Gràcies per donar-me la possibilitat de treballar amb vosaltres al CNM, gràcies per haver compartit el vostre coneixement amb mi, gràcies per haver-me ajudat amb la fabricació dels reactors i mil gràcies perquè sense la vostra ajuda desinteressada el 90% de les mesures que es presenten en el treball no haguessin estat possibles. M'agradaria també destacar el paper de l'Ana Moya en totes les tasques referents al desenvolupament dels sensors. En aquest sentit és just i necessari compartir l'autoria dels capítols 5 i 9 amb ella.

A la gent de la UAB (companys de viatge durant els projectes del Mineco) també tinc moltes coses a agrair. Al David vull agrair-li la seva participació en aquesta tesi, tant en les seves aportacions en reunions del BTP-GO que em van ajudar durant la planificació dels experiments com en les seves revisions dels resultats obtinguts. Al Javier m'agradaria agrair-li el seu afecte i les seves aportacions sempre constructives en les reunions (massa poques pel meu gust) que hem compartit. A la Mabel vull agrair-li

el coneixement sobre microorganismes sulfuroxidants que ha compartit amb mi, així com haver-me donat la possibilitat d'haver provat els microsensors en un biofiltre de veritat. Luís, gràcies per la biomassa, gràcies per calibrar els meus sensors d'H₂S i gràcies per tots els consells i tota l'ajuda durant el temps compartit. Enric gràcies per la teva paciència amb els meus acudits dolents (i pesats).

M'agradaria tenir un record especial per la gent del grup de Bioreactores Enzimáticos de la Universitat de Càdis (també companys de viatge en el projecte del Mineco). Gràcies per la hospitalitat i el bon humor amb el que ens vaurebre a Càdis. Ha estat un plaer haver compartit amb vosaltres la passió pel biogàs,

També tinc moltes coses a agrair a la gent del TRAGASOL i de l'EPSEM en general. Anna, Conxita, Montse, F. Xavier, gràcies per la vostra paciència amb les fuites de H₂S i gràcies per l'afecte amb el que sempre m'heu tractat. Les reunions de grup amb tots vosaltres i els seguiment especial en algunes tasques m'ha ajudat a augmentar el nivell científic de la meva recerca. Gràcies a la Xesca, que no només sempre ha estat disposada en ajudar-me en el possible, sinó que a més a més ha fet amenes les estones i visites al laboratori. Gràcies també a la Llúcia i a la gent del centre de càlcul (Sandra, Fàtima,...), tothom qui us coneix sap lo important que heu estat durant aquests 4 anys.

M'agradaria recordar a tots els companys de despatx que he tingut durant aquests 4 anys, amb qui la proximitat espacial i d'edat ha ajudat a establir més complicitat. Gràcies a la Ginesta, el Hao i el Jordi que vaurebre fer molt fàcil la meva arribada i adaptació a l'EPSEM. Gràcies al Jordi Delgado, sense els moments frikies compartits amb tu aquesta tesi no hagués estat el mateix. També vull recordar-me del Luís Arellano, només vam compartir 4 mesos, però ha estat un plaer haver-te conegut. Respecte als meus companys de despatx més recents (Eloi, Eva, Lledó i Dani) vull agrair-los la seva ajuda en la redacció dels agraïments. També és just reconèixer el seu paper a l'hora de compartir consells i frustracions, així com els moments de desconexió durant les pauses del café. Sens dubte haver-vos conegut és una de les experiències més positives que m'emporto d'aquests 4 anys.

Per últim, però no menys important, vull tenir un record per a la meva família: els meus pares i en especial per a la Montserrat, la Eva, la Janna, el Pere i el Guifré. Tot i que el vostre impacte en el treball que es presenta és només tangencial, el vostre suport ha estat imprescindible.

CONTENIDO

<i>Resumen</i>	v
<i>Abstract</i>	vii

Capítulo 1

Antecedentes, motivación y presentación.....	3
--	---

Capítulo 2

Introducción general

Tratamiento biológico de contaminantes gaseosos	9
Biopelículas	13
Monitorización de biopelículas	26

Capítulo 3

Objetivos.....	37
----------------	----

Capítulo 4

Materiales y métodos generales

Descripción de los equipos	41
Técnicas analíticas	52
Procesos de fabricación microelectrónica	54

Capítulo 5

Desarrollo de un microsensor de oxígeno disuelto basado en tecnología MEMS para la monitorización de biopelículas

Resumen	61
Introducción	63
Materiales y métodos	65
Diseño y microfabricación de un microsensor de OD basado en tecnología MEMS	
Limpieza y preparación de los electrodos	
Medida del OD utilizando el microsensor MEMS	
Caracterización del microsensor de OD	
Validación del microsensor para la monitorización de biopelículas	
Resultados	74
Caracterización del microsensor MEMS pasivado con oxinitruro de silicio	
Caracterización del microsensor MEMS pasivado con SU-8	

Estabilidad de la respuesta del microsensar	
Integración del sistema de referencia en el microsensar de OD	
Adquisición de perfiles de OD en el interior de la biopelícula	
Conclusiones	95

Capítulo 6

Desarrollo de metodologías para la caracterización de biopelículas utilizando microsensares: transporte de materia y biocinética

Resumen	99
Introducción	101
Materiales y métodos	103
Monitorización de la biopelículas	
Modelización de la biopelícula	
Estimación de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos	
Resultados	115
Resultados del DEO para la estimación de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos	
Caracterización del transporte de materia externo	
Caracterización del transporte de materia interno	
Caracterización biocinética	
Conclusiones	133

Capítulo 7

Modelización de un bioreactor de placa plana a partir de la caracterización del transporte de materia externo e interno en biopelículas heterótrofas utilizando microsensares

Resumen	137
Introducción	139
Materiales y métodos	141
Caracterización del transporte de materia	
Cultivo de biopelículas heterótrofas	
Modelo matemático del BPP-CA	144
Suposiciones del modelo	
Balances de materia en el BPP-CA	
Resolución numérica	
Ecuaciones del modelo del BPP-CA	
Resultados	151
Estudio del transporte de materia externo	

Estudio del transporte de materia interno	
Modelización del BPP-CA	
Conclusiones	171

Capítulo 8

Estudio de biopelículas sulfuroxidantes utilizando microsensores: caracterización cinética y monitorización de lechos biológicos

Resumen	175
Introducción	177
Materiales y métodos	179
BPP-FG	
Respirómetro heterogéneo	
Modelo matemático de la biopelícula sulfuroxidante	184
Balances de materia en la biopelícula	
Resolución numérica	
Ecuaciones del modelo	
Parámetros físico-químicos del modelo	
Cinética de degradación	
Estimación de parámetros	
Resultados	191
Caracterización cinética de la biopelícula sulfuroxidante	
Monitorización del respirómetro heterogéneo	
Conclusiones	206

Capítulo 9

Desarrollo de un microsensor multi-analito basado en tecnología MEMS para el estudio y monitorización de biopelículas

Resumen	211
Introducción	213
Materiales y métodos	214
Diseño y fabricación del microsensor MEMS multi-analito	
Monitorización del OD y pH utilizando el microsensor MEMS multi-analito	
Caracterización y validación del microsensor MEMS multi-analito	
BPP-FG	
Resultados	223

Caracterización del microsensor MEMS multi-analito	
Análisis del funcionamiento del microsensor MEMS para el estudio y la monitorización de biopelículas	
Conclusiones	240
<u>Capítulo 10</u>	
Conclusiones y trabajo futuro.....	245
<u>Capítulo 11</u>	
Abreviaturas y símbolos.....	251
<u>Capítulo 12</u>	
Referencias.....	259

RESUMEN

Esta tesis se centra en el desarrollo de nuevos microsensores diseñados específicamente para la monitorización de biopelículas y en su aplicación para el estudio y caracterización de biopelículas de diferente origen (heterótrofas y autótrofas).

Utilizando tecnología de sistemas micro-electromecánicos se ha diseñado, fabricado y validado un microsensor amperométrico para la detección del oxígeno disuelto (OD), que mejora las prestaciones de los microsensores disponibles. El diseño multi-electrodo de este dispositivo permite obtener información simultánea de la concentración de OD en 8 puntos diferentes a lo largo de una biopelículas, con una excelente sensibilidad para la detección del OD y una elevada resolución espacial ($<50 \mu\text{m}$). La elevada robustez que presenta este tipo de dispositivos ha sido aprovechada para monitorizar biofiltros percoladores, obteniendo información a tiempo real de la concentración de OD en el interior de las biopelículas.

La monitorización de las biopelículas heterótrofas ha servido para cuantificar en su interior las velocidades de transporte de materia. Estos resultados han sido utilizados para incrementar el conocimiento sobre los mecanismos que intervienen en estos procesos y para establecer la relación entre estos mecanismos, las condiciones hidrodinámicas del sistema y la estructura de la biopelícula. La información obtenida en estos estudios ha demostrado la importancia de incluir la heterogeneidad de las biopelículas en la descripción del transporte de materia, y ha sido utilizada para desarrollar dos correlaciones para la estimación de las velocidades de transporte de materia en el interior de las biopelículas estudiadas.

La monitorización de biopelículas también se ha utilizado para desarrollar modelos cinéticos específicos para sustituir los modelos desarrollados en cultivos en suspensión, utilizados tradicionalmente para describir la actividad de biopelículas. A partir de la adquisición de perfiles de OD, H_2S y pH en el interior de biopelículas ha sido posible calibrar modelos cinéticos que describen con precisión la actividad de microorganismos en el interior de biopelículas heterótrofas y sulfuroxidantes.

Las medidas obtenidas con microsensores demostraron ser una excelente herramienta para validar los modelos de biofiltración y predecir con mayor precisión su

comportamiento a partir de la caracterización del transporte de materia y la biocinética. Los resultados obtenidos en la simulación demostraron que la utilización de medidas directas en el interior de biopelículas, como elementos centrales del proceso biotecnológico, aumenta la rigurosidad de los modelos de biofiltración.

La metodología desarrollada permitió diseñar un nuevo microsensor MEMS, basado en el de OD, que incorporó en un solo dispositivo la medida de OD y pH. El diseño y la fabricación del primer prototipo se modificaron para incluir una segunda matriz de electrodos para la detección potenciométrica del pH y para incorporar mejoras tecnológicas. La reducción de las dimensiones del microsensor y la protección de los electrodos hizo menos invasiva su medida y aumentó la estabilidad de su respuesta. Estas mejoras sitúan el microsensor como una herramienta de gran potencial, alternativa a los sistemas de monitorización convencionales, que permite obtener información simultánea espacial y temporal de la concentración de OD y pH en el interior de biopelículas con bajo grosor.

ABSTRACT

This thesis is focused on the development of microsensors specially designed for biofilms monitoring and on the application of these devices to study and characterize different biofilms.

Using micro-electromechanical systems (MEMS) technology, an amperometric microsensor for DO monitoring, which improves the performance of the available microsensors, has been designed, constructed and validated. The multi-electrode design of these device, allows to obtain simultaneous information about dissolved oxygen (DO) concentration at 8 different depths through a biofilm, with an excellent DO sensitivity and a high spatial resolution ($<50\ \mu\text{m}$). The high robustness exhibited by the microsensor has been exploited for the monitoring of biotrickling filters, obtaining instantaneous information of DO concentration inside biofilms.

Heterotrophic biofilms monitoring has served to quantify mass transport rates within biofilms. These results have been used to increase the knowledge of mechanisms involved in these processes and to establish the relationship between mass transport mechanisms, hydrodynamic conditions and biofilm structure. The information obtained in these studies highlighted how important is to include biofilms heterogeneity in mass transport description, and has been used in the development of two correlations for the estimation of mass transport rate within biofilms.

Biofilms monitoring has been also used in the development of specific kinetic models to replace those developed in suspension cultures, used conventionally to describe biofilms activity. From DO, H_2S and pH recorded profiles was possible to calibrate kinetic models, which accurately described the activity of heterotrophic and sulfuroxidizing biofilms.

Microsensors measurements proved to be an excellent tool to validate biofiltration models and to more accurately predict their behaviour from the characterization of mass transport and biokinetic. Results obtained during the simulations revealed that using microsensors measurements within biofilms, as central elements of bioprocess, increase the thoroughness and the ability to accurately predict the behavior of biofilms.

The developed methodology allowed to design a novel MEMS microsensor, based on DO microsensor, integrating into a single device DO and pH measurement. The design and construction of the first prototype was modified to include a second microelectrodes array to potentiometric pH detection, and some technological improvements. The reduction of microsensors dimensions and the protection of microelectrodes reduced biofilm perturbations during needle insertion and increased sensor response stability. These improvements place the microsensor as a powerful tool, and as an alternative to conventional monitoring systems, allowing obtaining simultaneous spatial and temporal information within low thickness biofilms.

Capítulo 1

Antecedentes, motivación y presentación

1. ANTECEDENTES, MOTIVACIÓN Y PRESENTACIÓN

1.1. ANTECEDENTES

El tratamiento biológico de contaminantes gaseosos, convencionalmente en biofiltros y biofiltros percoladores, es una tecnología estudiada para un amplio espectro de contaminantes (Delhoménie y Heitz 2005; Cohen 2001; Devigny y Ramesh 2005), tanto a escala laboratorio (Dorado et al. 2012; López et al. 2015) como a escala industrial (Gabriel y Deshusses 2003; Prado et al. 2009; Rodriguez et al. 2014; Santos et al. 2014). La implementación final (a escala industrial) de estos equipos ha sido posible a partir de la monitorización y el conocimiento adquirido de la fase gas y la fase líquida (Dorado et al. 2009; Kim y Deshusses 2008; Rodriguez et al. 2012), así como de la recopilación de información cinética de los microorganismos (Brouwer, Klapwijk y Keesman 1998; Munz et al. 2009; Bonilla-Blancas et al. 2015; Mora et al. 2016). Sin embargo, las reducidas dimensiones que presentan las biopelículas (desde centenares de micras hasta pocos milímetros) han impedido obtener información sobre los procesos que ocurren en su interior.

En las últimas 2 décadas se han desarrollado diferentes herramientas para medir y obtener información en el interior de las biopelículas (Denkhaus et al. 2007). Los microsensores han destacado sobre el resto de técnicas de monitorización aportando información cuantitativa sobre el funcionamiento de las biopelículas (Lee, Lim, et al. 2007; Revsbech y Jørgensen 1986; Wang y Wolfbeis 2014). Los microsensores han sido utilizados para monitorizar diferentes especies en el interior de las biopelículas (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998; Lee et al. 2011). Los resultados de monitorización han permitido obtener información cualitativa de la estructura (Melo y Frias 2004; Okabe et al. 1999; Zhu et al. 2001) y el funcionamiento (Schramm et al. 1996; Schwermer et al. 2008) de las biopelículas. Al mismo tiempo, la monitorización de las biopelículas ha permitido obtener información cuantitativa de los fenómenos de transporte de materia (Beyenal y Lewandowski 2002; Fu, Zhang y Bishop 1994; Ning et al. 2012) y de la actividad microbiana en el interior de la biopelícula (Yurt et al. 2003; Zhou et al. 2012).

La complejidad de los procedimientos experimentales necesarios para el estudio del proceso de biodegradación utilizando microsensores (Fu, Zhang y Bishop 1994; Chiu et al. 2006) junto con la necesidad de utilizar sistemas para posicionar los microsensores

con una elevada resolución espacial (de la Rosa y Yu 2006) ha impedido estudiar en profundidad la relación entre el proceso de tratamiento biológico (transporte de materia y biocinética) y los factores que lo controlan (características microbianas y condiciones hidrodinámicas de los sistemas en los que crecen).

Las limitaciones que presenta el estudio de biopelículas utilizando microsensors están siendo abordadas utilizando la tecnología de sistemas micro-electromecánicos (MEMS) para desarrollar nuevos microsensors. La utilización de técnicas de microfabricación (Gabriel et al. 2007) permite diseñar y fabricar dispositivos con una amplia gama de geometrías y disposiciones (Bonilla et al. 2011; Guimerà et al. 2013; Liu et al. 2009; del Campo et al. 2007) que pueden ser utilizados para simplificar el estudio de estos sistemas y para aumentar la información que puede obtenerse en estos estudios.

1.2. MOTIVACIÓN

La tesis que se presenta en este documento se ha realizado dentro del grupo de investigación en el Tratamiento Biológico de Contaminantes Gaseosos y Olores (TRAGASOL), en el *Departament d'Enginyeria Minera, Industrial i TIC* de la UPC (Campus Manresa). Los investigadores de este grupo han adquirido un elevado conocimiento sobre las tecnologías de biofiltración de contaminantes gaseosos de diferente origen, especializándose en la modelización de estos sistemas para optimizar la operación de los bioreactores. Sin embargo, estos modelos, que tradicionalmente también describen el comportamiento de las biopelículas, no han podido ser validados a partir de medidas en su interior, limitando el conocimiento adquirido sobre estos procesos. Por este motivo, esta tesis se centra en el desarrollo de nuevos microsensors como herramientas para avanzar en la monitorización de las biopelículas. El objetivo es utilizar los resultados de monitorización para desarrollar modelos rigurosos y precisos que permitan avanzar en la predicción del comportamiento de los bioreactores en diferentes escenarios de operación, además de ser una herramienta de extrema utilidad para el diseño, la optimización y el control de los equipos. Esta tesis se centra específicamente en el desarrollo de microsensors, basados en tecnología MEMS, y su utilización para la caracterización de los procesos que tienen lugar en el interior de las biopelículas. El objetivo final es incorporar al conocimiento general del grupo, la

información sobre los fenómenos biocinéticos y de transporte de materia adquirida utilizando estos dispositivos.

Esta tesis se ha realizado en el marco del proyecto de investigación “Monitorización, modelización y control para la optimización de biofiltros percoladores de desulfuración anóxicos y aerobios” (MICROBIOFIN), en colaboración con miembros del grupo de investigación en el Tratamiento Biológico de Efluentes líquidos y gaseosos (GENOCOV) de *Departament d’Enginyeria Química* de la UAB, y del grupo de investigación en Aplicaciones Biomédicas (GAB) del Instituto de Microelectrónica de Barcelona del CNM.

1.3. PRESENTACIÓN

En el primer capítulo de la tesis se presentan los antecedentes y la motivación de la investigación en la que se centra. A continuación, en una introducción general (capítulo 2), se describen los sistemas para el tratamiento biológico de gases, el funcionamiento de estos equipos y de las biopelículas, y la utilización de microsensores para su estudio. Justo después de la introducción, en el capítulo 3, se definen los objetivos generales y específicos en los que se centra la investigación.

En el capítulo 4 se recopilan todos los materiales y métodos utilizados en la etapa experimental de la tesis. En este capítulo se describen con detalle los sistemas experimentales utilizados para el cultivo de los microorganismos (en suspensión e inmovilizados), las diferentes técnicas analíticas utilizadas para monitorizar las principales variables de operación en estos sistemas y los procesos de microfabricación utilizados en la construcción de los microsensores.

En los capítulos 5, 6, 7, 8 y 9 se presentan los resultados obtenidos a lo largo de toda la tesis. En el capítulo 5 se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de un nuevo microsensor (basado en tecnología MEMS) diseñado específicamente para la monitorización del OD en el interior de biopelículas. Este microsensor se utiliza en los siguientes capítulos para estudiar y caracterizar biopelículas heterótrofas y sulfuroxidantes. En el capítulo 6 se desarrollan diferentes metodologías (basadas en el uso de microsensores) para caracterizar el transporte de materia externo e interno y la biocinética a partir de perfiles de OD adquiridos en el interior de la biopelícula. Estas metodologías se utilizan en el capítulo 7 para profundizar en la relación entre los

mecanismos de transporte de materia y 2 parámetros clave como la densidad de la biopelícula y las condiciones hidrodinámicas del sistema. En el capítulo 8 se utilizan los microsensores para caracterizar específicamente la biocinética de una biopelícula sulfuroxidante. En este capítulo también se evalúa el funcionamiento del microsensor desarrollado en el capítulo 5 para monitorizar una biopelícula sulfuroxidante cultivada en el interior de un biofiltro percolador. En el capítulo 9 se presentan las modificaciones realizadas sobre el microsensor MEMS de OD para monitorizar simultáneamente el OD y el pH, y para solventar las limitaciones detectadas durante el desarrollo del primer prototipo.

En el capítulo 10 se resumen las conclusiones extraídas de los resultados presentados en los capítulos anteriores, y se exponen las recomendaciones sobre la dirección que debería seguir la línea de investigación presentada en este trabajo. Finalmente en el capítulo 11 y el capítulo 12 se muestran las abreviaturas utilizadas y las referencias citadas a lo largo de todo el documento.

Capítulo 2

Introducción general

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1. TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE CONTAMINANTES GASEOSOS

Durante las últimas décadas, la creciente emisión a la atmósfera de diferentes contaminantes gaseosos se ha convertido en un grave problema ambiental, debido a los efectos adversos que genera en la salud y bienestar de los seres vivos. Una amplia gama de productos tóxicos y fuentes de contaminación atmosférica han sido identificadas por diferentes autores (Delhoménie y Heitz 2005; Devinny, Deshusses y Webster 1999; Iranpour et al. 2005). Las fuentes de contaminación de la atmósfera se clasifican generalmente en emisiones de origen natural o de origen antropogénico, mientras que los contaminantes se organizan en partículas sólidas y contaminantes gaseosos. La emisión de este tipo de contaminación tiene lugar principalmente en fuentes estacionarias, y están provocadas por actividades industriales y otras actividades antropogénicas (tratamiento de aguas residuales, vertederos y centrales para la producción de energía). En la mayoría de los casos los contaminantes emitidos consisten en una mezcla de partículas en suspensión, gases de combustión (CO_x , SO_x y NO_x), compuestos reducidos de azufre y nitrógeno (principalmente H_2S y NH_3) y compuestos orgánicos volátiles (COVs).

Los efectos dañinos de la contaminación atmosférica sobre la salud humana y el medio ambiente han sido estudiados exhaustivamente por la organización mundial de la salud (OMS) («Calidad del aire (exterior) y salud» 2014). La OMS alerta de los efectos a corto y largo plazo que la contaminación atmosférica puede ejercer sobre la salud de las personas. En este sentido, advierte que la exposición a ciertos compuestos tóxicos puede incrementar el riesgo a sufrir enfermedades respiratorias, cáncer de pulmón y enfermedades cardiovasculares. La contaminación atmosférica también contribuye a la degradación del medio ambiente. La emisión de gases de combustión y determinados COVs está acentuando el efecto invernadero (López et al. 2013; Kim, Lee y Cho 2013). Del mismo modo, la emisión de ciertos tipos de COVs (compuestos clorofluorocarbonos) es el responsable de la degradación de la capa de ozono atmosférica, así como junto los NO_x de la formación del smog fotoquímico (De Beer et al. 1997; Zhang et al. 2014). Por último, la combinación en la atmósfera de ciertos compuestos (SO_x , NO_x , H_2S) con agua, oxígeno y otras especies puede dar lugar a la formación y la precipitación de contaminantes de carácter ácido, fenómeno conocido

como lluvia ácida (Rodríguez et al. 2014; López et al. 2015). Como consecuencia, el control de este tipo de contaminación es un requisito médico y medioambiental.

Tradicionalmente, las emisiones contaminantes en fuentes estacionarias se han tratado utilizando tecnologías fisicoquímicas (Delhoménie y Heitz 2005). A pesar del elevado rendimiento que ofrecen, estas tecnologías presentan algunos inconvenientes que previenen de su utilización. La mayoría de las tecnologías convencionales presentan una elevada demanda energética, la utilización de elevadas cantidades de materias primas, así como la generación de subproductos peligrosos (Gabriel, Cox y Deshusses 2004). Por este motivo, las biotecnologías han sido estudiadas como alternativa para el tratamiento de corrientes gaseosas contaminadas.

Las tecnologías de biofiltración han demostrado ser una alternativa efectiva y fiable para el tratamiento de bajas concentraciones (inferior a $5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$) de contaminantes biodegradables y solubles, (Devinny, Deshusses y Webster 1999), y en caudales elevados, hasta $5\cdot 10^5 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ (Guieysse et al. 2008). La principal ventaja de estas tecnologías es que los contaminantes son degradados a productos inofensivos (Cox y Deshusses 1998). Además, este tipo de tecnologías presentan unos costes de inversión y operación bajos que permite abaratar el proceso de tratamiento (Estrada et al. 2011; van Groenestijn y Lake 1999). Sin embargo, el escaso conocimiento de los fenómenos que tienen lugar en el interior de estos sistemas indica que el potencial de estas tecnologías todavía está en vías de ser aprovechado (Zhou et al. 2008; Renslow et al. 2010).

2.1.1. Reactores biológicos

Las tecnologías de biofiltración se basan en el aprovechamiento de la actividad metabólica de microorganismos específicos para la biodegradación de los contaminantes (Cohen 2001). La capacidad de los microorganismos para degradar contaminantes gaseosos ha sido explotada utilizando diferentes configuraciones (tales como biofiltros, biofiltros convencionales, biolavadores o bioreactores de membrana) diseñados en función de las características de los efluentes y los contaminantes a tratar (Delhoménie y Heitz 2005; Kennes y Thalasso 1998). Sin embargo, los reactores más utilizados para el tratamiento de efluentes gaseosos son los biofiltros convencionales y los biofiltros percoladores (Iranpour et al. 2005).

Un biofiltro convencional (Figura 2.1) consiste en un reactor relleno con un material orgánico, que sirve de soporte y de fuente de nutrientes para el crecimiento de los microorganismos encargados de la biodegradación de los contaminantes. El corriente de aire a tratar se hace circular a través del lecho, forzando el contacto entre los contaminantes y los microorganismos. De este modo, los microorganismos degradan los contaminantes utilizándolos como fuente de energía para su crecimiento. La actividad metabólica de los microorganismos requiere la presencia de agua. Las condiciones de humedad óptimas del lecho se aseguran haciendo pasar el corriente de aire a través de una columna de humidificación o regando el reactor periódicamente. El riego discontinuo puede aprovecharse para suministrar nutrientes si el material de relleno presenta déficit de ellos.

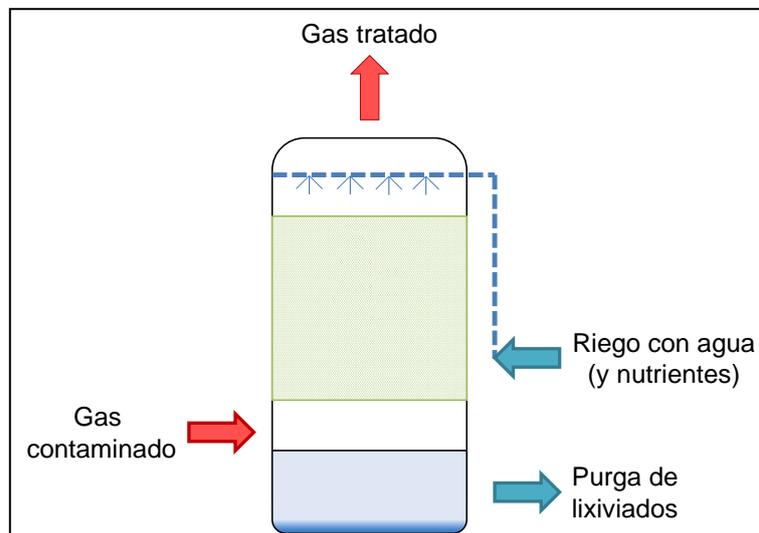


Figura 2.1. Esquema de un biofiltro convencional para el tratamiento de corrientes gaseosas contaminadas.

Los biofiltros convencionales están especialmente indicados para el tratamiento de compuestos poco solubles (constantes de Henry superiores a 1) (Kennes, Rene y Veiga 2009) debido a la ausencia de una fase líquida en continuo. Sin embargo, esta característica genera problemas cuando la degradación de los contaminantes modifica notablemente el pH o cuando la acumulación de subproductos puede afectar el proceso biológico.

La otra configuración utilizada mayoritariamente para el tratamiento de corrientes de aire contaminadas es el biofiltro percolador (Figura 2.2). En este tipo de reactores el gas contaminado también es tratado haciéndolo pasar a través de un lecho colonizado por los microorganismos encargados de la degradación de los contaminantes. Las principales diferencias que los biofiltros percoladores presentan respecto a los biofiltros

convencionales son la utilización de un material de relleno generalmente sintético (principalmente materiales cerámicos y plásticos) y la recirculación continua de una fase líquida sobre el relleno. El riego continuo permite mantener la humedad en el lecho sin necesidad de elementos adicionales, así como la eliminación de posibles subproductos perjudiciales para la actividad metabólica de los microorganismos.

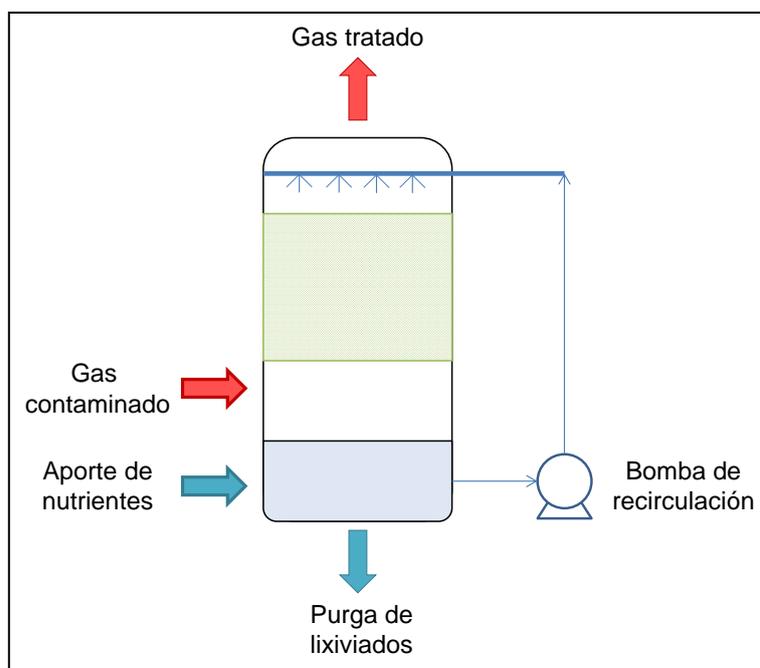


Figura 2.2. Esquema de un biofiltro percolador para el tratamiento de corrientes gaseosas contaminadas.

Los biofiltros percoladores están especialmente indicados para el tratamiento de contaminantes solubles, ya que la absorción del contaminante tiene lugar casi instantáneamente (Kennes, Rene y Veiga 2009). La complejidad en el diseño, la fabricación y la operación de este tipo de reactores es mayor, pero permiten tratar cargas de contaminantes más elevadas evitando problemas de inhibición por la acumulación de subproductos (Cox y Deshusses 1998). El principal inconveniente de este tipo de reactores es la posible colmatación del lecho provocada por la un crecimiento excesivo de los microorganismos (Dorado et al. 2012; Juhler et al. 2009) o por la acumulación de subproductos (Fortuny et al. 2010; Rodriguez et al. 2014).

2.1.2. Degradación de los contaminantes

La degradación de los contaminantes en estos reactores es un proceso complejo que incluye diversos fenómenos físicos, químicos y biológicos (Devinny y Ramesh 2005). Las corrientes contaminadas se hacen pasar a través del lecho del reactor, poniendo en contacto los contaminantes y la película biológicamente activa, denominada biopelícula.

En esta etapa los contaminantes son transferidos hasta la biopelícula. Este proceso de absorción es ligeramente diferente en los dos bioreactores (Devinny y Ramesh 2005). Mientras que en los biofiltros convencionales el contaminante se transfiere directamente desde la fase gas hasta la biopelícula, en los biofiltros percoladores la absorción de los contaminantes debe vencer una resistencia adicional provocada por la fase líquida que circula sobre la biopelícula. Una vez absorbidos, los contaminantes difunden a través de la biopelícula, donde son aprovechados como fuente de energía por los microorganismos. Los productos metabólicos de la biodegradación de los contaminantes son principalmente agua, dióxido de carbono, sales minerales y nuevos microorganismos.

El proceso de degradación ha sido estudiado a partir del análisis de los mecanismos fisicoquímicos implicados en el proceso (Dorado et al. 2009; Kim y Deshusses 2008). Sin embargo, la reducida información disponible sobre los procesos que tienen lugar en el interior de las biopelículas indica que la optimización de estas tecnologías debe abordarse desde el estudio de su funcionamiento (Ohl, Horn y Hempel 2004).

2.2. BIOPELÍCULAS

Muchos sistemas biológicos están formados por microorganismos que crecen inmovilizados sobre una superficie, formando una biopelícula. Los efectos de las biopelículas en estos sistemas varían de beneficiosos a indeseables, en función del lugar donde crecen, de los procesos que tienen lugar en su interior y de las comunidades microbianas que los estructuran (Lewandowski y Beyenal 2007). Un ejemplo de biopelículas que pueden aportar beneficios son las que crecen en los sistemas de biofiltración. Por otro lado, un ejemplo de biopelículas indeseables son aquellas que crecen en el interior de intercambiadores de calor (incrementando la resistencia a la transferencia de calor) y las que se forman sobre las prótesis implantadas (que causan graves enfermedades).

Esta tesis se centra en la investigación del funcionamiento de las biopelículas dentro de los sistemas de biofiltración. El aprovechamiento de las biopelículas en estos sistemas se basa en el análisis de la función que tienen los diferentes elementos que conforman la biopelícula (Schramm et al. 1996; Schwermer et al. 2008; Santegoeds et al. 1998) y de los procesos que tienen lugar en su interior (Horn y Hempel 1997; Hille et al. 2009; Ning et al. 2012; Yurt et al. 2003; Zhou et al. 2012). Los aspectos más

importantes sobre el funcionamiento de las biopelículas se presentan en los siguientes apartados.

2.2.1. Sistemas de biopelícula

El término biopelícula hace referencia a una colonia de microorganismos que crecen envueltos en una matriz de biopolímeros y adheridos sobre una superficie (De Beer et al. 1994). El estudio del funcionamiento de las biopelículas en sistemas para el tratamiento de contaminantes debe incluir todos los elementos que afectan su velocidad de formación, su estructura y su actividad (Horn y Lackner 2014). El conjunto de la biopelícula y estos elementos se define como un sistema de biopelícula. Los sistemas de biopelículas (Figura 2.3) están formados principalmente por 4 secciones: la superficie donde los microorganismos se adhieren (generalmente conocida como sustrato), la colonia de microorganismos o biopelícula, la solución de nutrientes (fase líquida) y el corriente de gas contaminado (fase gas).

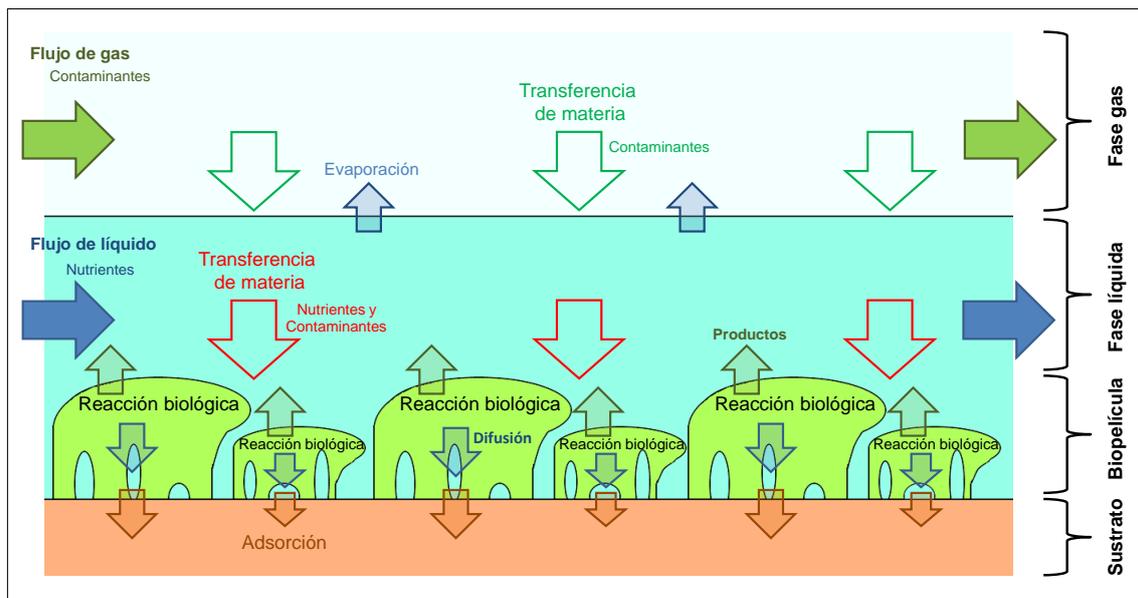


Figura 2.3. Diagrama de los elementos (compartimentos y componentes) y los procesos que conforman un sistema de biopelícula. Adaptada de Deviny y Ramesh (2005).

El estudio de los sistemas de biopelícula requiere la identificación de los componentes que conforman las diferentes secciones. El número de componentes utilizados para la descripción de cada sección puede variar en función del proceso estudiado y del nivel de detalle utilizado en el estudio (Lewandowski y Beyenal 2007). Los sistemas de biopelículas se describen generalmente considerando que la fase gas y la fase líquida están formadas por un solo componente (gas y líquido respectivamente) (Deviny y Ramesh 2005), que en la biopelícula se encuentran microorganismos,

sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y agua (Hinson y Kocher 1996), y que el sustrato está formado por un material inerte (sin considerar adsorción de contaminantes) (Dorado et al. 2008; Kim y Deshusses 2003). La descripción de los sistemas de biopelículas se completa incluyendo las especies presentes en las diferentes secciones y los procesos que participan en las interacciones entre ellas.

Los procesos físicos, químicos y biológicos que influyen la actividad de la biopelícula (crecimiento de los microorganismos) son: el flujo de nutrientes y contaminantes a lo largo de las fases gas y líquido, la transferencia de materia de éstos entre las diferentes fases y su transporte de materia en el interior de cada fase, la degradación de estas especies en el interior de la biopelícula (y la consecuente generación de productos) y la adsorción de los contaminantes sobre la superficie sobre la que crece la biopelícula (sustrato). La relación dentro de los sistemas de biopelícula de cada uno de estos procesos se detalla en la Figura 2.3. El estudio de las biopelículas se centra en los procesos que limitan la actividad y crecimiento de los microorganismos (Zhang y Bishop 1995; Horn y Hempel 1995; Wäsche, Horn y Hempel 2002). Estos procesos son principalmente el transporte de materia entre las diferentes secciones y la actividad de los microorganismos.

2.2.2. Formación y crecimiento de las biopelículas

La formación de una biopelícula se divide en diferentes etapas (Lewandowski y Beyenal 2007) (Figura 2.4). La etapa inicial es la adsorción de microorganismos individuales transportados en la fase líquida que circula sobre la superficie (sustrato) (Figura 2.4a). Después de la adhesión de las primeras bacterias, estas inician la producción de una sustancia biopolimérica extracelular (EPS) (Casey, Glennon y Hamer 2000), formada principalmente por polisacáridos y proteínas (Chiu et al. 2006; Devinny y Ramesh 2005). El carácter adhesivo las EPS facilita la adhesión de nuevos microorganismos (Figura 2.4b) y promueve la formación de una biopelícula madura (Figura 2.4c) (Wang, Liu y Tay 2005). Además, las EPS envuelven a los microorganismos formando una matriz protectora (Wang, Liu y Tay 2005; Denkhaus et al. 2007).

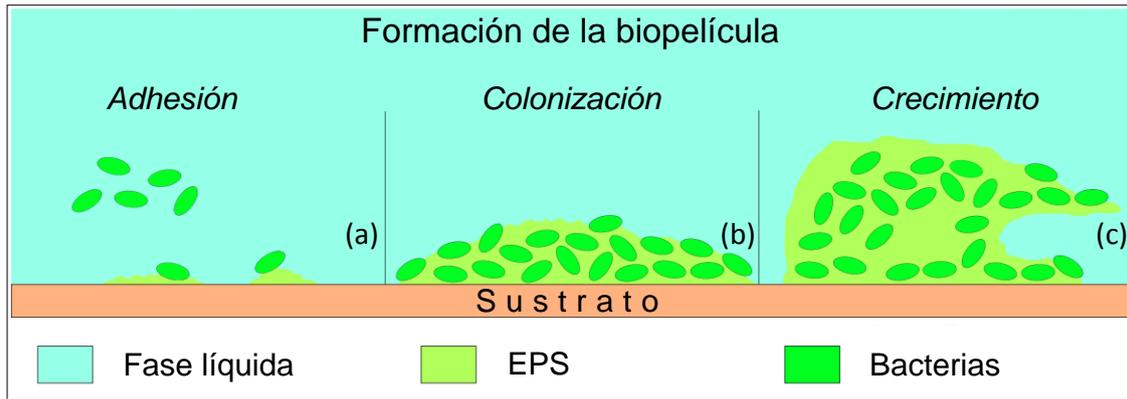


Figura 2.4. Etapas en las que se divide la formación de una biopelícula sobre una superficie (sustrato). Adaptada de Lewandowski y Beyenal (2007).

Las características de las biopelículas formadas pueden variarse controlando los factores que afectan las tres etapas de formación (Wäsche, Horn y Hempel 2002; Xu et al. 2012). En este sentido, la etapa de adhesión está controlada principalmente por las propiedades de la superficie y la velocidad de transporte de los microorganismos hasta la superficie (Yang et al. 2004). La segunda y la tercera etapa (colonización y crecimiento) están afectadas principalmente por el transporte de materia de los nutrientes, por la velocidad de crecimiento de los microorganismos y en menor medida por las propiedades de la superficie (Tan y Ng 2008; Guo et al. 2009). La probabilidad de que la adhesión sea duradera se define como eficiencia de adherencia. Este parámetro depende de diferentes factores, incluyendo las propiedades de la superficie, el estado fisiológico de los microorganismos y las condiciones hidrodinámicas en las proximidades de la biopelícula (Lewandowski y Beyenal 2007).

2.2.3. Estructura de las biopelículas

Los modelos convencionales describen la estructura de las biopelículas como una matriz de EPS con los microorganismos distribuidos uniformemente en su interior (Figura 2.5) (Zhu et al. 2001; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 1999). Estos modelos todavía son utilizados en la modelización de algunos sistemas de biopelículas (Zhang y Bishop 1994b; Hinson y Kocher 1996; Horn y Morgenroth 2006). Sin embargo, en muchas ocasiones los resultados obtenidos utilizando herramientas de monitorización de elevada resolución espacial, tales como microscopios confocales o microsensores, no pueden ser interpretados utilizando el modelo de la Figura 2.5.

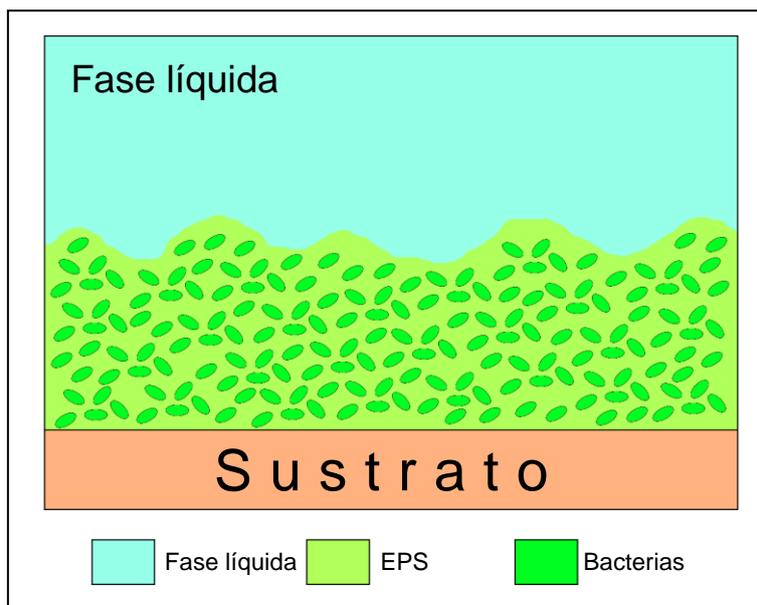


Figura 2.5. Modelo convencional de la estructura de la biopelícula que asume una distribución uniforme y aleatoria de los microorganismos en una matriz continua de EPS. Adaptada de Lewandowski y Beyenal (2007).

Los resultados obtenidos inyectando micropartículas fluorescentes en un reactor de biopelícula y analizando su sedimentación con un microscopio confocal (Drury, Stewart y Characklis 1993), revelaron las primeras incoherencias del modelo convencional. El análisis del destino de las partículas reveló que la mayoría de ellas habían sedimentado en el fondo de las biopelículas en lugar de en su superficie (como se esperaría si las biopelículas presentaran una estructura similar a la de la Figura 2.5). Estos resultados fueron interpretados considerando que las biopelículas presentaban poros y huecos en su estructura, a través de los cuales las partículas penetraron hasta la zona más profunda. La interpretación de los perfiles de concentración de nutrientes (principalmente oxígeno) adquiridos en el interior de las biopelículas utilizando microsensores (De Beer et al. 1994; Bishop, Zhang y Fu 1995; De la Rosa y Yu 2005), también mostró contradicciones con los modelos convencionales. Una estructura homogénea implica un perfil constante a lo largo de una biopelícula. Sin embargo, los resultados de monitorización de las biopelículas revelaron una distribución heterogénea de las especies a lo largo de la biopelícula (De la Rosa y Yu 2005). La medida de la velocidad de circulación del líquido utilizando imágenes de resonancia magnética en sistemas de biopelículas (De Beer, Stoodley y Lewandowski 1994; Stoodley, Lewandowski y de Beer 1994), también reveló un comportamiento distinto al esperado. Siguiendo el modelo presentado en la Figura 2.5 la velocidad del líquido debería disminuir hasta la superficie de la biopelícula donde debería alcanzar un valor de cero. Sin embargo, la distribución de velocidad de circulación demostró que la velocidad no era nula hasta

llegar al sustrato. Este comportamiento revela la existencia de canales por los que se desplaza el líquido a través de la biopelícula, confirmando la heterogeneidad de su estructura.

Todos estos fenómenos, imposibles de interpretar utilizando los modelos homogéneos, demuestran la necesidad de utilizar un modelo que describa la estructura heterogénea de las biopelículas. Los modelos utilizados para describir la estructura de las biopelículas considerando su heterogeneidad (Figura 2.6), las definen como colonias de bacterias en el interior de una matriz de EPS, separadas por huecos y poros, y con filamentos que se extienden más allá de la matriz (Rasmussen y Lewandowski 1998; De Beer, Stoodley y Lewandowski 1994). La presencia de huecos y poros forma una red de canales interconectados que facilita la circulación del agua intersticial en su interior (Beyenal y Lewandowski 2004; Stewart 2003; Okabe et al. 2002).

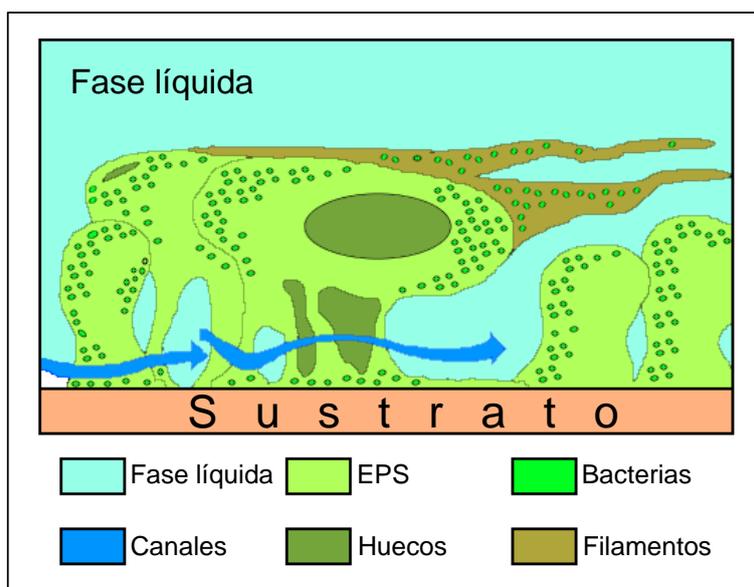


Figura 2.6. Modelo utilizado para describir la estructura heterogénea de las biopelículas. Adaptada de Beyenal y Lewandowski (2002).

La disponibilidad de un modelo adecuado para describir la estructura de las biopelículas es crucial en el estudio de los sistemas de biofiltración, ya que dicha estructura afecta la velocidad con la que los nutrientes se transportan hasta las zonas más profundas de la biopelícula y, por lo tanto, a la actividad de los microorganismos (Bishop, Zhang y Fu 1995). La estructura de la biopelícula también determina los mecanismos y las velocidades de transporte de materia (De Beer et al. 1994). Teniendo esto en cuenta, la estructura de las biopelículas debe ser estudiada para incrementar el conocimiento sobre los factores ambientales que influyen su formación (Xu et al.

2012) (principalmente las condiciones hidrodinámicas y la composición química del sistema) y la relación que mantiene con los procesos que tienen lugar en su interior (Fan et al. 1990).

2.2.4. Actividad en las biopelículas

La actividad de las biopelículas se define como la velocidad de utilización de los nutrientes por unidad de biopelícula (expresada en unidades de superficie, unidades de volumen o unidades de masa) (Lewandowski y Beyenal 2007). La actividad de las biopelículas se evalúa convencionalmente a partir del análisis de la concentración de nutrientes limitantes para el crecimiento de los microorganismos (Mirpuri, Jones y Bryers 1997; Zhou et al. 2009) o de la concentración de productos (Beyenal y Lewandowski 2004; Revsbech 2005).

El concepto de actividad de la biopelícula es especialmente importante en el estudio de los sistemas de biofiltración, ya que está relacionada con la velocidad de consumo de los contaminantes. En los biofiltros la actividad es evaluada a partir de la velocidad de consumo de los contaminantes o, en caso de no ser posible, la velocidad de consumo del aceptor de electrones en la respiración de los microorganismos que forman la biopelícula (Lewandowski y Beyenal 2007). La actividad en estos reactores se estudia y caracteriza utilizando modelos biocinéticos. Los aspectos más importantes de los modelos utilizados para describir la actividad de las biopelículas se presentan a continuación.

2.2.4.1. Cinética del crecimiento bacteriano

La cinética de crecimiento bacteriano establece la relación entre la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos y la concentración de nutrientes (Yurt et al. 2003). El crecimiento de los microorganismos de forma inmovilizada se describe a partir de los modelos utilizados convencionalmente para estudiar la actividad en cultivos en suspensión (Yurt, Sears y Lewandowski 2002) (Tabla 2.1). La correcta descripción cinética de los microorganismos que crecen en la biopelícula requiere la utilización de parámetros biocinéticos específicos (Zhou et al. 2012).

La ecuación de Monod (Ecuación 2.1) es el modelo cinético utilizado tradicionalmente para describir la cinética de las biopelículas (Zhou et al. 2009). Sin embargo, existen otros modelos cinéticos que pueden ser utilizados para correlacionar la

velocidad específica de crecimiento y la concentración de nutrientes (Yurt, Sears y Lewandowski 2002). Los principales modelos biocinéticos son la ecuación de Tessier (Ecuación 2.2), la ecuación de Moser (Ecuación 2.3) y la ecuación de Contois (Ecuación 2.4).

Tabla 2.1. Modelos cinéticos utilizados para describir la actividad de los microorganismos en biopelículas.

Modelo cinético	Ecuación	
Monod	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_m}{K_{s,m} + C_m}$	Ecuación 2.1
Tessier	$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(1 - e^{-\frac{C_m}{K_{s,m}}} \right)$	Ecuación 2.2
Moser	$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(1 + K_{s,m} \cdot C_m^{-\lambda} \right)^{-1}$	Ecuación 2.3
Contois	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_m}{B \cdot X + C_m}$	Ecuación 2.4

Donde μ es la velocidad de crecimiento de los microorganismos (s^{-1}), μ_{\max} es la velocidad de crecimiento máxima cuando la concentración de nutriente no es limitante (s^{-1}), C_m es la concentración del nutriente m ($g \cdot m^{-3}$), $K_{s,m}$ es la constante de semi-saturación para el nutriente m ($g \cdot m^{-3}$), λ es el coeficiente de Moser para el sustrato, B es la constante de Contois (g sustrato $\cdot g$ biomasa $^{-1} \cdot m^{-3}$) y X es la concentración de biomasa ($g \cdot m^{-3}$).

En algunos casos, una concentración elevada del nutriente inhibe el crecimiento de los microorganismos. En estos casos se utiliza el modelo cinético de Haldane, basado en la ecuación de Monod. La expresión de este modelo se presenta en la Ecuación 2.5.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_m}{K_{s,m} + C_m + \frac{C_m^2}{K_I}} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde K_I es la constante inhibitoria del modelo de Haldane ($g \cdot m^{-3}$). Este modelo define que existe un valor de la concentración del nutriente (representada en la constante de inhibición) a partir de la cual el crecimiento de los microorganismos se inhibe y la velocidad de crecimiento disminuye. Este modelo cinético es específico para procesos microbianos que presentan inhibición por sustrato.

2.2.4.2. Crecimiento limitado por múltiples nutrientes

Las ecuaciones presentadas en la sección anterior describen el crecimiento de microorganismos limitados por un solo nutriente. Sin embargo, a menudo la cinética de crecimiento de los microorganismos depende de la concentración de más de un nutriente (generalmente del aceptor y donador de electrones). En estos casos la opción correcta es considerar el efecto de la concentración de las dos especies en la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

Esta casuística se aborda generalmente utilizando una cinética de Monod de doble sustrato (Ecuación 2.6).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_{m1}}{K_{S,m1} + C_{m1}} \cdot \frac{C_{m2}}{K_{S,m2} + C_{b,m2}} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Donde los subíndices 1 y 2 hacen referencia a los diferentes nutrientes que limitan el crecimiento de los microorganismos.

2.2.4.3. Velocidad de utilización de nutrientes

La velocidad de consumo de nutrientes y contaminantes se define a partir de los modelos cinéticos de crecimiento. En la Ecuación 2.7 se presenta la expresión utilizada para estimar la evolución temporal de la concentración de sustratos a partir de la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

$$-\frac{dC_m}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Donde $Y_{X/S}$ es la relación entre la concentración de nutriente consumida y la concentración de microorganismos producida ($\text{g SSV} \cdot \text{g nutriente}^{-1}$). La descripción del consumo de sustrato también debe incluir el metabolismo endógeno de los microorganismos (Yurt, Sears y Lewandowski 2002). La incorporación del metabolismo endógeno en los modelos biocinéticos (Ecuación 2.8) permite incluir en el consumo global de sustrato el consumo para el mantenimiento de los microorganismos.

$$-\frac{dC_m}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} + k_d \cdot X$$

Ecuación 2.8

Donde k_d es el coeficiente de consumo endógeno ($\text{g nutriente} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

La caracterización cinética de las biopelículas consiste en la estimación experimental de los parámetros del modelo biocinético utilizado para describir su actividad (Dorado et al. 2008; Lauchnor, Semprini y Wood 2014). Una estimación fiable de estos parámetros requiere la monitorización de la concentración de sustrato en el interior de las biopelículas (Yurt et al. 2003; Zhou et al. 2009). Sin embargo, la cuantificación de los parámetros biocinéticos a partir de la medida de perfiles de concentración en el interior de las biopelículas está limitada principalmente por dos factores: (1) las dificultades técnicas para medir perfiles de concentración en el interior de las biopelículas, y (2) la falta de herramientas para discriminar el efecto de la resistencia al transporte de materia y el de la actividad de los microorganismos en los gradientes de concentración medidos (Hille et al. 2009).

Por lo tanto, la mejora del conocimiento cinético de las biopelículas debe abordar el desarrollo de nuevos microsensors que solucionen las limitaciones de los microsensors actuales para la monitorización de los reactores (Wu et al. 2005) y la obtención de información sobre el transporte de materia en el interior de las biopelículas.

2.2.5. Transporte de materia en el interior de las biopelículas

La actividad de los microorganismos en el interior de la biopelícula está limitada por la velocidad con la que los sustratos son suministrados desde la fase líquida hasta la superficie de la biopelícula (transporte de materia externo) y por la velocidad con la que estos difunden a lo largo de la biopelícula (transporte de materia interno) (Zhang y Bishop 1995; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000). De este modo, la concentración de los nutrientes y contaminantes en el interior de las biopelículas depende de la velocidad de consumo, de la velocidad de transporte de materia externo y de la velocidad de transporte de materia interno. Estos tres fenómenos definen la forma del perfil de los sustratos desde la fase líquida hasta el interior de la biopelícula, representado en la Figura 2.7.

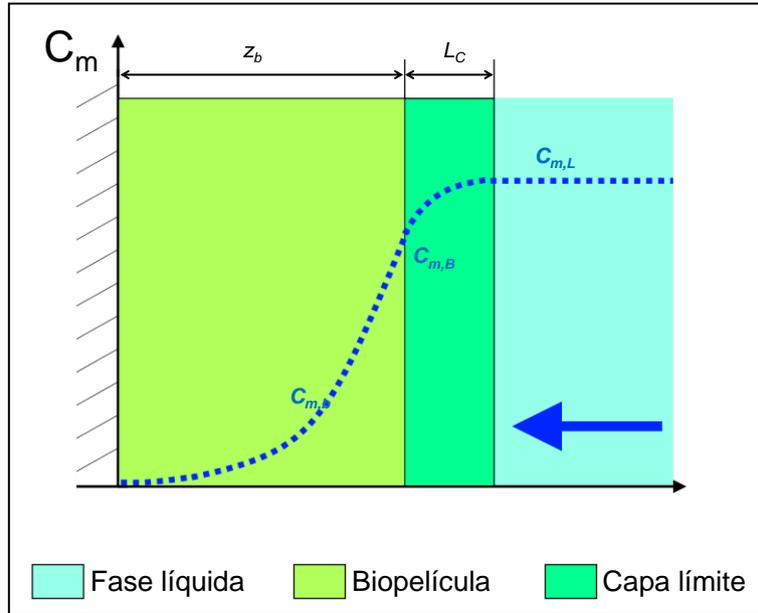


Figura 2.7. Perfil de concentración de un sustrato desde la fase líquida hasta el interior de la biopelícula. $C_{m,L}$, $C_{m,B}$ y $C_{m,b}$ representan la concentración del nutriente en la solución de nutrientes, la superficie de la biopelícula y el interior de la biopelícula respectivamente. L_C representa el espesor de la capa límite sobre la superficie de la biopelícula. El parámetro z_b hace referencia al espesor de la biopelícula.

La caracterización del funcionamiento de las biopelículas requiere una descripción precisa de los dos fenómenos de transporte de materia. Para ello, es necesario definir los mecanismos que controlan el transporte de materia. La resistencia al transporte de materia externo está provocada por la disminución de la velocidad de circulación de la fase líquida sobre la superficie de la biopelícula, que origina la aparición de una película difusiva (capa límite) (Lewandowski y Beyenal 2007; Reiss y Hanratty 1963). La mayoría de los estudios asumen que la resistencia al transporte de materia está comprendida en el interior de la capa límite (Wäsche, Horn y Hempel 2002; Horn y Hempel 1995; Zhang y Bishop 1995). Considerando esta aproximación, la velocidad de transporte de materia externo se calcula a partir del flujo de nutrientes a través de la capa límite siguiendo la Ecuación 2.9.

$$J_m = \frac{D_{m,i} \cdot (C_{m,L} - C_{m,B})}{L_C} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

Donde J_m es el flujo de nutrientes a través de la interfase líquido-biopelícula ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$), $D_{m,i}$ es el coeficiente de difusión del sustrato en el interior de la capa límite ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), $C_{m,L}$ es la concentración de nutrientes en la fase líquida ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), $C_{m,B}$ es la concentración de nutrientes en la superficie de la biopelícula ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$) y L_C es el espesor de la capa límite (m). El coeficiente de difusión y el espesor de la capa límite pueden incluirse en un coeficiente de transporte de materia ($k_{m,L}$) para simplificar la descripción del

transporte de materia externo (Reiss y Hanratty 1963). De acuerdo con esta simplificación, el $k_{m,L}$ coincide con el coeficiente de transferencia de materia parcial del líquido definido en la teoría de la doble película (Lewis y Whitman 1924). Estos modelos asumen una geometría plana de la superficie de las biopelículas, que difiere de las estructuras más complejas observadas en diferentes estudios (Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 1998, 1999). Esta contradicción indica que todavía hay una falta de conocimiento sobre los mecanismos que dirigen la transferencia de materia a través de la interfase líquido-biopelícula.

Por otro lado, la resistencia al transporte de materia en el interior de la biopelícula se define considerando que la velocidad de circulación del líquido en su interior es nula. En estas condiciones, el transporte de materia tiene lugar mediante mecanismos difusionales (Stewart 2003). De acuerdo con esta suposición, el transporte de materia en el interior de las biopelículas se describe utilizando la segunda ley de Fick (Ecuación 2.10).

$$\frac{dC_{m,b}}{dt} = D_{m,b} \frac{\partial^2 C_{m,b}}{\partial z^2} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

Donde $D_{m,b}$ es el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula para el nutriente m ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) y z es la posición en la profundidad de la biopelícula (m). La Ecuación 2.10 describe el transporte de materia considerando la biopelícula como una fase homogénea. Esta suposición entra de nuevo en contradicción con las observaciones experimentales que concluyen que el transporte de materia en el interior de la biopelícula tiene lugar por una combinación de mecanismos convectivos (en el interior de los canales de agua) y difusivos (a través de las colonias de microorganismos) (Horn y Morgenroth 2006; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000). Por este motivo, diferentes autores han estudiado la mejora de estos modelos incluyendo el efecto de la densidad de la biopelícula en el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula (Fan et al. 1990; Zhang y Bishop 1994b; Hinson y Kocher 1996; Beyenal, Seker y Tanyolaç 1997; Horn y Morgenroth 2006). Sin embargo, los modelos desarrollados no contemplan el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la velocidad de difusión. Además, la precisión de estas correlaciones empíricas debe mejorarse, ya que la mayoría de ellas fueron desarrolladas combinando resultados experimentales y teóricos.

2.2.6. Modelización de biopelículas

La modelización de los procesos físicos y biológicos en el interior de las biopelículas se ha abordado generalmente considerando que la difusión y la reacción tienen lugar en una dimensión (perpendicular al sustrato). Estos modelos se expresan generalmente a partir de la ecuación de difusión-reacción (Beyenal y Lewandowski 2002). En la Ecuación 2.11 se muestra la ecuación de difusión-reacción desarrollada utilizando un modelo cinético de Monod para describir la actividad de los microorganismos.

$$D_{m,b} \cdot \frac{\partial^2 C_{m,b}}{\partial z^2} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \cdot \frac{C_{m,b}}{K_{S,m} + C_{m,b}} \cdot X_b + k_d \cdot X_b \quad \text{Ecuación 2.11}$$

Donde X_b es la concentración de microorganismos en el interior de la biopelícula (g biomasa·m⁻³). La Ecuación 2.11 permite simular los perfiles de concentración de nutrientes en el interior de las biopelículas y ha sido utilizada ampliamente para caracterizar su biocinética a partir de medidas experimentales en su interior (Hooijmans, Geraats y Luyben 1990; Yurt et al. 2003; Zhou et al. 2008, 2009). Sin embargo, este modelo no permite simular el transporte de materia hasta la biopelícula. La calidad de las simulaciones ha sido mejorada considerando la transferencia de materia en la interfase líquido-biopelícula. El transporte de materia externo de nutrientes y contaminantes se incluye en los modelos de biopelícula relacionándolo con el transporte de materia interno, siguiendo la Ecuación 2.12. Teniendo en cuenta que en la fase líquida no hay actividad biológica, las velocidades de transporte de materia en la superficie de la biopelícula se consideran iguales.

$$k_{m,L} \cdot (C_{m,L} - C_{m,B}) = D_{m,b} \cdot \frac{\partial^2 C_{m,b}}{\partial z^2} \quad \text{Ecuación 2.12}$$

La solución de la Ecuación 2.11 y la Ecuación 2.12 para simular el comportamiento de las biopelículas requiere el conocimiento de los coeficientes de transferencia de materia y de difusión. Por lo tanto, la calidad de los modelos de biopelícula está influenciada por la precisión de estos dos parámetros. En este sentido, los microsensors han sido utilizados para estimar los dos coeficientes (Horn y Hempel 1995; Wäsche, Horn y Hempel 2002; Fu, Zhang y Bishop 1994; Ning et al. 2012). Sin embargo, las simplificaciones utilizadas en la estimación de los parámetros y la elevada complejidad de estos procedimientos ha reducido la precisión de estas estimaciones.

2.3. MONITORIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Las investigaciones de las biopelículas están enfocadas generalmente en el estudio de aspectos estructurales, de funcionamiento y ecológicos. Estos aspectos incluyen el desarrollo y crecimiento de las biopelículas, su estructura, su composición química y microbiológica y su funcionamiento en los procesos de biodegradación. El análisis de las biopelículas ha sido abordado mediante métodos microscópicos, microbiológicos, moleculares, químicos y físicos. En la Figura 2.8 se presentan los métodos analíticos más utilizados en el estudio de las biopelículas.

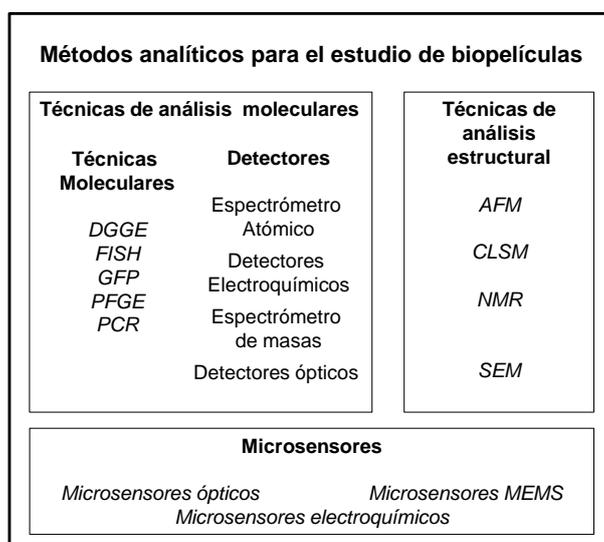


Figura 2.8. Técnicas analíticas convencionales utilizadas para el análisis de las biopelículas. DGGE (electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización), FISH (hibridación fluorescente in situ), GFP (proteína verde fluorescente), PFGE (electroforesis de gel en campo pulsado), PCR (reacción en cadena de polimerasa), AFM (microscopía de fuerza atómica), CLSM (microscopía confocal), NMR (resonancia nuclear magnética), SEM (microscopía de barrido electrónico), MEMS (sistemas micro-electromecánicos).

La aplicación de estas técnicas analíticas para la investigación de las biopelículas se presenta en las siguientes secciones.

2.3.1. Técnicas para la caracterización genética

Las técnicas de análisis molecular se aplican al estudio de las biopelículas para reconstruir la secuencia genómica de los microorganismos que las forman (Allen y Banfield 2005). Las técnicas moleculares para el análisis de las biopelículas utilizan diferentes métodos para amplificar las cadenas de ADN. Estas técnicas incluyen el rastreo de moléculas de ADN conocidas (secuencias de ADN de microorganismos tipo), electroforesis de gel en campo pulsado (PFGE), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y la reacción en cadena de polimerasa (PCR). La combinación de estas técnicas con diferentes métodos analíticos, tales como técnicas

espectroscópicas, electroquímicas y microscópicas ha sido utilizada para identificar los diferentes microorganismos que forman las biopelículas estudiadas (Aoi 2002; Wuertz, Okabe y Hausner 2004; Meays et al. 2004). Además, el rastreo de los fragmentos de ADN y su visualización en diferentes formatos de hibridación (tales como la hibridación fluorescente in situ (FISH) o proteínas fluorescentes (GFP)) ha sido utilizada para cuantificar la composición de las comunidades microbianas (Wuertz, Okabe y Hausner 2004; Meays et al. 2004; Daims, Lücker y Wagner 2006).

El rastreo de moléculas de ADN ha sido utilizado para determinar los genes que intervienen en las diferentes etapas de la formación de las biopelículas (Sauer 2003). La PFGE ha sido utilizada con este mismo objetivo, pero determinando todo el genoma que interviene en la formación de las biopelículas (Meays et al. 2004). Por otro lado, las técnicas basadas en la PCR y en la DGGE han sido utilizadas para identificar los microorganismos presentes en las biopelículas. Para ello, los fragmentos de ADN amplificados son analizados y comparados con los resultados de diferentes bases de datos (Lassalle et al. 2001; Meays et al. 2004; Lyautey et al. 2005; Burr et al. 2006).

La principal desventaja de estas técnicas es la necesidad de disponer de una base de datos donde figuren los fragmentos de ADN encontrados, y donde se relacionen estos fragmentos con microorganismos específicos (Daims, Lücker y Wagner 2006; Loy 2003). Además, estas técnicas sólo ofrecen información del ecosistema que forman las biopelículas estudiadas y no permiten avanzar en la cuantificación de los procesos que tienen lugar en el interior de las biopelículas.

2.3.2. Técnicas para la caracterización estructural

Las técnicas para la caracterización estructural de las biopelículas han sido utilizadas para mejorar el conocimiento del comportamiento fisiológico de las biopelículas. Con este objetivo se han desarrollado diferentes métodos ópticos que han sido utilizados para examinar y caracterizar la estructura de las biopelículas (Wolf, Crespo y Reis 2002).

Estas técnicas han adquirido un gran interés en los últimos años. Sin embargo, las características de las biopelículas limitan la penetración de la luz en su interior, dificultando el uso de métodos ópticos. En este sentido, las técnicas utilizadas para la caracterización estructural de las biopelículas sólo ofrecen información cualitativa sobre

las características superficiales de las biopelículas, pero no permiten relacionar su estructura y su funcionamiento. Los métodos más utilizados en el estudio de las características estructurales de la biopelícula se describen a continuación.

2.3.2.1. Microscopía confocal (CSLM)

La microscopía confocal (CSLM) ha sido utilizada en el estudio de biopelículas vivas y completamente hidratadas (Lawrence y Neu 2003). Los resultados obtenidos utilizando CSLM ofrecen información en 3 dimensiones de la estructura de las biopelículas, y utilizando diferentes técnicas de fluorescencia (Zhang y Fang 2001; Neu, Woelfl y Lawrence 2004) permiten identificar los diferentes componentes presentes en su interior. En este sentido diferentes estudios han utilizado esta técnica para caracterizar el contenido en EPS de las biopelículas (Neu, Woelfl y Lawrence 2004; Strathmann, Wingender y Flemming 2002).

2.3.2.2. Microscopía de barrido electrónico (SEM)

Los microscopios ópticos convencionales han sido utilizados para analizar biopelículas mediante procedimientos simples no invasivos (Cortizo y de Mele 2003). Estos estudios han sido completados estudiando la heterogeneidad estructural de las biopelículas a partir de su disección y su examinación utilizando microscopios de barrido electrónico (Stewart et al. 1995).

2.3.2.3. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una de las técnicas microscópicas más utilizadas en el estudio de las biopelículas. La AFM ha sido utilizada para obtener imágenes de las biopelículas con dimensiones desde la escala atómica hasta los centenares de micras. Estas medidas han permitido caracterizar la topología superficial de las biopelículas (Hansma et al. 2000).

2.3.2.4. Resonancia nuclear magnética (NMR)

Las técnicas basadas en la resonancia nuclear magnética (NMR) se han limitado a estudiar las propiedades del agua en el interior de biopelículas vivas. Estos estudios han permitido caracterizar la porosidad de las biopelículas (Paterson-Beedle et al. 2001), y el flujo de líquido en la superficie y en el interior de las biopelículas (Manz et al. 2003; Seymour et al. 2004). Estas herramientas también han sido utilizadas para estudiar el

contenido y la movilidad de los EPS en el interior de las biopelículas (Mayer, Lattner y Schurks 2001; Schürks et al. 2002; Lattner, Flemming y Mayer 2003).

2.3.3. Microsensores

Los microsensores utilizados para el estudio de biopelículas son dispositivos electroquímicos y ópticos miniaturizados, con tamaños de punta por debajo de los 50 μm (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998). El pequeño tamaño de la punta ofrece una elevada resolución espacial que es indispensable para la monitorización de las biopelículas. Debido a sus reducidas dimensiones y el escaso consumo de analito que presentan, los microsensores han sido utilizados para estudiar el flujo de diferentes especies en el interior de las biopelículas (Revsbech y Jørgensen 1986). Estos resultados ofrecen información cuantitativa sobre los procesos que tienen lugar en el interior de las biopelículas y han sido utilizadas para caracterizar el transporte de materia y el consumo de nutrientes en el interior de las biopelículas (Ning et al. 2012; Zhou et al. 2012).

Los microsensores más utilizados pueden dividirse en dos grupos: microsensores electroquímicos y microsensores ópticos. El elevado coste y fragilidad de los microsensores electroquímicos (Wu et al. 2005) junto con la complejidad operacional de los microsensores ópticos (Klimant, Meyer y Kuhl 1995) limita la utilización de estos dispositivos para el estudio de biopelículas. Por este motivo, ha emergido un nuevo tipo de microsensores, basados en tecnología de sistemas micro-electromecánicos (MEMS), que ofrece la posibilidad de resolver la mayoría de estas limitaciones. En las siguientes secciones se presenta una breve revisión de los diferentes microsensores disponibles para la monitorización de biopelículas.

2.3.3.1. Microsensores electroquímicos

Microsensores amperométricos

Los microsensores amperométricos se basan en la medida de la corriente eléctrica generada por la reacción electroquímica del analito en la superficie de los electrodos (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998; Denkhaus et al. 2007; Lewandowski y Beyenal 2007). La corriente generada, medida utilizando un pico-amperímetro, es proporcional a la concentración de analito. La reacción electroquímica de detección está impulsada por la diferencia de potencial aplicada entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia.

Los microsensors amperométricos se dividen en dos grupos: microsensors de primera y de segunda generación (Lewandowski y Beyenal 2007). En la Figura 2.9 se muestra el principio de funcionamiento de estos dos tipos de microsensors amperométricos. En estos microsensors el sistema electroquímico de detección, formado por un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, se encuentra aislado del medio de medida por una membrana permeable al analito.

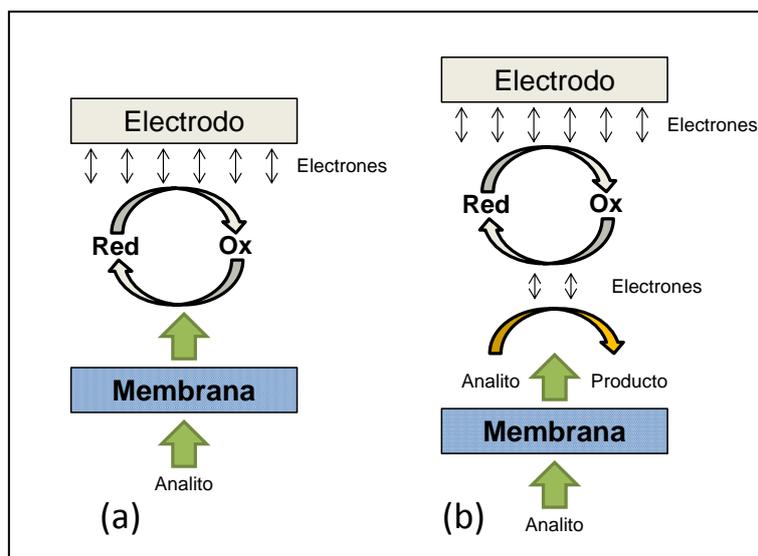


Figura 2.9. Principio de funcionamiento de los microsensors amperométricos de primera generación (a) y segunda generación (b).

En los microsensors de primera generación (Figura 2.9a) los analitos atraviesan la membrana del microsensor y son oxidados o reducidos sobre la superficie de trabajo. Los microsensors amperométricos de primera generación presentan limitaciones ya que no todas las especies con interés analítico pueden ser reducidas o oxidadas sobre un electrodo (Lewandowski y Beyenal 2007). En este sentido, este tipo de microsensors sólo ha sido desarrollado para la detección del OD (Revsbech y Jörgensen 1986), el H_2 (Ebert y Brune 1997) y el HClO (De Beer, Srinivasan y Stewart 1994).

Los microsensors de segunda generación (Figura 2.9b) incorporan un mediador redox. Esta sustancia es capaz de oxidar o reducir el analito de interés, y a su vez es oxidado o reducido sobre el electrodo de trabajo. Estas sustancias actúan como catalizadores, siendo regenerados en la reacción electroquímica de detección. Este sistema ha permitido desarrollar microsensors amperométricos para la detección del H_2S (Kühl et al. 1998) y N_2O (Revsbech et al. 1988).

En la Tabla 2.2 se detallan las las características principales de los microsensors amperométricos disponibles para la monitorización de biopelículas.

Tabla 2.2. Resumen de los microsensors amperométricos más relevantes.

Analito	Descripción		Referencia
	Microsensor amperométrico de 1ª generación		
O ₂	Electrolito	Solución salina (KCl 3M)	(Revsbech y Jørgensen 1986)
	Ánodo	Electrodo de Ag/AgCl	
	Cátodo	Oro o platino	
	Potencial de polarización	-0.80 V (vs. Ag/AgCl)	
	Microsensor amperométrico de 2ª generación		
H ₂ S	Electrolito	Fe(CN) ₆ ³⁻	(Kühl et al. 1998)
	Ánodo	Platino	
	Cátodo	Platino	
	Potencial de polarización	+0.1 V	
	Microsensor amperométrico de 2ª generación		
N ₂ O	Electrolito	Ascorbato sódico	(Revsbech et al. 1988)
	Ánodo	Electrodo de Ag/AgCl	
	Cátodo	Plata	
	Potencial de polarización	-1.175 V (vs. Ag/AgCl)	
	Microsensor amperométrico de 1ª generación		
H ₂	Electrolito	Solución salina (KCl 3M)	(Ebert y Brune 1997)
	Ánodo	Platino	
	Cátodo	Electrodo de Ag/AgCl	
	Potencial de polarización	+0.6 V (vs. Ag/AgCl)	
	Microsensor amperométrico de 1ª generación		
HCIO	Electrolito	Solución salina (KCl 3M)	(De Beer, Srinivasan y Stewart 1994)
	Ánodo	Electrodo de Ag/AgCl	
	Cátodo	Platino	
	Potencial de polarización	+0.20 V (vs. Ag/AgCl)	

Microsensors potenciométricos

Los microsensors potenciométricos se basan en la separación de la carga de los iones a través de una membrana (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998; Denkhaus et al. 2007). La diferencia de potencial (ΔE) generada a los dos lados de la membrana puede calcularse utilizando la ecuación de Nernst (Ecuación 2.13).

$$\Delta E = \frac{R \cdot T}{z_e \cdot F} \cdot \ln \frac{a_i}{a_e}$$

Ecuación 2.13

Donde R es la constante de los gases ideales ($8.31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T es la temperatura absoluta (K), z_e es la carga del ion, F es la constante de Faraday ($96.49 \cdot 10^3 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), a_i y a_e son la actividad de los iones en la muestra y en la solución electrolítica respectivamente. Considerando la actividad de la solución electrolítica (a_e) constante, la diferencia de potencial a través de la membrana es proporcional a la actividad de los iones en la muestra (a_i) y por lo tanto también a su concentración.

Este principio de funcionamiento ha sido utilizado en el desarrollo de microsensors redox (Bishop, Zhang y Fu 1995), microsensors de vidrio para la detección del pH (Revsbech y Jørgensen 1986), microsensors de intercambio iónico para la detección de NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+ (de Beer y Van Den Heuvel 1988; de Beer y Sweerts 1989; Lee y de Beer 1995) y microsensors de membrana sólida para la detección de S^{2-} (Kühl y Jørgensen 1992).

Fabricación de los microsensors electroquímicos

Las características físicas de los microsensors están definidas por la necesidad de penetrar en el interior de la biopelícula sin modificar su estructura y sin perturbar la actividad de los microorganismos (Revsbech y Jørgensen 1986). En este sentido, los microsensors son herramientas estrechas y alargadas con puntas pequeñas en el extremo de detección (Lewandowski y Beyenal 2007). Estas características incrementan la fragilidad de estos microsensors y hacen imposible su fabricación en masa (Lu y Yu 2002). Este tipo de microsensors electroquímicos se construyen artesanalmente a partir de capilares de vidrio (Lewandowski y Beyenal 2007). El conocimiento y la precisión (dimensiones de orden las micras) requerida incrementa el coste de estos dispositivos (Wu et al. 2005).

2.3.3.2. Microsensors ópticos

Los microsensors ópticos están fabricados a partir de fibras de vidrio que recogen y conducen la luz desde la punta del sensor hasta el equipo de medida. El sistema experimental necesario para la utilización del microsensor es sofisticado, incluyendo una fuente de luz, filtros para la selección de la longitud de onda deseada, un divisor de haz y un fotomultiplicador como detector (Klimant, Meyer y Kuhl 1995).

Los microsensors ópticos han sido desarrollados recientemente para ser utilizados como alternativa a los microsensors electroquímicos, ya que ofrecen ventajas como una fácil fabricación y una elevada robustez. Éstos se basan en la medida de los cambios en las propiedades de la luz (luminiscencia y absorción) que se dan en la muestra debido a la interacción entre el analito y el haz de luz en la punta del microsensor. Existen tres tipos de microsensors ópticos disponibles para el estudio de biopelículas: microsensors ópticos de OD (Klimant, Meyer y Kuhl 1995; Beyenal et al. 2000), de temperatura (Klimant et al. 1997) y de pH (Kohls et al. 1997). Este tipo de sensores presentan tiempos de respuesta inferiores a 5 s. Sin embargo, este tipo de dispositivos presentan diferentes inconvenientes que han limitado su utilización. La luz ambiental genera interferencias en la adquisición y transmisión de la señal. Los microsensors ópticos requieren la generación de radiaciones monocromáticas dentro del espectro visible (Grist, Chrostowski y Cheung 2010). Estas fuentes no son económicas y además la fabricación de fuentes portátiles que proporcionen una radiación estable no ha sido optimizada. A las limitaciones de la tecnología, se le añaden las dificultades técnicas para fabricar microsensors ópticos con tamaños de punta que no dañen la estructura de las biopelículas durante su monitorización (Denkhaus et al. 2007). Este problema está provocado por el rápido deterioro de los microsensors cuando se disminuye el tamaño de las fibras (Lewandowski y Beyenal 2007).

2.3.3.3. *Microsensors MEMS*

Las limitaciones que presentan los microsensors electroquímicos y ópticos pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos microsensors y nuevos métodos de fabricación que las resuelvan. Por este motivo, el uso de tecnología microelectrónica para el diseño de mini-transductores electroquímicos ha cobrado interés en el campo de los microsensors (Lee et al. 2011). Esta tecnología permite la fabricación de dispositivos microsensors utilizando diferentes materiales (Liu et al. 2007; del Campo et al. 2007), y ofrece una elevada versatilidad que permite el diseño de dispositivos a la carta (microelectrodos con una elevada gama de geometrías y disposiciones) (Godino et al. 2009; del Campo et al. 2014; Prehn et al. 2011). Esta tecnología ha sido utilizada en el desarrollo de microsensors para la monitorización en el interior de biopelículas del OD (Lee, Lim, et al. 2007; Liu et al. 2007; del Campo et al. 2007), el pH (Prats-Alfonso et al. 2013; Lee et al. 2011; Ges et al. 2005; Marzouk et al. 1998), el PO_4^{3-} (Lee et al. 2009, 2011) y el Cl_2 total (Lee et al. 2011). Estas características convierten estos

dispositivos en opciones altamente atractivas para competir con los microsensors convencionales en el estudio de biopelículas. En la Tabla 2.3, se presentan los principales microsensors desarrollados utilizando tecnologías MEMS para la monitorización de biopelículas.

Tabla 2.3. Resumen de los microsensors basados en tecnología microelectrónica disponibles para la monitorización de biopelículas.

Analito		Descripción	Referencia
O ₂	Principio de funcionamiento	Amperométrico	(Lee, Lim, et al. 2007; del Campo et al. 2007; Liu et al. 2007)
	Electrodo de trabajo	Oro o platino	
	Electrodo de referencia	Electrodo de Ag/AgCl	
pH	Principio de funcionamiento	Potenciométrico	(Prats-Alfonso et al. 2013; Lee et al. 2011)
	Electrodo de trabajo	Óxido de iridio	
	Electrodo de referencia	Electrodo de Ag/AgCl	
Redox	Principio de funcionamiento	Potenciométrico	(Lee, Seo, et al. 2007)
	Electrodo de trabajo	Oro	
	Electrodo de referencia	Electrodo de Ag/AgCl	
PO ₄ ³⁻	Principio de funcionamiento	Potenciométrico	(Lee et al. 2009, 2011)
	Electrodo de trabajo	Cobalto	
	Electrodo de referencia	Electrodo de Ag/AgCl	
Cl ₂ total	Principio de funcionamiento	Amperométrico	(De Beer, Srinivasan y Stewart 1994; Lee et al. 2011)
	Electrodo de trabajo	Oro	
	Electrodo de referencia	Electrodo de Ag/AgCl	

Esta tecnología presenta un elevado potencial, todavía no explotado, para el desarrollo de microsensors específicos para la monitorización de biopelículas. En este sentido, la tendencia de los microsensors MEMS se ha dirigido hacia el diseño de dispositivos basados en matrices de microelectrodos (MEA) (Lee et al. 2011; Liu et al. 2007), que ofrecen la posibilidad de monitorizar simultáneamente diferentes analitos en diferentes puntos de la biopelícula.

Capítulo 3

Objetivos

3. OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis son *el desarrollo de un microsensor para la monitorización biopelículas heterótrofas y sulfuroxidantes y el desarrollo de metodologías para la caracterización de estas biopelículas a partir de los resultados obtenidos en su monitorización*. Los objetivos específicos en los que se desglosan estos objetivos generales se presentan a continuación.

- Utilizar procedimientos de microfabricación para solventar las limitaciones que presentan los microsensors convencionales.
- Desarrollar un microsensor de OD y pH, diseñado específicamente para la monitorización de biopelículas utilizando procedimientos de microfabricación.
- Desarrollar metodologías basadas en el uso de microsensors para la caracterización de los mecanismos de transporte de materia y la biocinética en el interior de biopelículas.
- Establecer la relación entre las velocidades de transporte de materia (externo e interno), la estructura de las biopelículas y las condiciones hidrodinámicas.
- Calibrar el modelo cinético de una biopelícula sulfuroxidante a partir de los perfiles de OD, H₂S y pH adquiridos en su interior.
- Validar los modelos de biopelícula desarrollados a partir de los resultados obtenidos en el interior de las biopelículas utilizando microsensors.
- Avanzar en la monitorización de biofiltros percoladores utilizando el microsensor MEMS para el seguimiento del OD en el interior de las biopelículas.

Capítulo 4

Materiales y métodos generales

4. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

4.1. DESCRIPCIÓN DE LOS EQUIPOS

Los reactores utilizados para el cultivo de las poblaciones heterótrofas y autótrofas, además de los sistemas experimentales para su operación se detallan a continuación.

4.1.1. Cultivo de biomasa en suspensión

La biomasa sulfuroxidante (consorcio de microorganismos sulfuroxidantes) se extrajo de un biofiltro percolador para la desulfuración aerobia a escala laboratorio (López et al. 2015). La biomasa fue cultivada en un fermentador a escala laboratorio (Figura 4.1) (Minifors, Infors HT, Suiza) antes de su inoculación en un reactor a escala laboratorio diseñado específicamente para el desarrollo de biopelículas. El fermentador se operó en continuo.

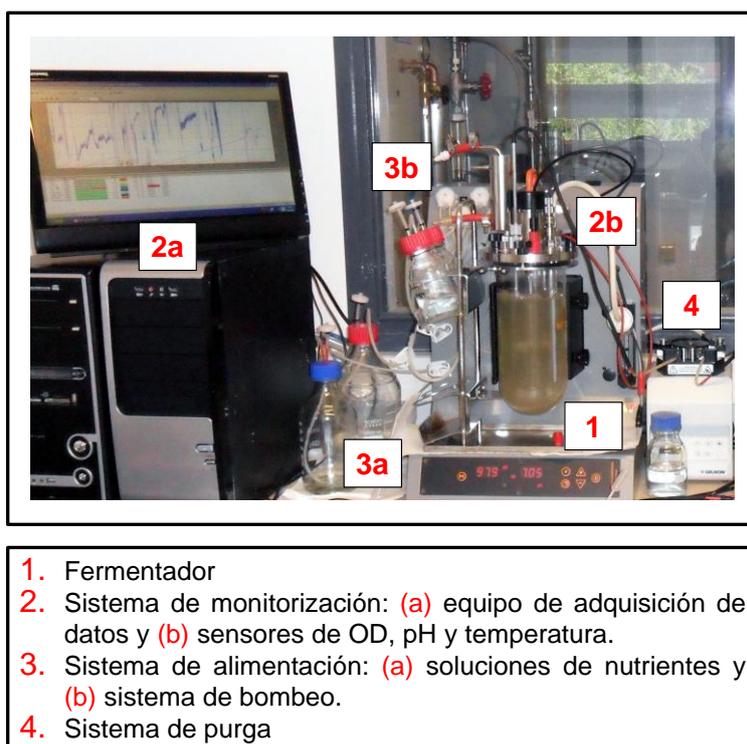


Figura 4.1. Imagen del sistema experimental (fermentador) utilizado en el cultivo de la biomasa sulfuroxidante en suspensión.

La biomasa se cultivó en condiciones aerobias utilizando como sustrato: tiosulfato (durante la etapa de aclimatación) y sulfuro (durante la operación en continuo) con una concentración de $3.5 \text{ g S}\cdot\text{L}^{-1}$. El fermentador incluye en el mismo equipo todos los elementos necesarios para la monitorización y el control de su operación. Los principales elementos que constituyen el sistema experimental son: el vaso del reactor,

el sistema de monitorización y control de temperatura y pH, los sistemas de alimentación y purga, y el sistema de adquisición. A continuación se presenta información detallada de los diferentes elementos.

4.1.1.1. Fermentador

El elemento principal del sistema experimental es el reactor. El reactor está formado por un vaso de borosilicato y una tapa de acero inoxidable. Las características del reactor se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características de fabricación del fermentador utilizado en el cultivo de la biomasa en suspensión.

Volumen de trabajo		1.8 L
Material de construcción	Vaso	Vidrio (borosilicato)
	Cubierta	Acero inoxidable (316 L)
	Elementos de la cubierta	Acero inoxidable (316 L)
Agitación		Agitador mecánico de doble aspa (palas planas)
Sistema de aireación		Burbujeador (tubería perforada)
Elemento calefactor		Resistencia eléctrica

El fermentador fue esterilizado antes de su inoculación utilizando un autoclave de laboratorio (Stericlav-75, Raypa, España). La esterilización se llevó a cabo utilizando vapor de agua a alta presión (1 bar manométrico) y temperatura (121°C) en un ciclo de 30 minutos. La correcta esterilización del equipo se controló utilizando tiras indicadoras para vapor (Comply 1250, 3M, USA).

4.1.1.2. Monitorización y control de pH, OD y temperatura

La concentración del OD, el pH y la temperatura en el interior del fermentador se monitorizaron en continuo. Los tres parámetros se monitorizaron mediante un sensor de pH (405-DPAS-SC-K8S, Mettler Toledo, Suiza), un electrodo de OD (Oxyferm FDA 225, Hamilton, Suiza) y una sonda de temperatura (Sonda Pt1000, Infors, Suiza). El sistema de adquisición de los tres sensores está incorporado en el cuerpo del fermentador, y las tres señales transmitidas fueron registradas en un ordenador utilizando un programa específico (Iris 6, EMPA, Suiza).

El fermentador incluye sistemas de control para las tres variables. El control de pH se llevó a cabo utilizando un control PID (pre-sintonizado). El pH del reactor se ajustó a

pH 7.00 utilizando dos bombas peristálticas incluidas en el fermentador para adicionar soluciones diluidas (0.1 M) de HCl y NaOH a través de los dos puertos de entrada disponibles. La adición de la solución de HCl se realizó utilizando un capilar plástico (introducido en el puerto de muestreo) para evitar el deterioro del reactor, ya que el acero inoxidable puede oxidarse en contacto con sulfuro en pH ácidos, formando sulfuro de hierro. La temperatura se controló utilizando un lazo de control *on-off*, activando la calefacción del reactor cuando la temperatura medida por la sonda era inferior a la consigna (30°C). Por último, el reactor dispone de lazo de control (PID) para la concentración de OD en el reactor, que regula la velocidad de giro de la agitación mecánica para ajustar la concentración de OD. Sin embargo, este lazo de control se inhabilitó durante el cultivo de la biomasa, y la velocidad de agitación se mantuvo en un valor (70 rpm) que evitase problemas para el crecimiento de los microorganismos.

4.1.1.3. Operación del fermentador

La operación del reactor se dividió en dos etapas, una etapa de operación en semi-continuo después de la inoculación y una etapa de operación en continuo pasadas 72 horas. Las principales diferencias entre las dos etapas fueron la recirculación de la purga y el sustrato alimentado. En este sentido, después de su inoculación, el reactor se operó alimentando una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como sustrato, para evitar la acumulación de sulfuro en el reactor que puede provocar problemas de inhibición. Durante este período el reactor se operó recirculando la biomasa presente en la purga para evitar la pérdida del inóculo. Pasadas 72 horas se observó un incremento en la actividad de los microorganismos, después del cual se pasó a alimentar el sustrato en forma de $\text{Na}_2\text{S} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($27.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y a operar el reactor en continuo. Durante las dos etapas, la velocidad de dilución se estableció en 47 horas para evitar problemas de lavado de la biomasa.

La purga del reactor se llevó a cabo controlando el nivel del reactor por rebosamiento. Para ello se utilizó un puerto de muestreo y una bomba peristáltica adicional (Miniplus 3, Gilson, Francia).

4.1.2. Cultivo de biomasa inmovilizada

Las biopelículas heterótrofas y sulfuroxidantes utilizadas en la validación de los microsensores y en el estudio de los fenómenos de transporte de materia y biocinéticos se desarrollaron utilizando diferentes tipos de reactores de biopelícula. Estos reactores se describen en detalle a continuación.

4.1.2.1. Bioreactor de placa plana de canal abierto

Las biopelículas heterótrofas se cultivaron en un bioreactor de placa plana de canal abierto (BPP-CA). Este reactor se diseñó específicamente para favorecer la formación de biopelículas planas, con espesores prácticamente homogéneos a lo largo del reactor, para facilitar su estudio mediante microsensores.

El sistema experimental utilizado en la operación del bioreactor (Figura 4.2) se diseñó para reproducir el funcionamiento de un biofiltro percolador. El sistema experimental permitió operar el reactor en un amplio rango de condiciones de tiempo de residencia de la fase líquida (TRL) y velocidad de recirculación (v_L), controlando las condiciones hidrodinámicas dentro del régimen laminar (hasta un Re de 8).

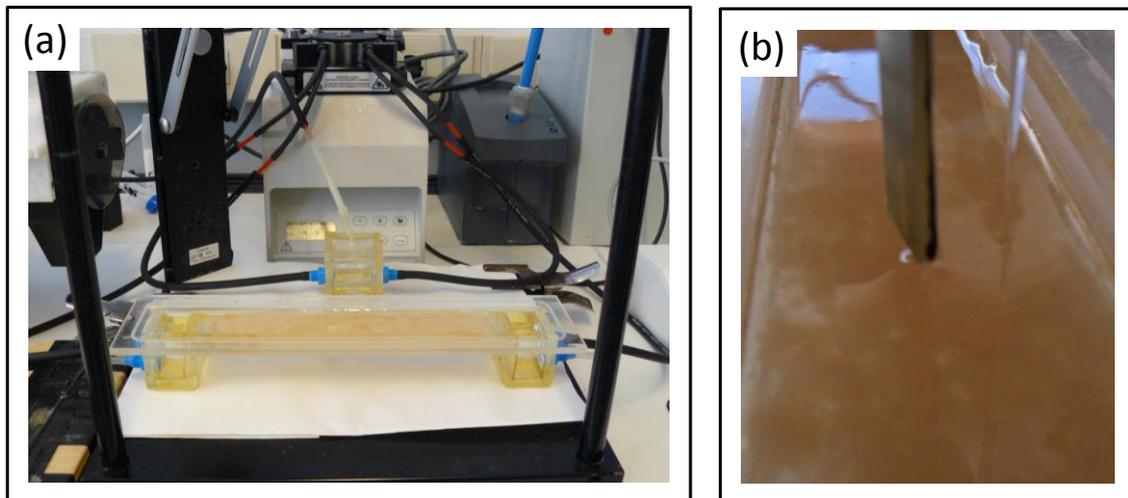


Figura 4.2. (a) Imagen del sistema experimental utilizado en la operación del bioreactor de placa plana de canal abierto. (b) Detalle de la monitorización de la biopelícula utilizando diferentes tipos de microsensores.

El sistema experimental del BPP-CA está formado por el bioreactor, el sistema utilizado para alimentar el reactor con la solución de nutrientes y para la recirculación de la fase líquida, y los elementos utilizados para la monitorización y control del reactor. La posición de los diferentes elementos en el sistema experimental se detalla en el diagrama presentado en la Figura 4.3.

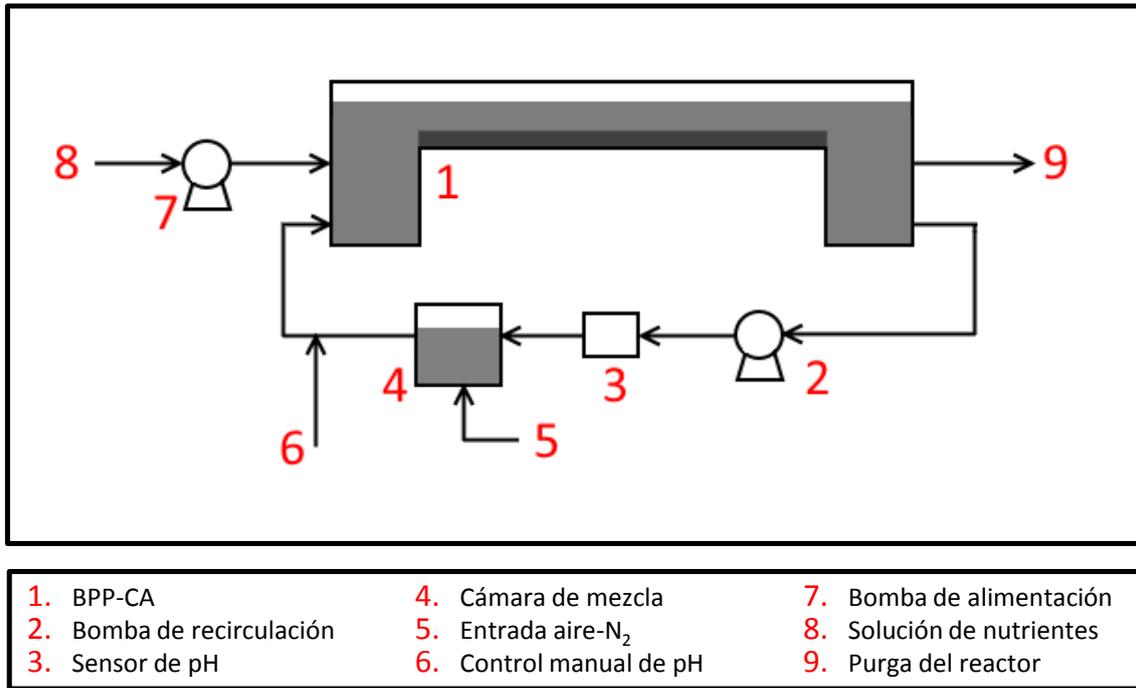


Figura 4.3. Diagrama detallado del sistema experimental utilizado en la operación del bioreactor de placa plana de canal abierto.

El bioreactor de placa plana de canal abierto es el elemento principal del sistema experimental. El BPP-CA, fabricado en metacrilato transparente (PMMA), se diseñó de acuerdo con Lewandowski y Beyenal (2007) y consiste en un canal abierto de 20 cm de longitud, 3.5 cm de ancho y 1.3 cm de profundidad. El reactor también incorpora dos tanques (50 mL) en la entrada y la salida de la placa plana para mantener constante el nivel de líquido (espesor de la película de líquido sobre la biopelícula) a lo largo del reactor. Estos tanques se utilizan para realizar la alimentación y la purga del reactor y para recircular la fase líquida.

Inicialmente, las biopelículas se desarrollaron en el bioreactor cultivando la biomasa inoculada en condiciones aerobias. El reactor se alimentó con una solución de nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos y el desarrollo de las biopelículas heterótrofas. La alimentación se realizó utilizando una bomba peristáltica (MCP Standard, Ismatec, Alemania). Esta misma bomba se utilizó para realizar la purga del reactor. La solución de nutrientes se preparó a partir de un medio mineral típico para microorganismos heterótrofos, utilizando glucosa como única fuente de carbono y energía (con una concentración de 13 g·L⁻¹). La composición del medio mineral y de la solución de elementos traza utilizados en la preparación de la solución de nutrientes se presenta en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Composición del medio mineral y la solución de elementos traza utilizadas en la preparación de la solución de nutrientes para los microorganismos heterótrofos.

Medio mineral		Solución de elementos traza	
Compuesto	Concentración [g·L ⁻¹]	Compuesto	Concentración [g·L ⁻¹]
KH ₂ PO ₄	1	HCl	6.76 mL
K ₂ HPO ₄	1	FeCl ₂ ·4H ₂ O	1.5
NH ₄ Cl	1	H ₃ BO ₃	0.06
NaCl	1	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1
MgSO ₄	0.2	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.12
CaCl ₂	0.02	ZnCl ₂	0.07
Elementos traza	1 mL	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.026
pH	6.5-7	Cu ₃ Cl ₂ ·2H ₂ O	0.016
		MoO ₄ ·2H ₂ O	0.026
		EDTANa ₄ (H ₂ O) ₄	5.2

La recirculación de la fase líquida en el reactor se llevó a cabo utilizando una segunda bomba peristáltica (Miniplus 3, Gilson, Francia). Tal y como se observa en el diagrama presentado en la Figura 4.3, la línea de recirculación incluye una cámara de mezcla que se utilizó para controlar manualmente la concentración de OD y el pH en la entrada del reactor.

La concentración de OD en la entrada del reactor se ajustó burbujeando mezclas de aire y nitrógeno. El pH se analizó periódicamente en la línea de recirculación utilizando un medidor portátil (Crison pH 25+, Crison, España). Esta medida se utilizó para controlar manualmente el pH en el reactor añadiendo soluciones diluidas (1 M) de HCl y NaOH en la cámara de mezcla.

La puesta en marcha del reactor se llevó a cabo en 3 etapas. En la primera etapa se esterilizaron el reactor y el resto de elementos del sistema experimental. La esterilización se llevó a cabo recirculando durante 1 hora una solución al 30 % de NaOCl, y enjuagando el reactor con agua Milli-Q. A continuación se procedió a inocular el reactor. El reactor se sembró con 35 mL de lodo (2 g SSV·L⁻¹) procedentes de un bioreactor a escala piloto para la eliminación biológica de materia orgánica, nitrógeno y fósforo (Guerrero, Guisasola y Baeza 2011). La inoculación se completó rellenando el volumen restante (115 mL) con medio mineral y operando el reactor en discontinuo durante 24 horas, después de las cuales se pasó a operar en continuo. En la última etapa de la puesta en marcha, el reactor se operó ajustando el tiempo de

residencia del líquido y la velocidad de recirculación dentro del rango típico de operación de biofiltros percoladores (Devinny, Deshusses y Webster 1999), de 4 h a 12 h y de $1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ a $20 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivamente

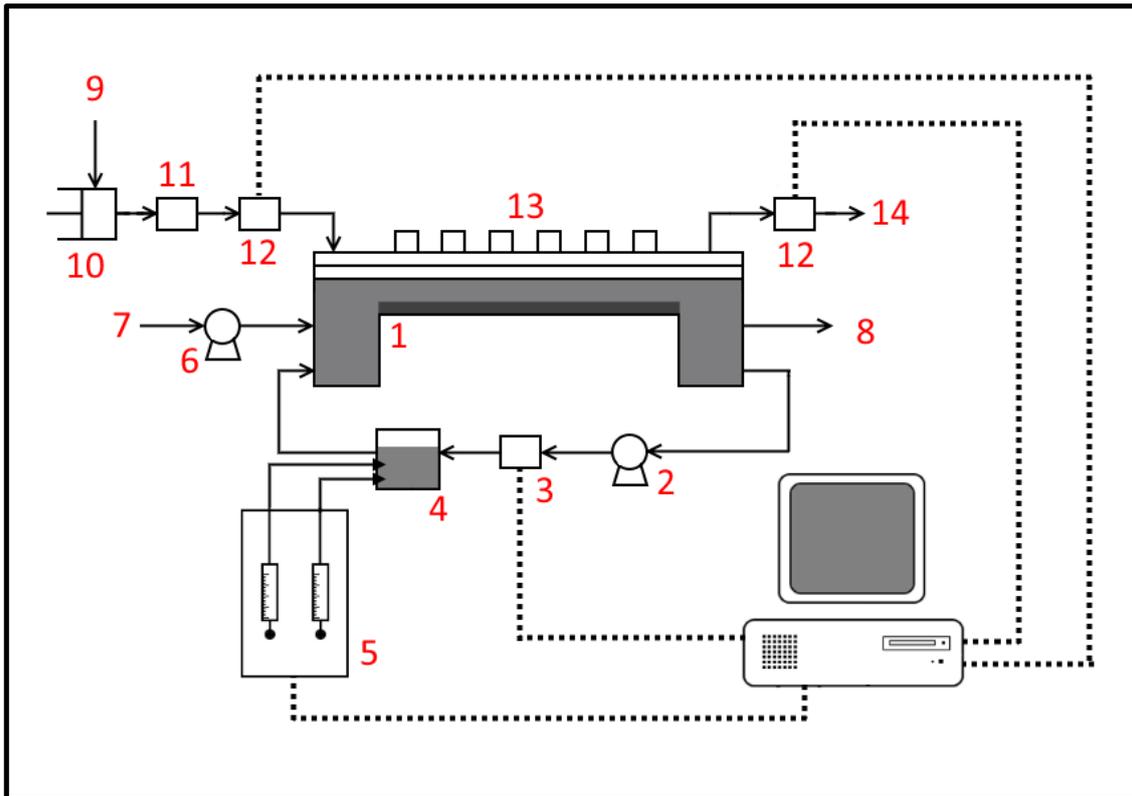
Durante la operación del reactor también se monitorizaron la concentración de glucosa en la fase líquida utilizando un refractómetro (Refracto 30GS, Mettler Toledo, Suiza) y la concentración de biomasa en el interior de la biopelícula a partir del análisis de la concentración de proteína siguiendo el método de Bradford (Bradford 1976).

4.1.2.2. Bioreactor de placa plana en fase gas

Las biopelículas sulfuroxidantes utilizadas para el estudio de la cinética de biodegradación del H_2S se cultivaron en el bioreactor de placa plana modificado. Este bioreactor se operó reproduciendo las condiciones de un biofiltro percolador para la desulfuración aerobia. Para ello, el BPP-CA se redimensionó para incluir la circulación del gas sobre la película de líquido y se incluyó una tapa para asegurar su estanqueidad. El bioreactor de placa plana en fase gas (BPP-FG) se operó en condiciones aerobias, alimentando como sustrato H_2S en la fase gas. El diseño del reactor, siguiendo el concepto del BPP-CA, también favoreció la formación de biopelículas planas y de espesor prácticamente homogéneo lo largo del reactor. Estas características facilitaron la utilización de microsensores para la obtención de perfiles de concentración en su interior.

Las principales novedades en el sistema experimental del BPP-FG fueron la incorporación de dos sensores para monitorizar la concentración de H_2S en la entrada y la salida del corriente de gas, un compresor para forzar la circulación de la fase gas, un rotámetro en la entrada del reactor para ajustar el caudal de gas y la implementación de un lazo de control automático para el pH de la fase líquida. El lazo de control se implantó a partir de un sistema de monitorización para el pH y una microbureta para la adición de reactivos.

El sistema experimental del BPP-FG está formado por el bioreactor, el sistema utilizado para la alimentación y la recirculación de la fase líquida en el reactor, el lazo de control para el pH, el sistema para la alimentación de la fase gas en el reactor y los elementos para la monitorización de la fase gas. La posición en el sistema experimental de los diferentes elementos se muestra en el diagrama de la Figura 4.4.



- | | | |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1. BPP-FG | 6. Bomba de alimentación | 10. Compresor entrada |
| 2. Bomba de recirculación | 7. Solución de nutrientes | 11. Rotámetro entrada |
| 3. Sensor de pH | 8. Purga del reactor | 12. Sensor de H ₂ S |
| 4. Cámara de mezcla | 9. Alimentación de la fase gas | 13. Puertos de muestreo |
| 5. Microbureta | | 14. Salida del gas |

Figura 4.4. Diagrama detallado del sistema experimental utilizado en la operación del bioreactor de placa plana en fase gas.

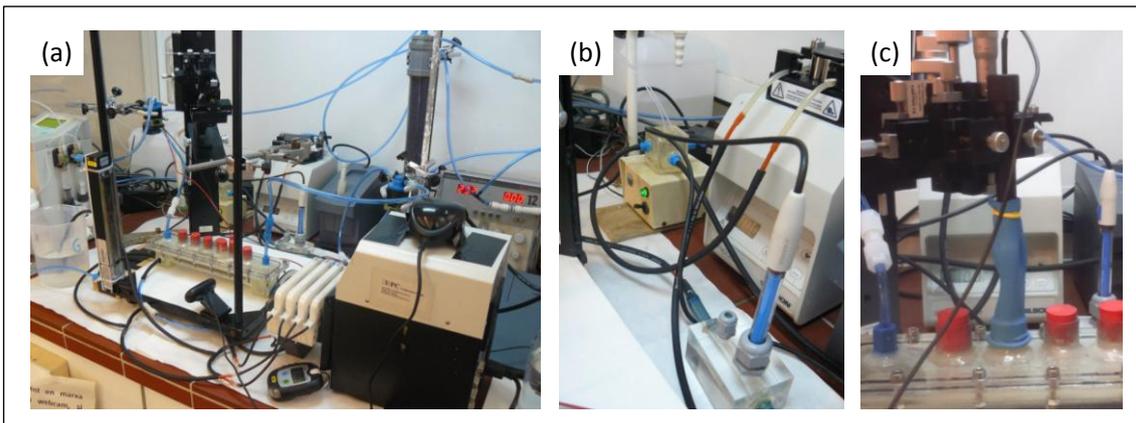


Figura 4.5. (a) Imagen del sistema experimental utilizado en la operación del bioreactor de placa plana en fase gas. (b) Detalle de lazo de control de pH del reactor. (c) Detalle del procedimiento experimental utilizado para la monitorización de la biopelícula utilizando microsensores.

El bioreactor de placa plana en fase gas es el elemento principal del sistema experimental. El bioreactor se diseñó reproduciendo las dimensiones del BPP-CA, aumentando la profundidad del canal abierto hasta 3.5 cm. El volumen de la fase gas y

la fase líquida resultado del redimensionado fue de 140 mL y 125 mL respectivamente. El diseño del bioreactor se completó con una tapa para evitar fugas de gas y líquido durante su operación. Sobre la tapa del reactor se dispusieron 6 puertos de muestreo para la monitorización de la biopelícula utilizando microsensores.

La alimentación y la recirculación de la fase líquida en el reactor se llevó a cabo tal y como se presentó, para el BPP-CA, en la sección 4.1.2.1. En este caso, la fase líquida se alimentó con una solución de medio mineral específica para microorganismos sulfuroxidantes, utilizando NaHCO_3 (con una concentración de $3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fuente de carbono. La composición del medio mineral se muestra en la Tabla 4.3. La composición de la solución de elementos traza es la misma que se detalla en la Tabla 4.2.

Tabla 4.3. Composición del medio mineral, específico para microorganismos sulfuroxidantes, utilizado para la alimentación del BPP-FG.

Medio mineral	
Compuesto	Concentración [g·L ⁻¹]
KH_2PO_4	0.3
K_2HPO_4	0.3
NH_4Cl	2
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4
$\text{CaCl}_2\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.064
Elementos traza	2 mL
pH	6.5-7

El lazo para el control del pH en el bioreactor se incluyó en la línea de recirculación. Teniendo en cuenta que el BPP-FG sigue el modelo de un reactor de flujo pistón (Prades et al. 2015), el lazo de control para el pH (en la Figura 4.5) se desarrolló incluyendo un tanque pulmón de 50 mL de volumen en la línea de recirculación. El pH se monitorizó en continuo en la entrada del reactor (línea de recirculación) utilizando un electrodo de pH (SenTix 81, WTW, Alemania) conectado a un sistema de adquisición de laboratorio (Inolab 740, WTW, Alemania). Esta medida se utilizó para controlar el pH en el tanque pulmón, situado justo antes del sensor (en la línea de recirculación). Utilizando un controlador de lógica difusa (programado en una interface de Labview) (Prades et al. 2014) se adicionaron soluciones diluidas (1 M) de HCl y NaOH en el tanque pulmón utilizando una microbureta dispensadora (Multi-burette 2S, Crison,

España). Este sistema de control permitió mantener un pH de 7.00 ± 0.10 en la entrada del reactor.

La alimentación del H_2S (sustrato) en la fase gas se realizó desde una bolsa Tedlar de 25 L, preparada con una concentración conocida de H_2S (diluida en aire). La impulsión de la mezcla de gas hasta la entrada del reactor se realizó utilizando una bomba peristáltica (Masterflex 772002, Cole-Parmer, USA). El caudal de gas en la entrada del reactor se ajustó y monitorizó utilizando un rotámetro calibrado para aire a 1 atm y $25^\circ C$ (062-01 SA, Cole-Parmer, USA). La concentración de H_2S en la entrada y salida del reactor se monitorizó en línea con un sensor electroquímico (Surecell-H2S-L, Sixth Sense, Reino Unido), utilizando una tarjeta de adquisición de datos (NI USB-6501, National Instruments, USA) para adquirir y representar la señal en la interface programada en Labview.

La puesta en marcha del reactor se realizó siguiendo el protocolo presentado en la sección 4.1.2.1. La alimentación de H_2S en el reactor se inició pasadas 24 horas, conjuntamente con la alimentación de medio mineral. La concentración alimentada se aumentó progresivamente, desde 20 ppm_v hasta 200 ppm_v, para evitar problemas de inhibición en la actividad de los microorganismos sulfuroxidantes. En esta etapa el bioreactor se operó con una v_L de $3.4 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ un TRL de 6 horas y un TRG de 75 s, dentro de los rangos típicos de operación de biofiltros percoladores. Durante la operación del reactor también se monitorizaron la concentración de sulfato y la concentración de biomasa en la biopelícula, utilizando cromatografía iónica y análisis de proteína respectivamente.

4.1.2.3. Respirómetro heterogéneo

La biopelícula sulfuroxidante se cultivó sobre el lecho de un respirómetro heterogéneo (Figura 4.7a), reproduciendo las condiciones de crecimiento de un biofiltro percolador industrial.

Los elementos que constituyen el sistema experimental utilizado para la operación del respirómetro heterogéneo son: el BFP, el sistema de impulsión de las fases gas y líquido, y el sistema para la monitorización y el control del reactor. La posición de los diferentes elementos en el bioreactor se detalla en el diagrama de la Figura 4.6.

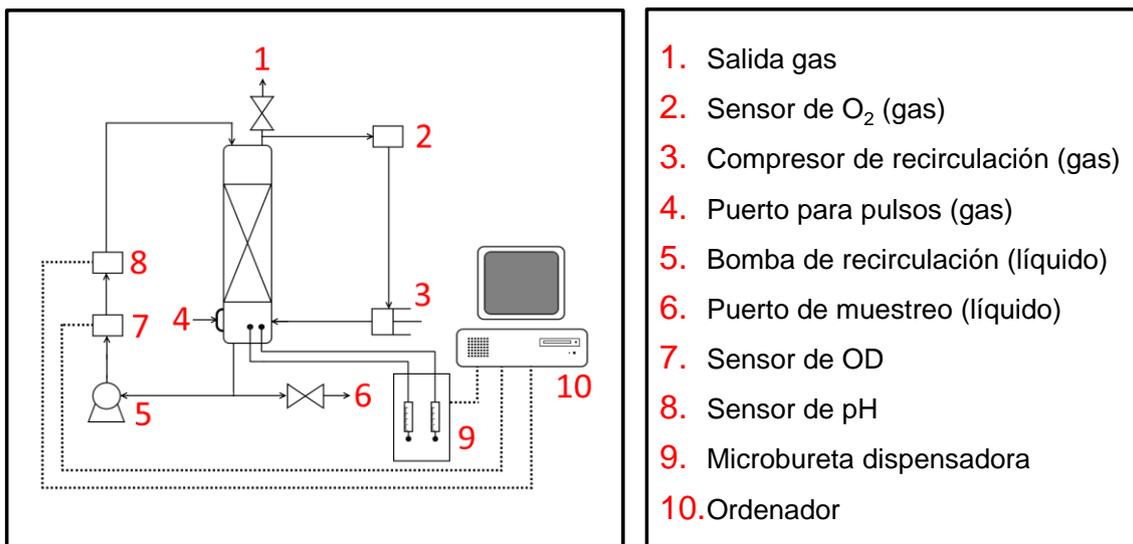


Figura 4.6. Diagrama detallado del sistema experimental utilizado en la operación del respirómetro heterogéneo.



Figura 4.7. (a) Imagen del sistema experimental que conforma el respirómetro heterogéneo. (b) Detalle de la columna del BFP.

El principal elemento del sistema es el bioreactor, de 50 cm de altura y 6 cm de diámetro, fabricado en PVC transparente. El lecho biológico, formado por anillos plásticos tipo Pall de 16 mm de diámetro, ocupaba una altura de 26 cm de columna (volumen útil de 0.73 L). La parte inferior de la columna, de 4 cm de altura, se utilizó como decantador para la fase líquida (volumen de 126 mL), mientras que la parte superior de la columna, de 20 cm de altura, se utilizó como reservorio de la fase gas (volumen de 630 mL).

Este bioreactor se diseñó específicamente para caracterizar la actividad de los microorganismos mediante respirometría (Bonilla-Blancas et al. 2015), por este motivo su operación difiere de la de los BFP convencionales. En este sentido, el bioreactor se

diseño para operar en modo discontinuo, utilizando un compresor de gas (Gas pump 3112, Boxer, Reino Unido) y una bomba peristáltica (Masterflex 77200, Cole-Parmer, USA) para recircular en contra-corriente la fase gas y la fase líquida respectivamente.

La operación del reactor se llevó a cabo monitorizando el pH, la temperatura, el OD en la recirculación de la fase líquida y el porcentaje de oxígeno en la fase gas. El pH y la temperatura se monitorizaron utilizando un electrodo de pH con una sonda de temperatura integrada (SenTix 82, WTW, Alemania), mientras que el OD se monitorizó utilizando un sensor galvánico (CelloX 325, WTW, Alemania). La adquisición y almacenamiento de la señal de estos dos sensores se realizó en continuo utilizando el mismo equipo de adquisición (Inolab Multi 740, WTW, Alemania). El pH de la fase líquida se controló adicionando automáticamente soluciones diluidas (1 M) de HCl y NaOH con una microbureta de dispensación (Multi-burette 2S-D, Crison, España). La concentración de oxígeno en la fase gas se midió en línea, utilizando un sensor electroquímico (SIDOR module OXOR-P, Sick, Alemania). La monitorización del reactor se completó monitorizando puntualmente la concentración de OD en la biopelícula y la concentración de sulfato en el decantador. Para ello, el reactor incorporó un puerto de muestreo sobre la columna, que permitió la inserción de un microsensor de OD en la biopelícula, y un puerto de muestreo en el decantador para la extracción de muestras de líquido que fueron analizadas por cromatografía iónica. Por último, el BTF también incorpora un puerto adicional para la inyección de pulsos de sustrato en la fase gas.

4.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las técnicas utilizadas en el análisis de la concentración de proteína en la biopelícula, la concentración de sólidos volátiles de los inóculos, la concentración de glucosa y de especies iónicas (aniones) de la fase líquida, se presentan a continuación.

4.2.1. Determinación de la concentración de proteína celular

Las muestras de biomasa extraídas de la biopelícula (0.1 mL) se analizaron siguiendo el método presentado en Bradford (1976). Este método se basa en la reacción de la proteína contenida en las muestras con un reactivo específico (Bradford Reagent (B6916), Sigma-Aldrich, Alemania), dando lugar a un producto de color azul. La intensidad de la coloración azul de las diferentes muestras se analizó por

espectrofotometría UV-Vis (Lambda 25, Perkin Elmer, USA). El valor de la absorbancia se utilizó para cuantificar la concentración de proteína en las muestras. El método se calibró utilizando albúmina (Bovine Serum Albumin (A9418-10G), Sigma-Aldrich, Alemania) como patrón. La recta de calibrado se utilizó para determinar el rango de respuesta lineal.

4.2.2. Sólidos en suspensión volátiles

Los sólidos en suspensión volátiles (SSV) de las muestras de biomasa se analizaron para calcular su concentración de biomasa. Los sólidos en suspensión totales (SST) y los SSV se analizaron siguiendo los métodos estándar (APHA 1998). De acuerdo con estos métodos, una alícuota de las muestras de biomasa (de volumen conocido) se filtró utilizando filtros de fibra de vidrio de 0.7 μm (GF/F grade, Whatman, USA) pesados previamente (P_1). Después de esto, los filtros se secaron a una temperatura de 105°C hasta observar un peso constante (P_2). El incremento de peso de los filtros está provocado por la materia orgánica e inorgánica en suspensión presente en la muestra. La relación entre el incremento de peso (P_2-P_1) y el volumen de la alícuota permite determinar la concentración de SST. Después de esta etapa, los filtros se calcinaron a una temperatura de 550°C durante 30 minutos. La pérdida de peso después de la calcinación (P_3) se atribuye a la eliminación de la materia orgánica retenida en el filtro. La relación entre la pérdida de peso de los filtros (P_2-P_3) y el volumen de las alícuotas determina la concentración de SSV.

4.2.3. Concentración de glucosa

La concentración de glucosa en la fase líquida se midió determinando el índice de refracción utilizando un refractómetro electrónico de laboratorio (Refracto 30GS, Mettler Toledo, Suiza). Los valores de índice de refracción se transformaron a la escala Brix, que define el porcentaje de sólidos disueltos en el líquido. Estableciendo la relación entre la escala de Brix y la concentración de glucosa permite utilizar esta medida para cuantificar el contenido en glucosa de las muestras (Grondin-Perez, Benne y Chabriat 2006). El método se calibró preparando diferentes patrones, de concentración entre 0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, y midiendo su índice de refracción.

4.2.4. Concentración de iones

La concentración de sulfato y tiosulfato en la fase líquida de los reactores se analizó mediante cromatografía iónica. Teniendo en cuenta las especificaciones del cromatógrafo (Ion Pac AS9-HC, Dionex, USA), las muestras se prepararon para reducir su conductividad por debajo de $1 \text{ mS}\cdot\text{cm}$ y para eliminar las partículas de tamaño superior a $0.22 \text{ }\mu\text{m}$. La conductividad de las muestras se midió utilizando una sonda portátil (Multi 3420, WTW, Alemania). Las muestras se filtraron utilizando filtros de jeringa de $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ (Millex Syringe Units PTFE 25 mm, Millipore, Alemania). Los análisis se llevaron a cabo inyectando en la columna 2 mL de muestra, utilizando carbonato de sódico 9 mM como eluyente (Sodium carbonate anhydrous, ACS, Fisher Scientific, USA), con un caudal de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Los resultados de cromatografía iónica se analizaron relacionando el área de los diferentes iones presentes en el cromatograma con su concentración. Para ello, se analizaron patrones de concentración conocida de los aniones de interés. En este caso, los patrones se prepararon utilizando sales extra puras de sulfato de sodio (Na_2SO_4 extra pure, Scharlau, España) y tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ extra pure, Scharlau, España). Los patrones, de concentración entre $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se prepararon siguiendo el mismo procedimiento descrito para las muestras.

4.3. PROCESOS DE FABRICACIÓN MICROELECTRÓNICA

Los nuevos microsensores presentados a lo largo de la tesis fueron fabricados en las instalaciones de sala blanca del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM). Estas instalaciones permitieron mantener controladas las condiciones de temperatura, humedad, presión y partículas en suspensión en el aire, durante la fabricación de los dispositivos.

Los dispositivos microelectrónicos se desarrollaron utilizando tecnología de sistemas micro-electromecánicos (MEMS). Esta tecnología se basa en la deposición de capas finas (en el orden de nanómetros y micrómetros) de diferentes materiales y permite fabricar dispositivos con detalles en la escala de micrómetros. Las técnicas de microfabricación se dividen en técnicas de deposición o crecimiento, de fotolitografía y de grabado. Los procesos utilizados en la fabricación de los microsensores MEMS presentados en esta tesis se presentan a continuación.

4.3.1. Técnicas de deposición y crecimiento

4.3.1.1. Crecimiento térmico

La utilización de una oblea de silicio como sustrato, para la fabricación de los microsensores, requirió la modificación de su superficie para darle propiedades dieléctricas. Para ello, se utilizó un proceso de crecimiento térmico, en el que el sustrato se oxidó a óxido de silicio utilizando oxígeno y agua como agentes oxidantes, mientras la oblea se calentaba entre 1000°C y 1300°C.

La pasivación de los dispositivos utilizando oxinitruro de silicio, se llevó a cabo mediante una etapa de crecimiento térmico en la que la capa de silicio depositada se oxidó utilizando nitrógeno y amoníaco como oxidantes. En el crecimiento del oxinitruro de silicio, las obleas se sometieron a una temperatura de 380°C.

Los diferentes procesos de crecimiento térmico se desarrollaron en un horno (ASMaster-2000 RTCVD furnace, Annealsys, Francia) situado en las instalaciones de sala blanca del IMB-CNM. Este horno permitió controlar exhaustivamente el flujo de gases reactivos y la temperatura, asegurando un crecimiento uniforme de las capas.

4.3.1.2. Procesos de deposición catódica

La deposición de las capas de Ti-Ni-Au sobre las obleas de silicio se llevó a cabo utilizando un proceso de pulverización catódica (*sputtering*). Esta técnica permitió la deposición de capas finas de los metales con un espesor controlado (10 nm). El sistema utilizado consiste en una cámara de vacío con un cátodo y un ánodo en su interior. La matriz del metal a depositar y las obleas se sitúan en el cátodo y el ánodo respectivamente. Los átomos de metal se extraen de la matriz bombardeándola con un flujo de plasma. Los átomos de metal liberados se depositan seguidamente sobre el sustrato situado en el ánodo.

El espesor y las características de las capas depositadas se controlaron variando las condiciones de vacío (entre 1 mbar y 10^{-3} mbar). La mejora de las condiciones de vacío en la cámara durante la deposición de las capas metálicas redujo la contaminación de la capa y mejoró su adherencia.

4.3.1.3. Evaporación térmica en vacío

La deposición de las capas de Ti-Au sobre la oblea de Kapton (película de poliamida de entre 100 μm y 200 μm de espesor) se realizó mediante un procedimiento menos agresivo para el sustrato. Las capas de metal se depositaron utilizando un procedimiento de evaporación en vacío, que permitió controlar exhaustivamente el espesor y las características de las capas. En este caso, el sistema utilizado consiste en una cámara de vacío donde se sitúan la matriz de metal y las obleas. Los átomos de metal se evaporan bombardeando la matriz con un haz de electrones, y posteriormente se transportan hasta el sustrato donde tiene lugar la nucleación y el crecimiento de la capa fina. La pureza de las capas de metales es un parámetro crítico en este procedimiento. En este sentido la homogeneidad elemental de las capas depositadas se mejoró trabajando en unas condiciones de vacío por debajo de 10^{-9} mbar.

4.3.1.4. Deposición de fotoresinas por centrifugación

La deposición de las fotoresinas utilizadas en la fotolitografía y en la pasivación de los microelectrodos (utilizando SU-8), se realizó utilizando un procedimiento de centrifugación. El recubrimiento por centrifugación de las fotoresinas consistió en su deposición, en estado líquido, sobre el sustrato que gira a una velocidad controlada. La velocidad de rotación, la aceleración y la viscosidad de la fotoresina (en estado líquido) define el espesor de la capa depositada. Después de su deposición las resinas se curaron exponiéndolas a radiación UV.

4.3.2. Fotolitografía

La deposición de las diferentes capas de metales y dieléctricos se realizó sobre la superficie de toda la oblea. La geometría de las diferentes capas se definió mediante un proceso de fotolitografía. En este proceso los motivos del sensor, definidos en la etapa de diseño, se transfirieron a la oblea utilizando una máscara. Las máscaras son láminas de cuarzo sobre las que, utilizando una capa de cromo, se definen los detalles del sensor.

El proceso fotolitográfico utilizado en la fabricación de los microsensores varió en función del método utilizado para grabar los motivos. En este sentido se utilizaron fotoresinas positivas cuando los motivos se definieron mediante un grabado húmedo, y fotoresinas negativas cuando se utilizó un método de grabado indirecto. La principal diferencia entre los dos tipos de resina es su reacción al ser irradiadas con luz UV. Las

fotoresinas positivas solubilizan la zona irradiada con luz UV, y las fotoresinas negativas polimerizan la zona irradiada.

Las diferentes etapas del proceso fotolitográfico se muestran en la Figura 4.8. El primer paso en el proceso fotolitográfico consiste en la deposición de una resina fotosensible, que varía su solubilidad al ser irradiada con luz UV. A continuación, las máscaras se alinean sobre la oblea, que es irradiada con luz UV. La irradiación provoca la disolución de la resina en las zonas que no se desean transferir. Esta resina es eliminada sumergiendo la oblea en una solución alcalina (revelado). De esta manera los motivos definidos en la máscara son transferidos a la resina depositada.

En la siguiente etapa del proceso de microfabricación, las zonas no protegidas por la fotoresina son atacadas mediante alguno de los procesos de grabado descritos en la siguiente sección. Por último la resina es eliminada de la superficie de la oblea (decapado).

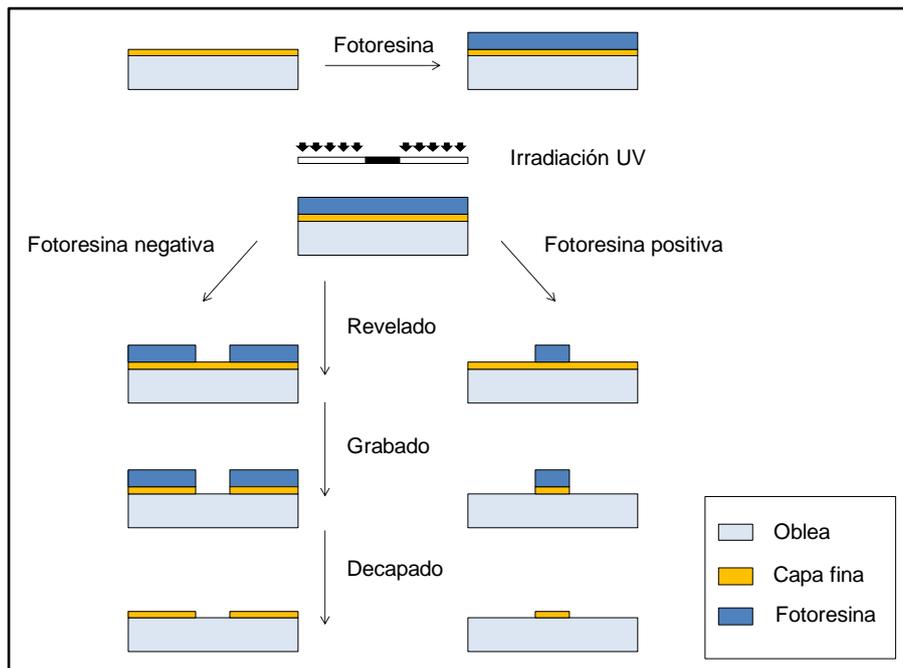


Figura 4.8. Etapas del proceso fotolitográfico utilizando una resina positiva y una resina negativa.

4.3.3. Grabado

Los métodos de grabado utilizados para definir los motivos de los microsensors MEMS variaron en función del sustrato utilizado. En este sentido, los motivos sobre las obleas de SiO₂ se definieron utilizando un grabado húmedo, y los motivos sobre las

oblas de Kapton se definieron utilizando un grabado indirecto. Los dos métodos de grabado se definen a continuación.

4.3.3.1. Grabado húmedo

Los motivos sobre las de SiO₂ se definieron a partir de un grabado húmedo. En este proceso, la fotoresina actuó de protección de las zonas donde se deseaba mantener la capa fina. El material no protegido por la capa de resina se eliminó sumergiendo la oblea en una solución de composición adecuada (HF para los metales y acetona para las fotoresinas), que provocó la oxidación o la reducción de la capa fina. Esta reacción disolvió el material y definió la estructura protegida por la fotoresina sobre la oblea.

4.3.3.2. Grabado indirecto

Los motivos sobre las obleas de Kapton se definieron utilizando un grabado indirecto (*lift-off*). El proceso (detallado en la Figura 4.9) se divide en 3 etapas.

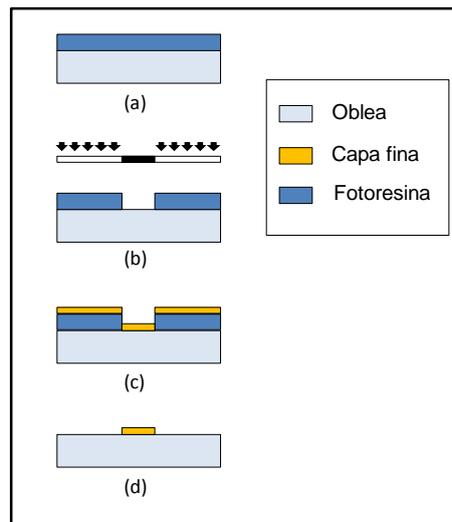


Figura 4.9. Diagrama de las etapas del procedimiento de grabado indirecto o *lift-off*.

En la primera etapa se depositó una fotoresina negativa. Utilizando técnicas fotolitográficas se definió la geometría de la capa fina a depositar, que en este caso corresponde con la zona no protegida por la fotoresina. A continuación, se depositaron secuencialmente las capas finas de platino y oro, utilizando un método de evaporación en vacío, que cubrió la totalidad de la oblea. Los motivos se definieron eliminando la fotoresina (decapado con acetona) y la capa fina depositada sobre ellas, definiendo la geometría de los electrodos de platino y oro.

Capítulo 5

**Desarrollo de un microsensor de oxígeno disuelto
basado en tecnología MEMS para la monitorización
de biopelículas**

5. DESARROLLO DE UN MICROSENSOR DE OXÍGENO DISUELTO BASADO EN TECNOLOGIA MEMS PARA LA MONITORIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo y la caracterización del funcionamiento de un nuevo microsensor de OD, fabricado utilizando tecnología de microfabricación y diseñado específicamente para la monitorización de biopelículas.

Resumen

La tecnología de sistemas micro-electromecánicos (MEMS) ha sido utilizada para fabricar un microsensor de OD, diseñado específicamente para la monitorización de biopelículas. El sensor consiste en una matriz de 11 microelectrodos circulares y un electrodo auxiliar rectangular, microfabricados en oro sobre una aguja de Pyrex. El microsensor se fabricó utilizando 3 diámetros de electrodo, y sus respuestas fueron caracterizadas y evaluadas en diferentes condiciones. Los tres diseños mostraron una respuesta lineal en el rango de OD entre 0 y 8 mg·L⁻¹, una elevada sensibilidad y repetitividad, y unos límites de detección (<0.11 mg·L⁻¹) y de cuantificación (<0.38 mg·L⁻¹) bajos. El microsensor se validó comparando su funcionamiento con un microsensor de OD comercial de tipo Clark. Los dos microsensores se utilizaron para obtener un perfil de OD en el mismo punto de una biopelícula heterótrofa cultivada en un reactor biopelícula. La similitud entre los perfiles de OD obtenidos con los dos microsensores confirmó la idoneidad del nuevo microsensor para la monitorización de biopelículas. Los resultados demostraron que la matriz de electrodos permite obtener un perfil instantáneo midiendo la concentración de OD simultáneamente en diferentes puntos dentro de la biopelícula.

Una versión modificada de este capítulo ha sido publicada en:

A. Moya, X. Guimerà, F. J. del Campo, E. Prats-Alfonso, A. D. Dorado, M. Baeza, R. Villa, D. Gabriel, X. Gamisans, G. Gabriel, 2015. Profiling of oxygen in biofilms using individually addressable disk microelectrodes on a microfabricated needle. *Microchim. Acta.* 182 (5-6), 985-993

Parte del contenido de este capítulo ha sido presentado en:

5th International Conference on Biotechniques for Air Pollution Control and Bioenergy (2013). *Development of a novel microsensor for the study of oxygen profiles in biofilms.* X. Guimerà, A. Moya, E. Prats-Alfonso, A. D. Dorado, R. Villa, X. Gamisans, D. Gabriel, G. Gabriel.

5.1. INTRODUCCIÓN

La mejora de las tecnologías de biofiltración para el tratamiento de efluentes gaseosos contaminados debe abordarse incrementando el conocimiento de los fenómenos y mecanismos que controlan el crecimiento y actividad de las biopelículas. El estudio de las biopelículas tiene como objetivo obtener información del proceso de degradación de los contaminantes.

La monitorización de diferentes especies, mediante la obtención de perfiles de concentración en el interior de biopelículas, puede utilizarse para explicar los procesos de biodegradación. La medida de gradientes de concentración de las especies involucradas permite describir los fenómenos de transporte de materia (Fu, Zhang y Bishop 1994; Ning et al. 2012) y los biocinéticos (Yurt et al. 2003; Zhou et al. 2012). Entre las diferentes especies que se pueden monitorizar en el interior de las biopelículas, el oxígeno es una de las más importantes ya que es el aceptor de electrones en la mayoría de los procesos biológicos aerobios.

Los microsensors son la herramienta más apropiada para monitorizar la concentración de las diferentes especies en el interior de las biopelículas (Denkhaus et al. 2007). Las reducidas dimensiones que presentan los microsensors, entre 50 μm y 5 μm (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998), proporciona una elevada resolución espacial en sus medidas, condición necesaria para la monitorización (in situ) de biopelículas. Los microsensors disponibles para el seguimiento del OD en el interior de las biopelículas se basan en principios ópticos (Klimant, Meyer y Kuhl 1995) y electroquímicos (Revsbech y Jørgensen 1986).

La capacidad de los microsensors de OD, ópticos y electroquímicos, para realizar medidas continuas a tiempo real en volúmenes pequeños, con un consumo de oxígeno despreciable, ha permitido la utilización de estos dispositivos en numerosas aplicaciones (Kühl et al. 1998; Gao 2010; Okabe et al. 1999). Entre estas aplicaciones destaca el estudio del consumo biológico de oxígeno en el interior de biopelículas, campo en el que han sido muy utilizados (Zhou et al. 2009; Hibiya et al. 2004; Chiu et al. 2007; Juhler et al. 2009). La principal ventaja de los microsensors ópticos es la estabilidad de la medida de OD, que no está sujeta a interferencias electromagnéticas. Sin embargo, la tecnología utilizada en la operación de los microsensors ópticos presenta una elevada complejidad. La detección óptica del OD requiere la generación de una radiación

monocromática en el espectro visible. Las fuentes utilizadas para la generación de esta radiación no son económicas y la fabricación de fuentes portátiles que proporcionen una radiación estable no ha sido optimizada. Además, la luz ambiental genera interferencias en la adquisición y transmisión de la señal, dificultando la utilización de estos microsensares.

Los microsensares amperométricos ofrecen una operación más simple, una elevada sensibilidad y un diseño flexible de los dispositivos. Los microsensares de tipo Clark son los microelectrodos electroquímicos más utilizados para la monitorización de biopelículas (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998; Hibiya et al. 2004; Ning et al. 2012) y sedimentos (Kühl et al. 1998; Gieseke y de Beer 1999; Gao et al. 2010; Liu et al. 2015). Este tipo de microsensares se fabrican artesanalmente a partir de capilares de vidrio. Los principales problemas generados por este proceso de fabricación son la elevada fragilidad de los microelectrodos, el elevado coste de fabricación por dispositivo y la variabilidad del tamaño de la punta entre diferentes sensores.

La adquisición de perfiles de OD utilizando microsensares ópticos y tipo Clark requiere la utilización de un micromanipulador (de la Rosa y Yu 2006; Zhou et al. 2009) para obtener medidas de OD a lo largo de la profundidad de las biopelículas. En este sentido, la utilización de un sistema de posicionamiento complica el procedimiento de adquisición de los perfiles de concentración.

El potencial de la tecnología de sistemas micro-electromecánicos (MEMS) ha sido aprovechado para diseñar microsensares que permiten solventar algunas de las limitaciones que presentan los microsensares ópticos y tipo Clark. La tecnología MEMS ofrece un enfoque muy versátil en el diseño y fabricación de microelectrodos. Las técnicas de microfabricación permiten la fabricación de dispositivos con electrodos de diferentes tamaños, geometrías y disposiciones (Bonilla et al. 2011; Guimera et al. 2012; Gabriel et al. 2007). Esta flexibilidad en el diseño permite diseñar sensores específicos para una aplicación. Además, las técnicas de microfabricación permiten la producción en masa, reduciendo el coste de los sensores. Diferentes trabajos han utilizado esta tecnología para desarrollar microsensares de OD que intentan mejorar el funcionamiento de los microsensares comerciales para la monitorización de biopelículas (Lee, Lim, et al. 2007; Liu et al. 2009; del Campo et al. 2007). El funcionamiento de este tipo de microsensares para la detección y cuantificación del oxígeno se basa en el

principio amperométrico para la detección del OD, descrito en Wolff and Mottola (1978). Siguiendo este principio, se aplica un potencial sobre los electrodos de trabajo con el que se fuerza la reducción del oxígeno (expresado en la Ecuación 5.1 y en la Ecuación 5.2). El oxígeno se cuantifica midiendo la intensidad (proporcional a la concentración de OD) generada por la reducción del oxígeno (reacción de detección).



En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo de un nuevo microsensor de OD. Los objetivos perseguidos en el proceso de desarrollo fueron utilizar tecnología MEMS para fabricar un microsensor diseñado específicamente para la monitorización de biopelículas, validar su respuesta para la detección del OD y comprobar su funcionamiento para la monitorización de biopelículas.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Diseño y microfabricación de un microsensor de oxígeno disuelto basado en tecnología MEMS

5.2.1.1. Diseño de los microsensores

El microsensor de OD presentado en este capítulo (Figura 5.1) se diseñó específicamente para la monitorización de biopelículas. La posibilidad de fabricar dispositivos con varios electrodos, que ofrece la tecnología MEMS, se aprovechó para diseñar un nuevo microsensor con el objetivo de simplificar el procedimiento experimental necesario para la adquisición de perfiles de concentración en el interior de biopelículas. El microsensor se diseñó como una matriz de 11 microelectrodos. Los microelectrodos se dispusieron de manera equidistante y a lo largo de una línea recta. Esta configuración permite la adquisición instantánea de un perfil de concentración monitoreando simultáneamente el OD en los electrodos que conforman la matriz de microelectrodos (MEA).

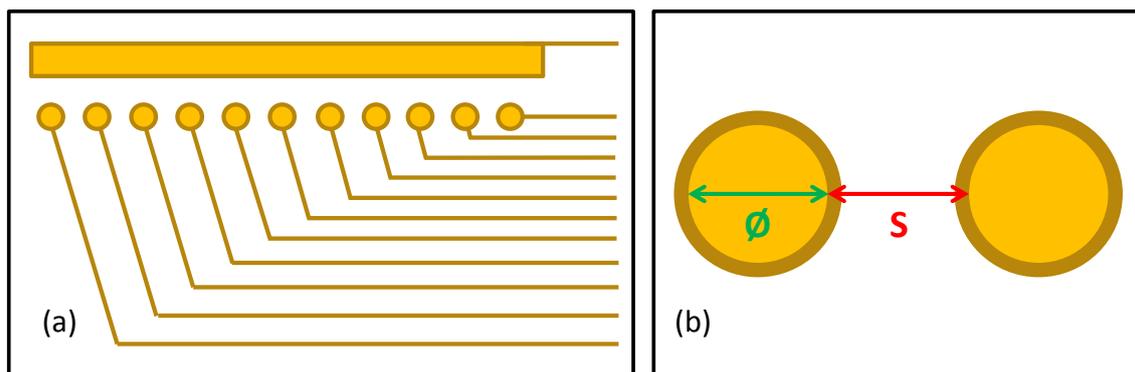


Figura 5.1. (a) Diagrama del diseño del microsensor, formado por una matriz de 11 microelectrodos circulares de oro y un macroelectrodo rectangular de oro. (b) Detalle de la disposición de 2 microelectrodos, donde se especifica los conceptos diámetro de electrodo (\emptyset) y distancia entre electrodos (S).

Las reducidas dimensiones de las biopelículas (grosos entre centenares de micras y pocos milímetros) y de los reactores en los que crecen, obliga en muchas ocasiones a operar los microsensors utilizando un sistema de referencia integrado en el dispositivo. Por este motivo, el diseño de la MEA integró un sistema de referencia. El primer microelectrodo circular se diseñó como electrodo de pseudo-referencia, mientras que un macroelectrodo rectangular (2.5 mm x 0.115 mm) de oro se incorporó en el diseño de la MEA como electrodo auxiliar (CE).

La utilización del nuevo microsensor para la monitorización de biopelículas, que presentan una elevada variabilidad en sus dimensiones, requiere cierta flexibilidad en la distancia entre los puntos monitoreados. Para ello se diseñaron tres microsensors diferentes utilizando la configuración que se muestra en la Figura 5.1. Las características de los 3 diseños se detallan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Diámetro de los electrodos y distancia entre electrodos utilizados en el diseño y fabricación de los 3 microsensors.

Diseño	\emptyset [μm]	S [μm]
D1	50	50
D2	25	50
D3	10	25

5.2.1.2. Fabricación de los microsensors

Los microsensors diseñados fueron fabricados en las instalaciones de sala blanca del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (España), utilizando los procedimientos habituales en fabricación microelectrónica, descritos en la sección 4.3.

El sustrato utilizado en la fabricación del microsensar fue una oblea de Pyrex (500 μm) sobre la que se depositaron tres capas de metales (Ti-Ni-Au) mediante un proceso de pulverización catódica (*sputtering*) (etapas a y b de la Figura 5.2). A continuación, los electrodos y las pistas se grabaron sobre la oblea utilizando procedimiento de fotolitografía para transferir los motivos y un grabado húmedo para definir las estructuras sobre la oblea (etapa c de la Figura 5.2). La microfabricación del sensor se completó definiendo el área activa de los electrodos y las conexiones. Para delimitar la superficie útil de los electrodos y las conexiones se depositó sobre la oblea un material pasivante o dieléctrico (etapa d de la Figura 5.2). La superficie activa de los electrodos y conectores se definió sobre la pasivación en un proceso fotolitográfico (etapa e de la Figura 5.2). En el presente trabajo se analizó la utilización de 2 materiales diferentes para la pasivación de los electrodos, una capa de 1 μm de oxinitruro de silicio y una capa de 1.9 μm de una fotoresina (SU-8).

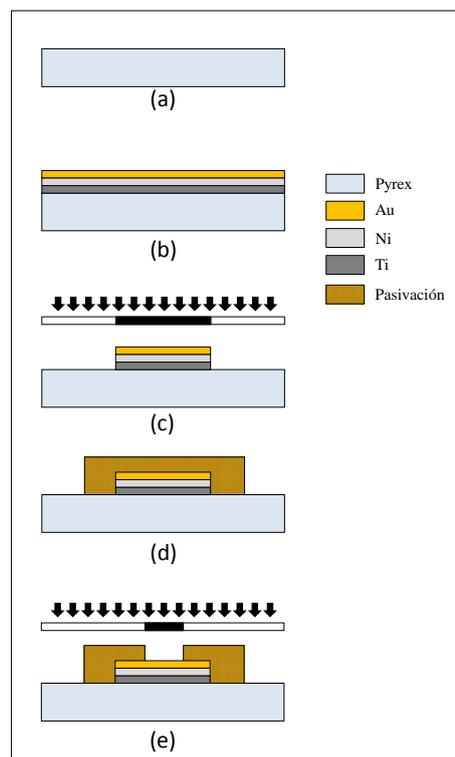


Figura 5.2. Etapas del proceso de microfabricación del microsensar de OD. (a) Preparación del sustrato, (b) deposición de las capas de metales, (c) definición de los electrodos y pistas, (d) delimitación de la superficie útil con un material pasivante.

Una vez finalizado el proceso de microfabricación, la oblea (Figura 5.3a) se cortó para obtener los sensores individuales, que se soldaron sobre tiras de placa de circuito impreso (PCB) utilizando una unión de hilo de oro (*wire-bonding*). El dispositivo

resultante se encapsuló (Figura 5.3b) utilizando un polímero foto-curable, para aislar las conexiones (entre el sensor y la PCB) de la solución.

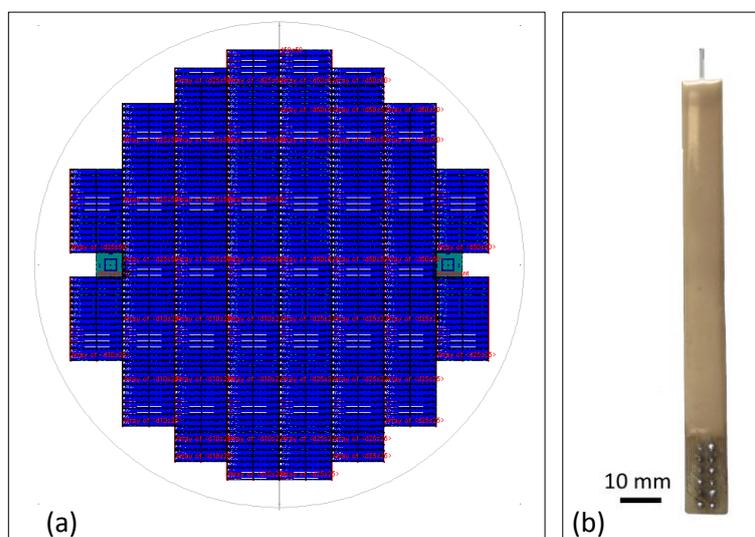


Figura 5.3. (a) Diagrama del diseño de una oblea sobre la que se fabricaron los sensores individuales. (b) Microsensor individualizado soldado sobre un sustrato de PCB y encapsulado con una resina foto-curable.

5.2.2. Limpieza y pre-tratamiento de los electrodos

Antes de la caracterización del microsensor fue necesario eliminar las partículas e impurezas depositadas sobre la superficie de los electrodos durante el proceso de fabricación y su posterior almacenamiento. Este fenómeno, acentuado en electrodos descubiertos, provoca la disminución del área activa de los electrodos que disminuye la sensibilidad en la medida de OD.

La limpieza y pre-tratamiento de los electrodos tiene como objetivo eliminar las partículas depositadas sobre los electrodos y reducir las impurezas formadas en su superficie. El procedimiento se divide en dos etapas, una más suave que consiste en la limpieza de los electrodos en diferentes soluciones y una segunda que consiste en una activación electroquímica de los electrodos.

La limpieza de los electrodos se realiza mediante tres lavados consecutivos de 5 minutos en tres soluciones diferentes. En primer lugar se utiliza una solución para la limpieza de componentes ópticos (Helmanex III, Hellma Analytics, Alemania) con el objetivo de eliminar restos orgánicos de la superficie de los electrodos. A continuación se sumerge el sensor en acetona para eliminar restos de resina (residuo del proceso de fabricación). La limpieza de los electrodos se finaliza sumergiendo el microsensor en

isopropanol, y enjuagándolo en agua destilada antes de empezar el procedimiento de activación electroquímica.

El proceso de activación persigue eliminar impurezas generadas sobre la superficie de los electrodos durante el proceso de fabricación. Las elevadas temperaturas que se alcanzan en las diferentes etapas generan una fina capa de óxido sobre los electrodos que se debe eliminar para maximizar la sensibilidad de los microsensores. En este trabajo se estudiaron 4 métodos electroquímicos para la activación de superficies de oro (Fischer et al. 2009). Los métodos probados se detallan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Métodos electroquímicos utilizados para la activación de electrodos de oro (Fischer et al. 2009).

Método de activación	Descripción
KNO ₃ CP	Se sumergen los electrodos en una solución de KNO ₃ (0.1 M) y se aplican escalones de potencial de -2 V durante 5s, con periodos de descanso (0 V) de 5s.
H ₂ SO ₄ VC	Se sumergen los electrodos en una solución diluida de H ₂ SO ₄ (0.05 M) y se aplican ciclos de potencial de hasta observar un voltamperograma estable (aproximadamente 12 ciclos). Los ciclos de potencial se aplican entre -400 mV y -1400 mV (vs. Ag/AgCl), con una velocidad de barrido de 100 mV·s ⁻¹ .
KOH BL	Los electrodos se sumergen en una solución de KOH (0.05 M). Se aplica un ciclo de potencial desde -200 mV hasta -1200 mV (vs. Ag/AgCl), con una velocidad de barrido de 50 mV·s ⁻¹ .
H ₂ O ₂ +KOH	Los electrodos se sumergen durante 10 minutos en una solución de KOH (0.05 M) y un 25% de H ₂ O ₂ .

La respuesta de los electrodos se caracterizó electroquímicamente antes y después de la activación. La caracterización electroquímica se realizó mediante voltamperometría cíclica en una solución de ferricianuro sódico. Las propiedades redox de este analito, perfectamente conocidas sobre electrodos convencionales, permite utilizarlo como sonda electroquímica. Los corrientes de pico observados en los voltamperogramas, provocados por las reacciones de reducción y oxidación de las especies de hierro, permiten determinar el área activa de los electrodos. La relación entre el área activa y el área real (valor de diseño) permite determinar el estado de activación de los electrodos. En el presente trabajo los voltamperogramas se obtuvieron sumergiendo los electrodos en una solución de Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ (0.01 M) y KNO₃ (0.1 M). Los electrodos se sometieron a un barrido circular de potencial entre 500 mV y -200 mV con una velocidad de barrido de 100 mV·s⁻¹.

La preparación del microsensar se finalizó sometiendo el microelectrodo circular diseñado como pseudo-referencia a un tratamiento de anodización. El objetivo del tratamiento fue formar una fina capa de óxido sobre el electrodo de oro, mejorando su

estabilidad y reduciendo su deriva de potencial. La anodización se llevó a cabo mediante un protocolo estándar (Murphy, Barr y Hahn 1976). Para ello, el electrodo se sometió a una voltamperometría cíclica durante cinco horas utilizando un electrodo de referencia (RE) y un CE externos. La voltamperometría se realizó variando el potencial entre -1 V y 0.5 V (vs. Ag/AgCl), con una velocidad de barrido de $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, en una solución 0.1 M de KNO_3 .

5.2.3. Medida del oxígeno disuelto utilizando el microsensor MEMS

El sistema experimental necesario para la monitorización del OD utilizando el microsensor (Figura 5.4a), está formado por una celda de 3 electrodos y un potenciostato.

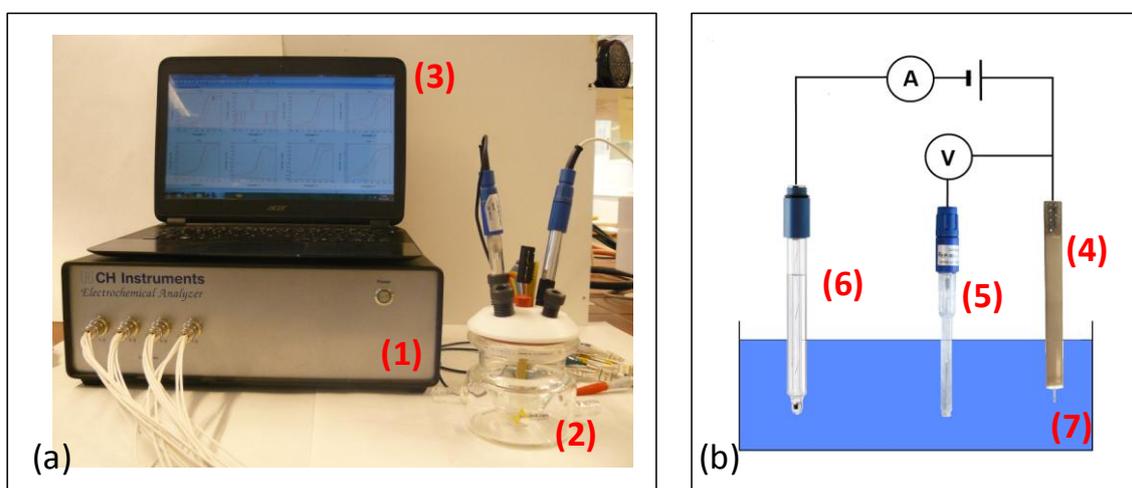


Figura 5.4. (a) Sistema experimental para la utilización del microsensor en la detección del OD. El sistema experimental está formado por un potenciostato (1), una celda convencional de 3 electrodos (2) y un ordenador para la comunicación del potenciostato (3). (b) Detalle de la celda convencional de 3 electrodos formada por WE del microsensor (4), un RE externo (5) y un CE externo (6) sumergidos en una solución electrolítica (7).

La celda electroquímica de 3 electrodos (Figura 5.4b) la conforman al menos un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (CE), sumergidos en una solución salina. El papel de cada electrodo en la detección del oxígeno se describe a continuación. Sobre los electrodos de trabajo se aplica un potencial de forma controlada y se facilita la transferencia desde el medio de los electrones liberados en la reducción del oxígeno. El electrodo de referencia actúa como la segunda semi-celda necesaria en la reacción electroquímica de reducción. El RE, que debe presentar un potencial conocido y estable, se utiliza para medir el potencial al que están sometidos los electrodos de trabajo. Por último, el electrodo auxiliar se encarga de equilibrar el potencial de los electrodos de trabajo captando los electrones transferidos desde el medio hasta su superficie.

El sistema de referencia (RE y CE) utilizado en la operación del microsensar puede estar formado por los electrodos que integra el microsensar para este propósito (apartado 5.2.1.1.), o por un RE y un CE externos. El sistema de referencia externo lo formaron un electrodo comercial de Ag/AgCl (3 M) como RE (REF321, Radiometer analytical, Francia) y un electrodo de anillo de platino como CE (MC3051Pt, Radiometer analytical, Francia).

La polarización de los electrodos y la adquisición de las intensidades generadas por las reacciones electroquímicas de detección se llevó a cabo utilizando un potencióstato de 8 canales (1010C, CH-Instruments, USA). Teniendo en cuenta que el potencióstato utilizado dispone de 8 canales, sólo 8 de los WE disponibles se utilizan en la operación del sensor.

La detección del OD se lleva a cabo aplicando un potencial capaz de reducir el oxígeno sobre los 8 WE. Este potencial depende principalmente del RE utilizado y de las condiciones de pH de la solución en la que están sumergidos (medio de medida). El potencial de polarización se determina para cada solución en la que se utiliza el microsensar mediante un análisis de barrido lineal de potencial. La corriente generada en la reacción electroquímica de detección, proporcional a la concentración de analito, se utiliza para cuantificar el OD en la superficie de cada WE.

La ausencia de una membrana entre el sistema de detección y el medio de medida provoca que el oxígeno difunda directamente sobre la superficie de los electrodos (WE). Este fenómeno incrementa la velocidad y sensibilidad del microsensar, pero introduce la necesidad de sumergir un RE y un CE en el medio de medida, que debe permitir la circulación de los electrones.

La intensidad generada por la reducción del OD sobre la superficie de los WE, (I) puede calcularse teóricamente a partir de la ecuación de corriente límite controlada por el transporte de materia. En Bond et al. (1988) se presenta la Ecuación 5.4, que permite calcular la corriente generada en función de la concentración de OD y de las características de los electrodos.

$$I = \frac{4 \cdot n \cdot F \cdot D_A \cdot C_A \cdot r}{\left(\frac{4 \cdot L}{\pi \cdot r} + 1\right)} \quad \text{Ecuación 5.4}$$

Donde n es el número de electrones transferidos en la reacción de detección, F es la constante de Faraday, D_A es el coeficiente de difusión del analito en el medio de medida, r es el radio de los electrodos, C_A es la concentración de analito en el medio y L es la altura de la capa de pasivación.

5.2.4. Caracterización del microsensor de oxígeno disuelto

La caracterización del microsensor consistió en el estudio del funcionamiento de los electrodos (WE) como sensores de oxígeno. Para ello se comprobó la respuesta amperométrica de 8 WE de los tres diseños del sensor (D1, D2, D3) en el rango típico de concentración del oxígeno en fase acuosa, entre 0 y 8 mg·L⁻¹. Los microsensors fueron calibrados en una solución de KNO₃ (0.1 M), utilizando un RE y un CE externos. El microsensor, el RE y el CE se sumergieron dentro de una celda (Figura 5.4a) con la solución electrolítica. La concentración de oxígeno de la solución electrolítica, controlada con una sonda de oxígeno comercial (OXI 325, WTW; Alemania), se varió burbujeando diferentes mezclas de aire (21% O₂) y nitrógeno (0% O₂). El calibrado se llevó a cabo aplicando el potencial de reducción del oxígeno sobre los WE y midiendo la intensidad generada sobre los electrodos en las diferentes concentraciones de oxígeno. La correlación de las intensidades adquiridas con los valores de concentración de OD medidos se utilizó en la construcción de los diagramas de calibración. Mediante el análisis de los diagramas de calibrado se determinó la linealidad de la respuesta del sensor (el rango de concentración donde responde linealmente), y la sensibilidad del sensor.

La calibración de los microsensors se completó determinando sus límites de detección ($L_{D,OD}$) y cuantificación ($L_{Q,OD}$). Éstos se calcularon utilizando los estándares de la IUPAC (Currie 1968). Las expresiones utilizadas en el cálculo de los límites de detección y cuantificación se muestran en la Ecuación 5.5 y la Ecuación 5.6.

$$L_{D,OD} = \frac{3 \cdot s_B}{S_{OD}} \quad \text{Ecuación 5.5}$$

$$L_{Q,OD} = \frac{10 \cdot s_B}{S_{OD}} \quad \text{Ecuación 5.6}$$

Donde s_B es la desviación estándar de la intensidad medida por el microsensar en 10 blancos (solución 0.1 M de KNO_3 (0% O_2)) y S_{OD} es la sensibilidad del sensor (determinada a partir de los diagrama de calibrado).

El procedimiento de calibración también se utilizó para determinar las características operacionales del sensor, analizando su respuesta en función del electrolito de soporte, la concentración de este y el pH del medio.

5.2.5. Validación del microsensar para la monitorización de biopelículas

La validación del microsensar de OD para la monitorización de biopelículas se dividió en diversas etapas. En la primera etapa se analizó el funcionamiento del microsensar utilizando el sistema de referencia integrado en el microsensar. La sensibilidad y los límites de detección y cuantificación del microsensar se determinaron operando con el sistema de pseudo-referencia, y fueron comparados con los valores presentados por el microsensar operado con el sistema de referencia externo (con un RE de Ag/AgCl). La viabilidad del sistema de referencia integrado se completó cuantificando la deriva de potencial del electrodo de pseudo-referencia (electrodo circular de oro) respecto a un RE comercial (Ag/AgCl).

En la segunda etapa del proceso de validación del microsensar se analizó su funcionamiento en la obtención de un perfil de concentración de OD en el interior de una biopelícula, utilizando como patrón un perfil adquirido con un microsensar comercial (OXI-25, Unisense, Dinamarca). La adquisición de los perfiles de OD utilizando el microsensar basado en tecnología MEMS y el microsensar comercial tipo Clark se realizó directamente sobre una biopelícula cultivada en el BPP-CA (descrito en la sección 4.1.2.1). Con la ayuda de un micromanipulador (MM3-2, Unisense, Dinamarca) los perfiles de OD se obtuvieron en el mismo punto de la biopelícula para reducir las diferencias en los perfiles provocadas por la heterogeneidad de la biopelícula. La medida del OD en el interior de la biopelícula utilizando el microsensar basado en tecnología MEMS dio lugar a un perfil de concentración de 8 puntos a lo largo de 1 mm. Los perfiles de OD completos se obtuvieron en varios pasos

desplazando verticalmente el sensor dentro de la biopelícula con la ayuda del micromanipulador.

La validación del microsensor se finalizó analizando la estabilidad de su respuesta a largo plazo. Para ello, el estado de activación de los electrodos se monitorizó evaluando sus voltamperogramas (en una solución de ferricianuro) durante un periodo de 35 días. La estabilidad del microsensor fue analizada en dos escenarios, en electrodos activados inicialmente y en electrodos reactivados durante el seguimiento.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Caracterización del microsensor MEMS pasivado con oxinitruro de silicio

La fabricación del microsensor de OD diseñado se realizó utilizando una capa de oxinitruro de silicio, de 1 μm de espesor, para la pasivación de los electrodos. La siguiente etapa del desarrollo del microsensor fue la caracterización sus parámetros de funcionamiento. Para ello, se estudió la activación del microsensor utilizando diferentes métodos (Tabla 5.2), caracterizando electroquímicamente los electrodos en una solución de ferricianuro antes y después de la activación. Seguidamente, los microsensors activados se calibraron utilizando el procedimiento descrito en la sección 5.2.4. Los resultados obtenidos en estas dos etapas mostraron deficiencias en el funcionamiento del microsensor. La caracterización de los electrodos después del procedimiento de activación mostró fallos en su respuesta. Los problemas para activar los electrodos imposibilitaron el calibrado de los sensores y su utilización para la detección del OD

Los problemas en la activación de los electrodos tienen su origen en impurezas sobre la superficie de los electrodos. La presencia de impurezas sobre la superficie de los electrodos se analizó inspeccionando la superficie de los electrodos con un microscopio óptico.

Los resultados de la inspección óptica (Figura 5.5) no revelaron la presencia de impurezas sobre la superficie de los electrodos. Sin embargo, estos resultados no permitieron concluir sobre la presencia de impurezas a nivel microscópico. Los problemas de funcionamiento pueden atribuirse a problemas tecnológicos durante la fabricación de los microsensors, que provocan la formación de compuestos

intermetálicos sobre la superficie de los electrodos, alterando la homogeneidad elemental esperada.

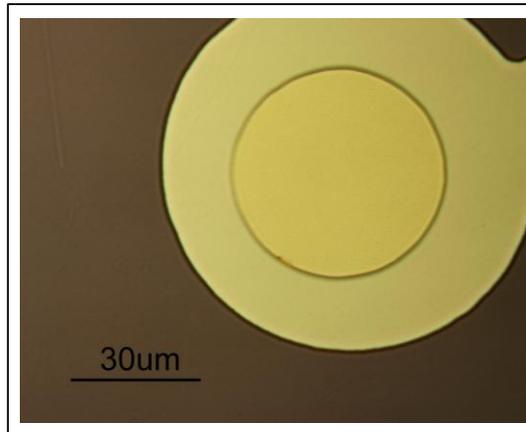


Figura 5.5. Imagen de microscopio óptico de un electrodo de oro circular, de 50 μm , del microsensor de OD con pasivación de oxinitruro de silicio.

Las principales causas que pueden explicar la formación de compuestos intermetálicos son: problemas con la barrera difusional de níquel, provocando la difusión del Ti hacia la superficie de los electrodos y la formación de compuestos de Ti-Au, o la difusión de Si de la pasivación hacia los electrodos formando compuestos de Si-Au. Teniendo en cuenta que estos fenómenos no pueden ser observados en un microscopio óptico, se aumentó el nivel de detalle del estudio analizando la superficie de los electrodos mediante microscopía electrónica, en la Figura 5.6.

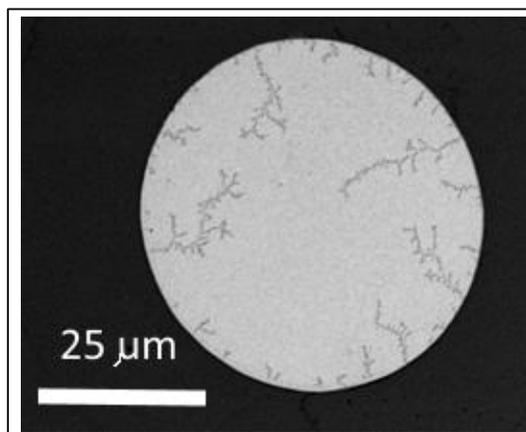


Figura 5.6. Imagen obtenida en un SEM-ESB de un electrodo de oro circular, de 50 μm , con pasivación de oxinitruro de silicio.

La inspección de la superficie de los electrodos, mediante microscopía electrónica de barrido con detección de electrones retrodispersados, reveló la presencia de ramificaciones en la superficie de los electrodos (Figura 5.6). Estas marcas indican la presencia sobre la superficie de los electrodos de elementos de diferente masa atómica,

confirmando la formación de compuestos intermetálicos durante la fabricación de los sensores. Sin embargo, el análisis no permite distinguir entre los dos posibles compuestos intermetálicos.

Lin et al. (2008) observaron la formación de compuestos intermetálicos de Si-Au, formados por la migración de átomos de Si sobre una matriz de Au al aplicar un tratamiento térmico por encima de la temperatura eutéctica (363°C). En la etapa del proceso de fabricación donde se deposita el oxinitruro de silicio sobre la oblea se alcanzan temperaturas superiores a 380°C. Por este motivo, aunque no existen pruebas definitivas sobre la formación de compuestos de Si-Au, se decidió modificar la fabricación del microsensar sustituyendo el material dieléctrico utilizado en la pasivación de los electrodos por una resina fotocurable (SU-8) depositada a bajas temperaturas. Los microsensares fabricados utilizando una capa de SU-8, de 1.9 μm de espesor, para la pasivación de los electrodos también se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido para comprobar que el problema de formación de compuestos intermetálicos se había solucionado.

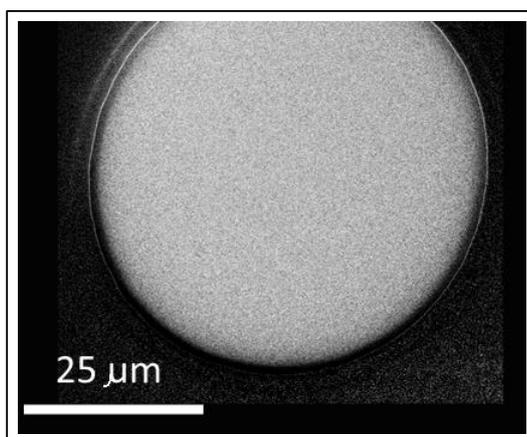


Figura 5.7. Imagen obtenida en un SEM-ESB de un electrodo de oro circular, de 50 μm , con pasivación de SU-8.

En la Figura 5.7 se observa como la superficie de estos electrodos presenta homogeneidad elemental, indicando que la sustitución del material de pasivado eliminó los problemas en la fabricación del microsensar. Los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos con microsensares fabricados utilizando SU-8 como material pasivante.

5.3.2. Caracterización del microsensar MEMS pasivado con SU-8

La viabilidad de los microsensares MEMS para la monitorización del OD se comprobó después de su fabricación. En primer lugar se estableció el procedimiento óptimo para la activación de los electrodos. A continuación se caracterizaron los parámetros de funcionamiento del microsensar y se establecieron los límites para su utilización.

5.3.2.1. Activación y caracterización electroquímica del microsensar de oxígeno disuelto

El procedimiento de activación de los electrodos del microsensar se estudió utilizando diferentes métodos para la limpieza de superficies de oro (Tabla 5.2). En la Figura 5.8 se muestran los voltamperogramas obtenidos en la caracterización electroquímica de los electrodos antes y después de su activación electroquímica utilizando los diferentes métodos.

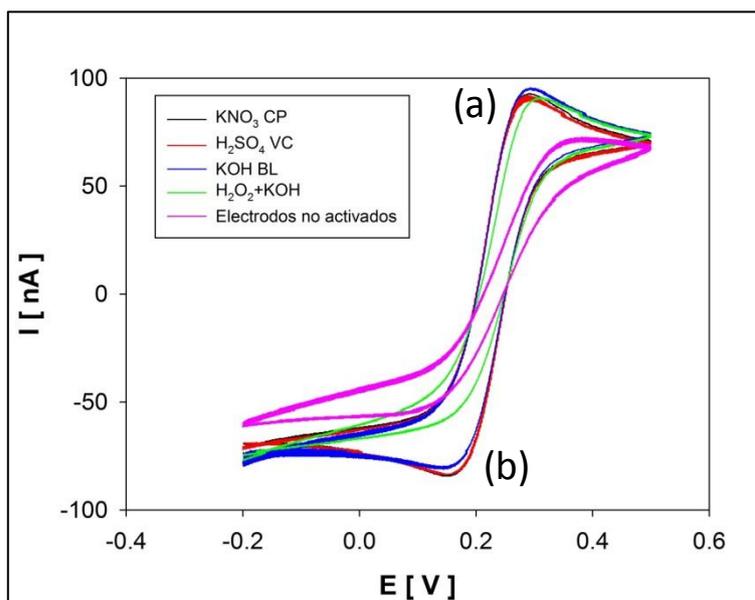


Figura 5.8. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de oro circular, de 50 µm, en una solución de ferricianuro (0.01M), antes y después de su activación utilizando 4 métodos presentados en la Tabla 5.2, donde se observa el pico de intensidad de oxidación (a) y el de reducción (b).

El método óptimo de activación se seleccionó a partir de la comparación de la caracterización electroquímica de los electrodos antes y después de su activación utilizando los 4 métodos. En la Figura 5.8 se puede observar como la intensidad de pico, generada por la oxidación de las especies de Fe (II), aumenta después de la activación de los electrodos. El aumento de la intensidad de pico revela que el área activa de los electrodos aumenta después de la activación, confirmando la reducción de las impurezas

en la superficie de los electrodos. La presencia en el voltamperograma del pico de oxidación y del pico de reducción indica una activación óptima de los electrodos. En este sentido, la viabilidad de los métodos KNO_3 CP, H_2SO_4 CV y KOH BP para la activación de los electrodos quedó demostrada. Sin embargo, se observó que utilizando el método $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{KOH}$ no fue posible eliminar completamente las impurezas de la superficie de los electrodos, ya que en el voltamperograma medido después de la activación utilizando este método no se observó pico de reducción.

Durante el proceso de selección del método de activación, también se evaluó la viabilidad de utilizar los diferentes métodos para la regeneración de microsensores desactivados con el uso (deposición de partículas y oxidación de la superficie de oro). Con este objetivo, se estudió el efecto de una segunda activación, utilizando los 4 métodos, sobre la respuesta electroquímica de los sensores. Los resultados de este estudio revelaron que los métodos que ofrecían una activación óptima (KNO_3 CP, H_2SO_4 CV y KOH BP) tenían un efecto negativo en la respuesta del sensor en una posterior activación. La agresividad de estos métodos provocó la fisura del pasivado, modificando el área real de los electrodos y dando lugar a voltamperogramas incoherentes. Por este motivo, el método menos agresivo ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{KOH}$) fue seleccionado para la activación de los electrodos. Teniendo en cuenta que el estudio previo reveló que este método no elimina completamente las impurezas de los electrodos, se modificó para mejorar sus resultados en la activación de los electrodos.

La activación de los electrodos utilizando el método $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{KOH}$ se basa en la generación de burbujas de oxígeno (como resultado de la dismutación del peróxido de hidrógeno catalizada por los iones de hidróxido) que arrancan las impurezas incrustadas en su superficie. Teniendo esto en cuenta, se varió la concentración del reactivo, pasando a utilizar una solución de KOH (0.1 M) y un 33% de H_2O_2 (en lugar de la especificada en la Tabla 5.2), y se aumentó el tiempo de activación a 1 hora. A pesar de esta modificación en el método, los reactivos continuaron agotándose antes de la activación óptima de los electrodos (voltamperograma de electrodos activados con 1 lavado de la Figura 5.9). Este problema fue solventado renovando la solución de los reactivos agotados. Este método se optimizó estudiando la respuesta electroquímica de un sensor después de diversas activaciones (Figura 5.9). Los resultados de la Figura 5.9 muestran como la intensidad de pico aumenta después de cada activación (lavado), confirmando que la renovación de los reactivos influyó positivamente en la activación

de los electrodos. Estos resultados mostraron que el estado de activación de los electrodos no mejoró después de 3 lavados (voltamperograma constante). Por este motivo se seleccionó en 3 el número óptimo de lavados necesarios para obtener una activación completa de los electrodos.

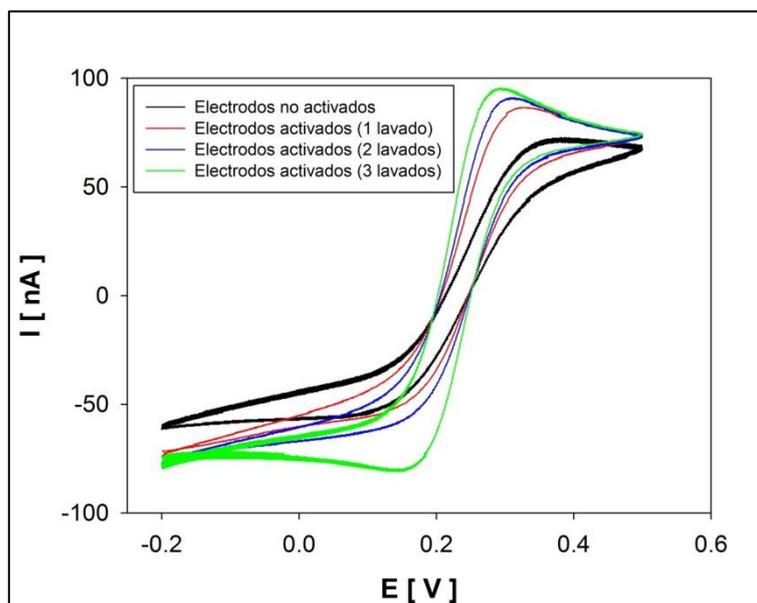


Figura 5.9. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de oro circular, de 50 μm , en una solución de ferricianuro (0.01M), antes de su activación, después de una, dos y tres activaciones de 1 h utilizando el método $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{KOH}$ optimizado.

5.3.2.2. Caracterización de los parámetros de funcionamiento del microsensor MEMS

Los parámetros de funcionamiento de los microsensores para la detección del oxígeno disuelto se determinaron a partir de su calibrado. Teniendo en cuenta que la respuesta amperométrica del sensor está influenciada por el potencial aplicado, el potencial de polarización óptimo se estudió antes de la caracterización de los microsensores, estudiando su efecto sobre la respuesta del microsensor.

El valor óptimo del potencial de polarización se determinó en el análisis de un barrido lineal de potencial. El valor óptimo corresponde con el potencial en el que se observa el pico de intensidad provocado por la reacción electroquímica de reducción del oxígeno. En el caso del oxígeno la selección es más compleja ya que la reducción del oxígeno tiene lugar en dos reacciones consecutivas (Ecuación 5.1 y Ecuación 5.2), dando lugar a dos picos de intensidad consecutivos (Figura 5.10).

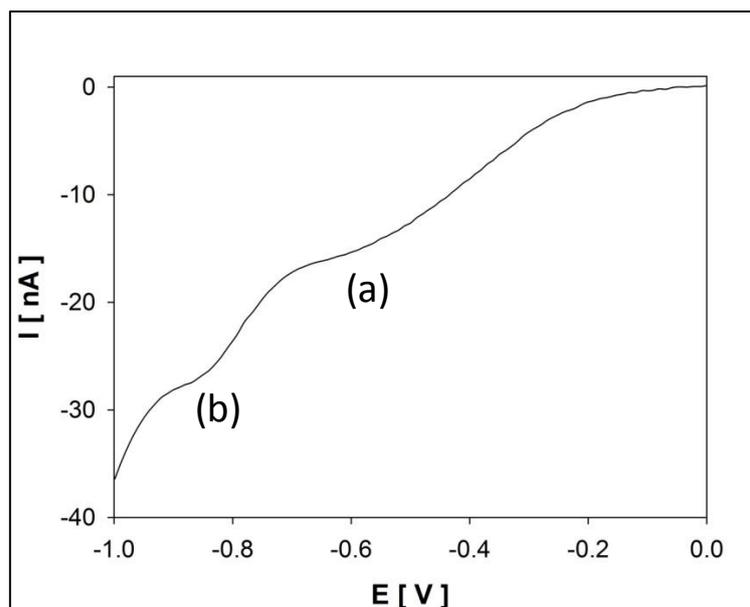


Figura 5.10. Resultados del barrido de potencial lineal de un WE de oro de 50 μm , en una solución de KNO_3 (0.1 M) saturada de oxígeno ($8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), con una velocidad de barrido de $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, utilizando un RE externo. (a) y (b) muestran los picos de corriente provocados por las reacciones de reducción del oxígeno.

Los resultados de la Figura 5.10 muestran el inicio de la primera reacción de reducción del oxígeno (Ecuación 5.1) en un potencial entre -0.50 V y -0.70 V (vs. Ag/AgCl), y el inicio de la segunda reacción de reducción (Ecuación 5.2) en un potencial entre -0.70 V y -0.90 V (vs. Ag/AgCl). Estos resultados indican que el oxígeno puede ser detectado aplicando un potencial sobre los WE en el rango entre -0.60 V y -0.90 V.

El valor óptimo de potencial en este rango se determinó a partir del estudio del efecto del potencial sobre la respuesta del sensor. En la Figura 5.11, se muestran los resultados del calibrado del microsensor para la detección del OD utilizando diferentes potenciales de polarización en el rango entre -0.60 V y -0.90 V (vs. Ag/AgCl). El potencial óptimo se seleccionó utilizando como criterio aquel que ofreciera la mayor sensibilidad.

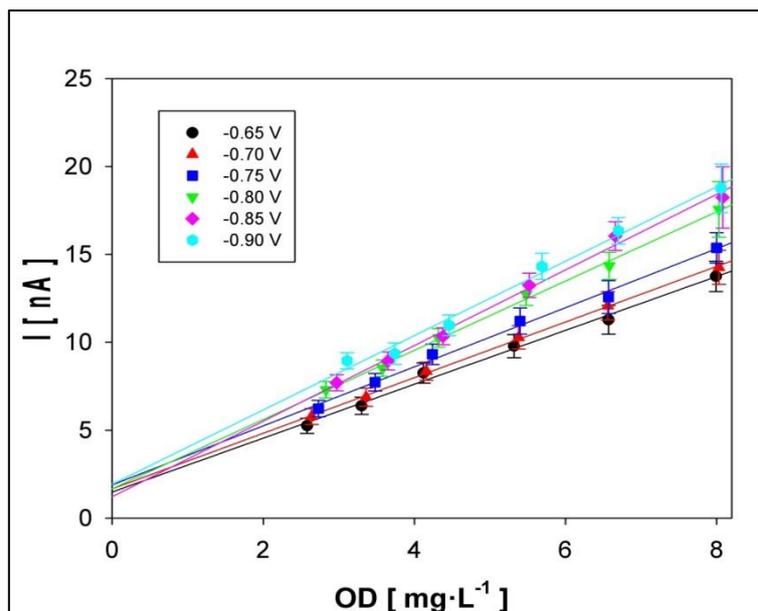


Figura 5.11. Rectas de calibrado de un microsensor del diseño D1 (WE de 50 μm) utilizando diferentes potenciales (vs: Ag/AgCl) para la polarización de los electrodos. Los puntos y las barras de error corresponden a la media y la desviación estándar de la intensidad medida por los 8 WE monitorizados.

En la Tabla 5.3 se muestran los parámetros de las rectas de calibrado construidas utilizando los resultados presentados en la Figura 5.11.

Tabla 5.3. Resumen de los resultados de calibrado de un microsensor del primer diseño (50 μm) utilizando diferentes potenciales para la polarización de los electrodos. La sensibilidad del microsensor corresponde a las pendientes de las rectas de calibrado, mientras que la corriente residual corresponde al valor de la ordenada al origen.

Potencial polarización [V (vs. Ag/AgCl)]	Sensibilidad [nA·L·mg ⁻¹]	Corriente residual [nA]
-0.65	1.53±0.04	1.48±0.02
-0.70	1.66±0.05	1.46±0.03
-0.75	1.68±0.03	1.89±0.06
-0.80	2.04±0.04	1.19±0.04
-0.85	2.15±0.03	1.22±0.03
-0.90	2.11±0.05	1.92±0.05

Los resultados de la Tabla 5.3 muestran como la disminución del potencial incrementa la sensibilidad para la detección del OD. Este fenómeno se explica porque a medida que disminuye el potencial se avanza hacia la reducción completa del oxígeno. Al intervenir más electrones en la reacción electroquímica, las intensidades medidas para una misma concentración de OD son mayores, aumentando también la sensibilidad (Paliteiro 1994). Los resultados muestran que, tal y como describen del Campo et al. (2007) y Wu et al. (2005), la sensibilidad máxima para la detección del OD se obtiene polarizando los electrodos con un potencial en el que tiene lugar la reacción global de reducción (siguiendo la Ecuación 5.3). En la Figura 5.10 se observa como este potencial

se encuentra en el rango entre -0.85 V y -0.90 V . Los resultados de calibración obtenidos utilizando un potencial de -0.85 V y -0.90 V para polarizar los electrodos, demuestran que una vez se ha alcanzado la reducción completa del oxígeno, la disminución del potencial aplicado no aumenta la sensibilidad del microsensor para la detección del OD. Además, estos resultados muestran que el corriente residual (determinado extrapolando las rectas de calibrado) generado por el inicio de la reducción de los cationes H^+ presentes en el medio, crece cuando se disminuye el potencial de polarización utilizado. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió operar el microsensor para la detección del OD utilizando un potencial de polarización de -0.85 V (vs. Ag/AgCl). El potencial seleccionado ofrece la mayor sensibilidad, con valores de corriente residual reducidos.

La respuesta de los 3 diseños de microsensor (Tabla 5.1) se caracterizó a partir de su calibración. Los resultados del calibrado experimental y teórico (utilizando la Ecuación 5.4) de los tres microsensors se muestran en la Figura 5.12.

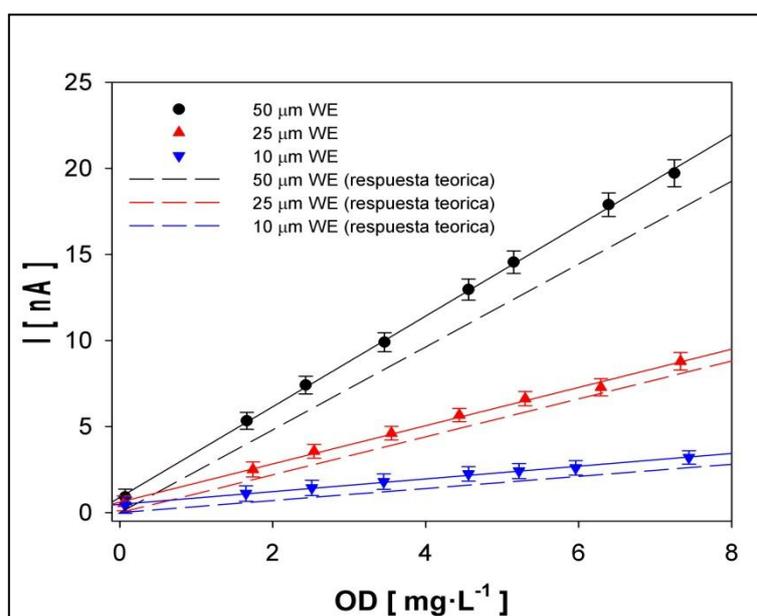


Figura 5.12. Rectas de calibrado de los tres microsensors para la detección del OD teóricas y experimentales. Las rectas experimentales se construyeron correlacionando la concentración de OD en el medio de medida y las intensidades generadas aplicando un potencial de -0.85 V (vs. Ag/AgCl)

Las rectas de calibrado experimentales (Figura 5.12), muestran una respuesta lineal de los tres microsensors en el rango de concentración de OD entre 0 y $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La excelente linealidad obtenida, confirmada por los coeficientes de correlación (r^2) mayores de 0.990 , muestra que el sistema experimental no presenta problemas de ruido

electromagnético. Por este motivo, se desestimó el uso de una caja de Faraday para la operación de los microsensors.

El análisis de las rectas muestra como la sensibilidad de los microsensors disminuye cuando se reduce el tamaño de los electrodos. Este fenómeno se explica porque la intensidad medida para una misma concentración de OD es mayor en electrodos más grandes. De este modo, el incremento en la intensidad medida cuando aumenta la concentración de OD es mayor en los electrodos más grandes, y por lo tanto su sensibilidad también es mayor. Analizando las rectas de calibrado se estimó la sensibilidad de los tres diseños: $2.41 \pm 0.08 \text{ nA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ para los electrodos de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro, $1.10 \pm 0.08 \text{ nA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ para los electrodos de $25 \text{ }\mu\text{m}$ y $0.35 \pm 0.02 \text{ nA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ para los electrodos de $10 \text{ }\mu\text{m}$. La sensibilidad de los sensores para la detección del OD se validó comprobando que el aumento de la señal entre dos muestras de concentración diferente era mayor al error asociado a la señal (barras de error). Los resultados del calibrado también revelan la presencia de una pequeña corriente residual en ausencia de oxígeno debido al inicio de la reducción de los protones sobre la superficie de los electrodos. Los resultados de los calibrados experimentales mostraron una buena concordancia con los resultados teóricos calculados utilizando la Ecuación 5.4. La diferencia entre los valores teóricos y experimentales se explica por el efecto de la corriente residual, no contemplada en los resultados teóricos. Estos resultados permiten validar el diseño y el funcionamiento de los tres microsensors.

Los límites de detección y cuantificación se estimaron para los tres microsensors utilizando la Ecuación 5.5 y la Ecuación 5.6. Los valores de estos parámetros se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Límites de detección ($L_{D,OD}$) y cuantificación ($L_{Q,OD}$) de los tres microsensors (Tabla 5.1) de OD.

Diámetro de electrodo [μm]	$L_{D,OD}$ [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]	$L_{Q,OD}$ [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]
50	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.03
25	0.07 ± 0.02	0.22 ± 0.08
10	0.11 ± 0.03	0.38 ± 0.01

Los resultados de los límites de detección y cuantificación presentan unos valores bajos, en el rango de los que presentan los microsensors de OD comerciales (Tabla 5.5), que confirman la viabilidad de los microsensors para la detección del OD.

Tabla 5.5. Principales parámetros de funcionamiento del microsensar MEMS (desarrollado en este trabajo) y los sensores comerciales disponibles para la detección del OD.

Método/Material	Rango analítico	O ₂ L _D [mg·L ⁻¹]	Resolución espacial [μm]	Tiempo de respuesta [s]	Comentarios	Referencia
Electroquímico, electrodos de oro	0-8 ppm	0.04±0.01	10-50	5	-8 medidas simultaneas -Compatible con electrodos para la detección de otros analitos	Este trabajo
Sensor óptico	0-45 ppm	0.015±0.005	50	10	-Medidas en fase líquida y gas -Sin consumo de oxígeno -Una única medida -pH (1-14)	Presens (Alemania)
	0-22.5	0.02	<50	1	-Muy frágil	Loligo systems (Alemania)
			140	30	-Robusto -Estable a largo plazo	
	0-200 mmHg	-	250	20-30	-Flexible -Compensación de la temperatura manual	Oxford Optronix (Reino Unido)
Electroquímico (tipo Clark), electrodos de oro	0-8 ppm	0.01	10-500	1-3	-Una única medida -pH (1-14)	Unisense (Dinamarca)

Por otro lado, las características de funcionamiento del microsensar MEMS, determinadas a partir de su calibrado, fueron comparadas con información bibliográfica de microsensares de OD (tanto ópticos como electroquímicos). Los resultados de la Tabla 5.5 permiten comprobar que las características de funcionamiento del microsensar MEMS desarrollado (rango analítico en la fase líquida, y límites de detección y cuantificación), presentan valores similares a los de los microsensares comerciales disponibles. Además, a diferencia de los microsensares comerciales, el microsensar MEMS permite realizar 8 medidas de OD simultáneas (diferentes electrodos de la MEA). Esta característica permite simplificar considerablemente el procedimiento experimental y el tiempo necesario para adquirir un perfil de OD en el interior de biopelículas.

Los microsensares fabricados utilizando tecnología MEMS también presentan otras ventajas. La tecnología MEMS permite el desarrollo de microsensares para la detección simultánea de diferentes analitos, incorporando varios tipos de electrodos en un solo dispositivo (Lee et al. 2011; Lete et al. 2015; Akin et al. 2011). Por otro lado, el uso de técnicas de microfabricación ha permitido incrementar la robustez de los microsensares manteniendo elevadas resoluciones espaciales en sus medidas (10 μm). La fabricación en masa de este tipo de microsensares (400 microsensares por oblea en el trabajo actual) reduce considerablemente el coste por unidad de estos microsensares.

5.3.2.3. Efecto del medio mineral en la respuesta del sensor

La medida de OD utilizando el microsensar MEMS está influenciada por la composición y el pH del medio de medida. Esta influencia, provocada por el principio de funcionamiento del microsensar MEMS de OD, limita su utilización a un rango determinado de condiciones. La aplicabilidad de los microsensares en la caracterización de biopelículas se determinó estudiando la influencia del medio mineral sobre la respuesta del microsensar. Para ello se estudió el efecto de la composición del medio y el pH sobre la sensibilidad de un microsensar del diseño D1 (WE de 50 μm). Este diseño se seleccionó porque su mayor sensibilidad facilita la apreciación de diferencias en su respuesta.

El efecto de la composición del medio mineral se estudió evaluando la respuesta del sensor en soluciones de diferentes electrolitos de soporte y diferentes concentraciones de este. Para ello el microsensar se calibró en dos soluciones de KNO_3 , 0.01 M y 0.1M,

y dos soluciones de K_2SO_4 , 0.01 M y 0.1 M. Los resultados de los 4 calibrados se muestran en la Figura 5.13.

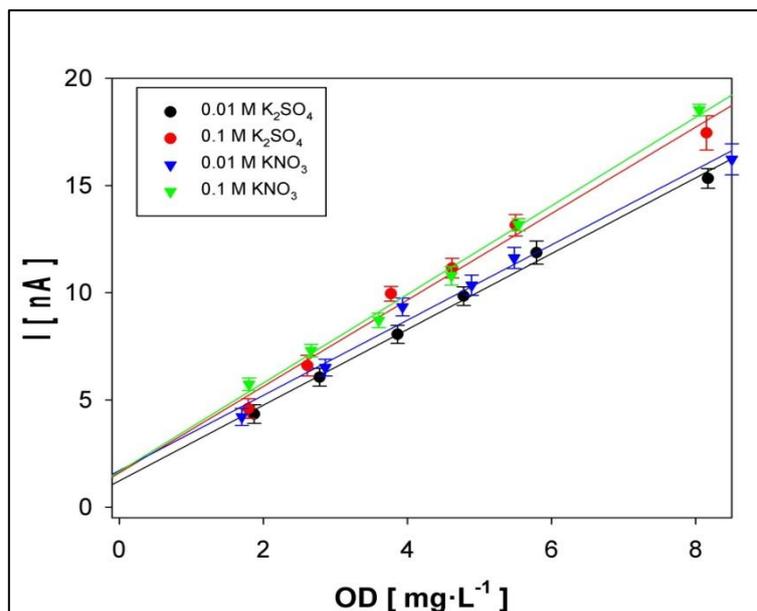


Figura 5.13. Rectas de calibrado de un microsensor de OD (WE de 50 μ m) en 4 soluciones electrolíticas diferentes.

Los resultados de los 4 calibrados (Figura 5.13), muestran que el electrolito de soporte del medio no influye en la respuesta del sensor. Sin embargo, la concentración de electrolito tiene un pequeño impacto en la respuesta del microsensor, que se cuantificó a partir del análisis de las rectas de calibrado (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Resumen de los resultados de calibrado de un microsensor (WE de 50 μ m) en diferentes soluciones electrolíticas.

Composición medio mineral	Sensibilidad [nA·L·mg ⁻¹]	Corriente residual [nA]
0.01 M K_2SO_4	1.77±0.03	1.23±0.02
0.1 M K_2SO_4	2.01±0.06	1.60±0.05
0.01 M KNO_3	1.75±0.04	1.71±0.04
0.1 M K_2SO_4	2.06±0.05	1.67±0.06

Los resultados del análisis de los calibrados de la Figura 5.13 permiten confirmar que el uso de los diferentes electrolitos no modifica la sensibilidad del sensor para la detección del OD (diferencias inferiores al 1%). Por otro lado, se cuantificó la disminución de la sensibilidad en medios minerales diluidos, obteniendo sensibilidades un 10% inferior cuando el medio mineral es diluido 10 veces.

El efecto del pH del medio de medida sobre el funcionamiento del microsensor es muy importante debido a su configuración de electrodos descubiertos. El pH del medio

electrolítico modifica la reacción electroquímica (reacción de detección) y el potencial en el que tiene lugar. Este fenómeno provoca la necesidad de estudiar el potencial de polarización en función del pH cuando se trabaja con electrodos descubiertos. En la Figura 5.14 se muestran los barridos de potencial de un WE (50 μm) en una solución de KNO_3 (0.1 M), saturada en oxígeno (8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a diferentes pH.

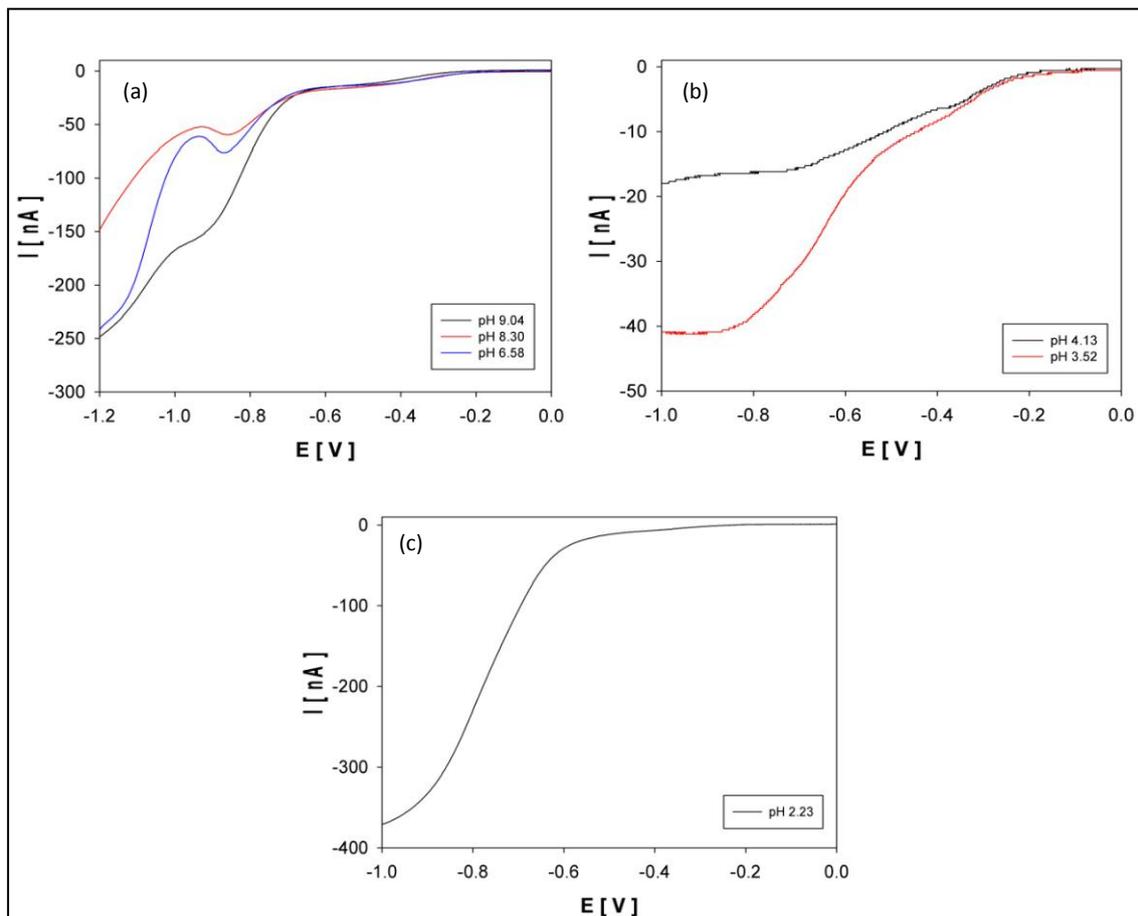


Figura 5.14. Resultados del barrido lineal de un WE de 50 μm en una solución de KNO_3 (0.1 M) saturada de oxígeno (8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a diferentes pH. (a) pH 9.04, 8.30 y 6.30, (b) pH 4.13 y 3.52, y (c) pH 2.23.

Los resultados de la Figura 5.14 muestran como cuando aumenta el pH crece el potencial en el que observamos el pico de intensidad provocado por las reacciones de reducción del oxígeno. En la Figura 5.14c se observa como el potencial de reducción del oxígeno en una solución electrolítica con un pH 2.23 se solapa con el potencial en el que empiezan a reducirse los cationes H^+ del medio. Este fenómeno indica que a pH inferiores las dos reacciones de reducción ocurren simultáneamente y por lo tanto el microsensor desarrollado no puede utilizarse para detectar el OD.

A partir del análisis de los barridos de potencial, presentados en la Figura 5.14, es posible cuantificar el efecto del pH sobre el potencial de detección del oxígeno. Estos

resultados permiten establecer el potencial de polarización para la detección del OD en función del pH. En la Tabla 5.7 se muestra el valor de potencial utilizado en la polarización de los WE en función del pH del medio de medida.

Tabla 5.7. Potencial de la reacción electroquímica de reducción (E_{red}) del oxígeno en función del pH del medio electrolítico

pH	E_{red} del O_2 [V (vs. Ag/AgCl)]
2.23	-0.55
3.52	-0.65
4.13	-0.70
6.58	-0.85
8.30	-1.00
9.04	-1.00

El estudio del efecto del pH sobre la respuesta del sensor se completó analizando el efecto del pH sobre la sensibilidad del microsensor. En la Figura 5.15 se muestra el calibrado de un microsensor (WE de 50 μm) en una solución de KNO_3 (0.1 M) a diferentes pH.

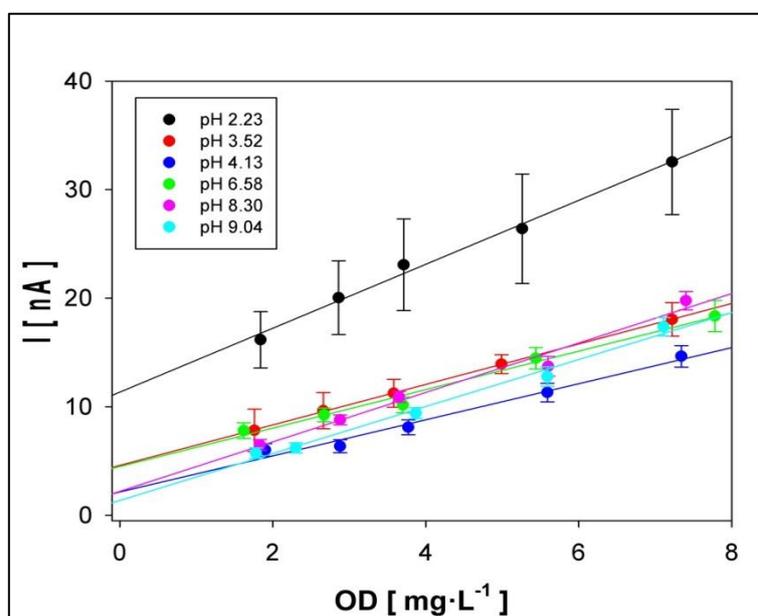


Figura 5.15. Rectas de calibrado de un microsensor de OD (WE de 50 μm) en una solución de KNO_3 (0.1 M) a diferentes pH.

Los resultados de la Figura 5.15 no permiten identificar un comportamiento claro de la sensibilidad del microsensor en función del pH. Para ello se analizaron individualmente las rectas de calibrado. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Resumen de los resultados de calibrado de un microsensor (WE de 50 μm) en una solución de KNO_3 (0.1 M) de diferentes pH.

pH	Sensibilidad [nA·L·mg ⁻¹]	Corriente residual [nA]
9.04	2.79±0.02	1.10±0.10
8.30	2.52±0.09	1.04±0.08
6.58	2.42±0.08	0.98±0.07
4.13	1.70±0.09	2.80±0.12
3.52	1.70±0.20	5.91±0.19
2.23	1.72±2.50	10.97±5.09

Los resultados de la Tabla 5.8 muestran una clara influencia del pH sobre la sensibilidad para la detección del OD del microsensor. Los resultados del análisis muestran que la sensibilidad del microsensor aumenta en medios alcalinos y disminuye en medios ácidos. A pesar de la pérdida de sensibilidad que presenta el sensor en medios ácidos, los valores que presenta (1.7 ± 0.09 nA·L·mg⁻¹ en pH 4.13, 1.70 ± 0.2 nA·L·mg⁻¹ en pH 3.52 y 1.72 ± 2.5 nA·L·mg⁻¹ en pH 2.23) están próximos al valor observado en la caracterización del sensor de la sección 5.3.2.2 (2.41 ± 0.08 nA·L·mg⁻¹), indicando que el sensor puede ser utilizado sin problemas para la monitorización del OD. Sin embargo, tal y como se observó en la Figura 5.14, al disminuir el pH las reacciones de reducción del oxígeno y protones del medio se solapan, provocando un aumento de la corriente residual en la respuesta de los microsensores. Este fenómeno limita la operación del microsensor en medios ácidos. Los valores de corriente residual (Tabla 5.8) sitúan el rango de operación del sensor en pH superiores a 3.52.

5.3.3. Estabilidad de la respuesta del sensor

La estabilidad del microsensor se evaluó a partir del seguimiento periódico de su respuesta electroquímica. A partir del valor de los picos de intensidad observados en los voltamperogramas fue posible cuantificar el estado de activación de los electrodos durante el seguimiento. Los resultados de este seguimiento se muestran en la Figura 5.16 en dos escenarios diferentes, electrodos activados inicialmente y electrodos reactivados a lo largo del seguimiento.

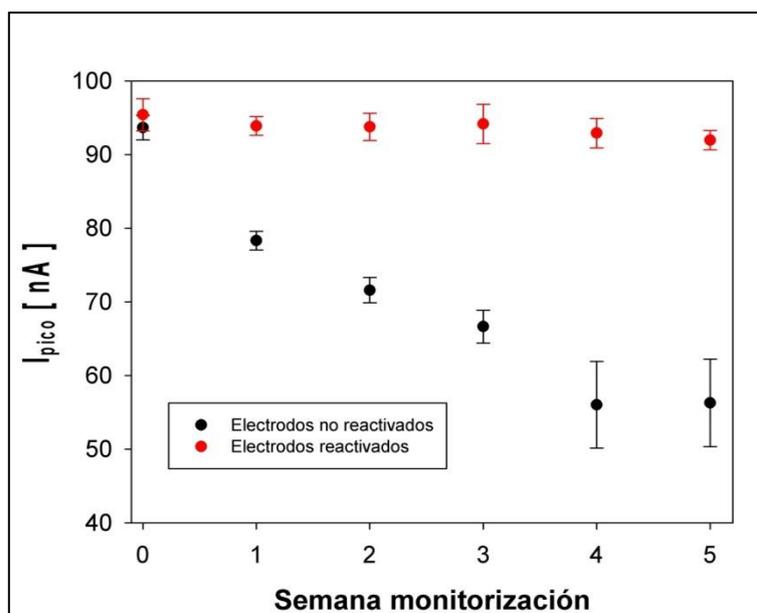


Figura 5.16. Seguimiento de la intensidad de pico de los WE (50 μm) en un microsensor activado inicialmente y un microsensor reactivado periódicamente.

Los resultados de la Figura 5.16 muestran como los electrodos reactivados presentan una intensidad de pico constante durante el seguimiento. Estos resultados demuestran que la reactivación de los electrodos permite mantener constante la sensibilidad para la monitorización del OD. Por otro lado, el microsensor no reactivado presenta una intensidad de pico que decrece a lo largo del tiempo. Estos valores indican la desactivación de los electrodos, causada por la deposición de partículas y la oxidación de la superficie de los electrodos, que provoca la disminución de su sensibilidad para la detección del OD. La disminución de la intensidad de pico permite cuantificar en un 40% la pérdida en la activación de los electrodos después de 5 semanas.

5.3.4. Integración del sistema de referencia en el microsensor de oxígeno disuelto

La monitorización de sistemas de dimensiones reducidas, como una biopelícula, no permite la utilización de un sistema de referencia externo. Por este motivo la integración del sistema de referencia es muy importante para la utilización del microsensor MEMS en un amplio rango de aplicaciones. El funcionamiento del sistema de pseudo-referencia, integrado en el nuevo microsensor de OD, fue validado antes de su utilización para la operación del microsensor. La principal limitación del sistema de pseudo-referencia está provocada por la utilización de un RE que no ofrece una respuesta estable a lo largo del tiempo. La estabilidad del electrodo de pseudo-referencia (electrodo de oro anodizado) se comprobó midiendo su deriva de potencial.

En la Figura 5.17 se muestra el potencial de circuito abierto del electrodo de pseudo-referencia respecto a un RE comercial de Ag/AgCl, en una solución de KNO₃ (0.1 M).

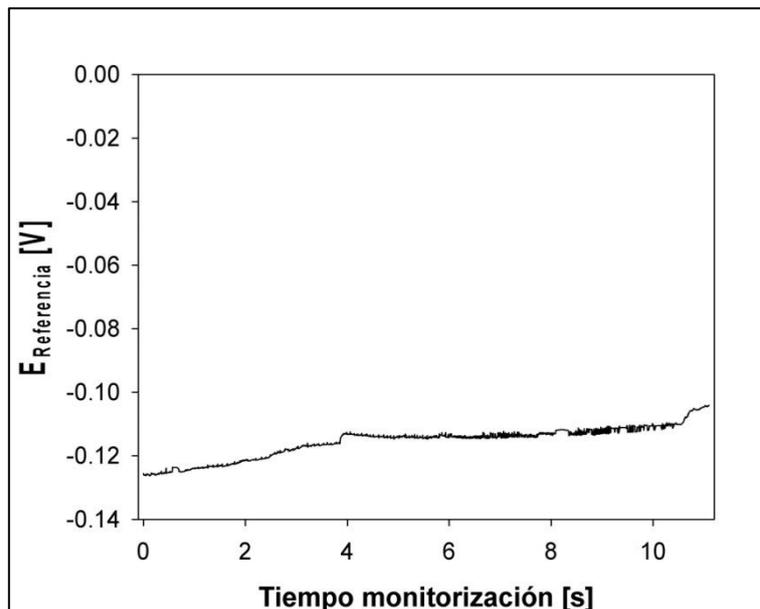


Figura 5.17. Potencial de circuito abierto del electrodo de pseudo-referencia (electrodo circular de oro) respecto a un RE comercial (Ag/AgCl).

Los resultados de la Figura 5.17 muestran una deriva de potencial del electrodo de oro de $0.68 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$. Esta deriva sólo permite utilizar este sistema de referencia para realizar medidas puntuales. La monitorización del OD a lo largo del tiempo requiere la utilización de una referencia estable, y por lo tanto el uso de un RE externo

La principal diferencia en la respuesta del microsensor provocada por la utilización del RE integrado en el microsensor es el desplazamiento de potencial, provocado por el diferente potencial del RE. El desplazamiento del potencial respecto a un RE de Ag/AgCl fue medido a partir del análisis de los voltamperogramas registrados utilizando los dos RE, en la Figura 5.18.

Los resultados de la Figura 5.18 permiten cuantificar el desplazamiento de potencial en 250 mV. Este desplazamiento debe tenerse en cuenta en la selección del potencial de polarización de los WE para la detección del OD.

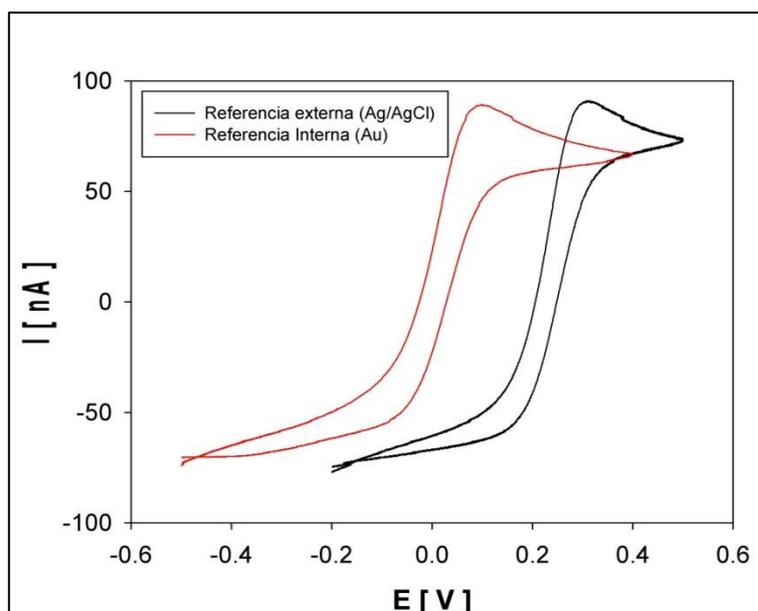


Figura 5.18. Voltamperogramas de un WE (50 μm) en una solución de ferricianuro (0.01 M) y KNO_3 (0.1 M) utilizando el RE de Au integrado en el microsensor y un RE externo de Ag/AgCl.

Después de la caracterización del electrodo de pseudo-referencia, el funcionamiento del microsensor utilizando este sistema de referencia fue evaluado para la detección del OD. En la Figura 5.19 se muestra la calibración del microsensor (WE de 50 μm) en una solución de KNO_3 (0.1 M) utilizando el sistema de referencia interno. El potencial de polarización utilizado se modificó en base al desplazamiento de potencial observado en la Figura 5.18, utilizando un potencial de -600 mV (vs. Au).

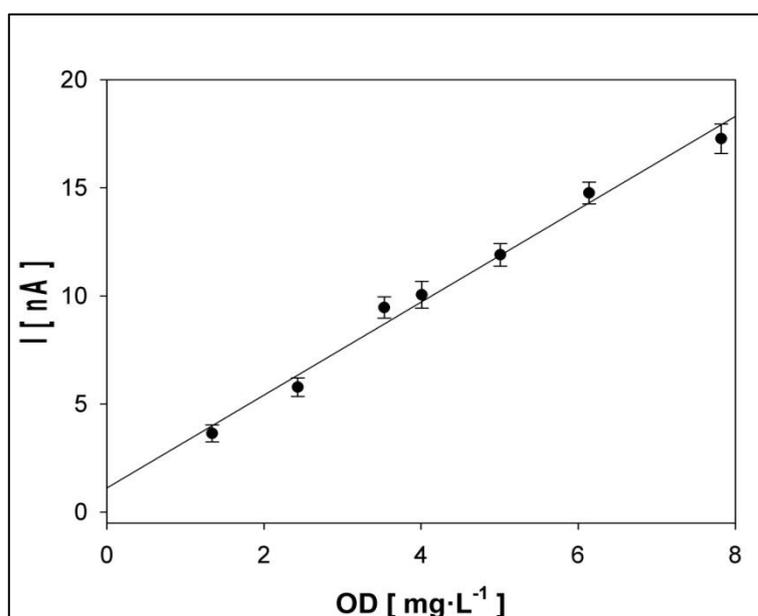


Figura 5.19. Calibrado de un microsensor (WE de 50 μm) en una solución de KNO_3 (0.1 M) utilizando el sistema de referencia integrado en el microsensor.

Los resultados del calibrado del sensor, utilizando el sistema de referencia integrado (Figura 5.19) muestran una respuesta satisfactoria del sensor, con una sensibilidad de $2.07 \pm 0.07 \text{ nA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$. Teniendo en cuenta que estos resultados fueron obtenidos utilizando un microsensor y un potencial de detección diferente, la pérdida de sensibilidad no puede ser atribuida a la utilización del sistema de referencia interno. Los límites de detección y cuantificación también fueron estimados, obteniendo un valor de $0.05 \pm 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $0.17 \pm 0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Estos resultados muestran una buena respuesta del sensor utilizando el sistema de referencia interno, obteniendo valores de sensibilidad y límites de detección y cuantificación similares a los obtenidos en la caracterización del microsensor (sección 5.3.2.2).

5.3.5. Adquisición de perfiles de oxígeno disuelto en el interior de biopelículas

El funcionamiento del microsensor de OD desarrollado en este capítulo para la monitorización de biopelículas se validó utilizando la respuesta de un microsensor comercial tipo Clark como patrón. Los dos microsensors se utilizaron en la adquisición de un perfil de OD en el mismo punto de una biopelícula heterótrofa. Teniendo en cuenta el grosor de la biopelícula, superior a 1 mm, se utilizó un microsensor MEMS del diseño D1 (WE de $50 \mu\text{m}$) para la validación. Utilizando este microsensor se adquirió un perfil de OD utilizando los 2 sistemas de referencia (externo (RE de Ag/AgCl) e interno (electrodo de Au)). A pesar de que el microsensor MEMS se diseñó para adquirir perfiles de OD en el interior de la biopelícula sin la necesidad de un sistema de posicionamiento, debido al grosor de la biopelícula los perfiles de OD se obtuvieron tras 3 medidas consecutivas (3 perfiles de 8 puntos) moviendo el microsensor en el interior de la biopelícula. Los perfiles de OD adquiridos con los diferentes microsensors se muestran en la Figura 5.20.

Comparando los perfiles de OD adquiridos utilizando los diferentes microsensors (en la Figura 5.20) se pueden observar como los tres perfiles presentan la misma tendencia a lo largo la biopelícula. Sin embargo los valores de concentración de OD en los perfiles adquiridos utilizando el microsensor MEMS fueron mayores a los adquiridos con el microsensor Clark. Del mismo modo la concentración medida por el microsensor MEMS utilizando el sistema de referencia integrado fue mayor a la medida utilizando un sistema de referencia externo.

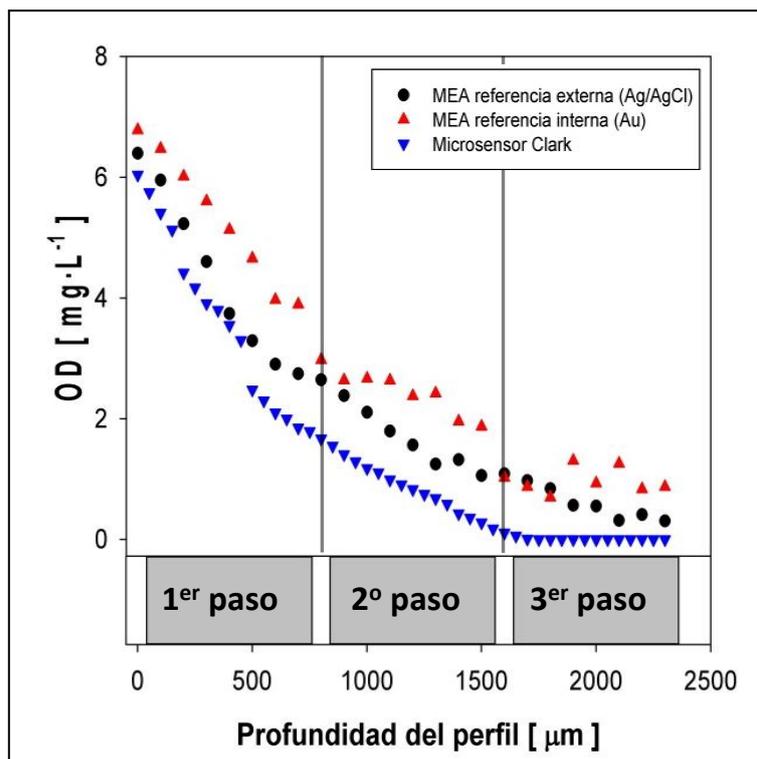


Figura 5.20. Microperfiles de OD dentro de una biopelícula heterótrofa utilizando un microsensor comercial tipo Clark y un microsensor basado en tecnología MEMS (WE de 50 μm) trabajando con un sistema de referencia externo e interno.

La diferencia en la concentración medida utilizando las dos configuraciones del microsensor MEMS se mantuvo constante a lo largo del perfil (diferencias entre 0.3 y 0.7 mg·L⁻¹). Sin embargo, la diferencia en la concentración medida en el inicio del perfil utilizando el microsensor basado en tecnología MEMS (6.4 mg·L⁻¹ con el sistema de referencia externo y 6.8 mg·L⁻¹ con el sistema de referencia integrado) y el microsensor Clark (6.1 mg·L⁻¹) fue aumentando a lo largo de la biopelícula. La diferencia en las concentraciones medidas aumenta a partir de 600 μm (diferencia entre las concentraciones medidas por los dos microsensors superior a 1 mg·L⁻¹). Del mismo modo, a partir de una profundidad de 1800 μm el microsensor Clark detecta el agotamiento del OD mientras que, de acuerdo con las medidas realizadas con el microsensor basado en tecnología MEMS, a una profundidad de 2400 μm el OD todavía no se había agotado. Estas diferencias se pueden explicar por la mayor dimensión del microsensor MEMS, que con un grosor de punta de 500 μm modifica la estructura de la biopelícula cuando se mueve en su interior, provocando la entrada de medio mineral (con una concentración de OD mayor) en el interior de la biopelícula. Analizando los resultados obtenidos en los tres perfiles (3 pasos) adquiridos con el microsensor MEMS, podemos observar como las diferencias entre sensores observadas en el primer perfil

son inferiores a las observadas en los 2 siguientes. Estos resultados indican que el movimiento del microsensor MEMS en el interior de la biopelícula aumenta la perturbación en su estructura, afectando negativamente los resultados de la monitorización. Sin embargo, la necesidad de mover el microsensor en el interior de la biopelícula, no contemplado durante su diseño, puede solucionarse diseñando microsensors con un mayor número de WE que permita la monitorización de grosores de biopelícula mayores.

5.4. CONCLUSIONES

El microsensor basado en tecnología MEMS ha mostrado una excelente respuesta para la monitorización del OD, exhibiendo una respuesta lineal en el rango entre 0 y 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para los tres microsensors fabricados (WE de 50 μm , 25 μm , y 10 μm). Las sensibilidades determinadas para los tres microsensors permiten una óptima monitorización del OD. Del mismo modo, los valores de los límites de detección y cuantificación confirmaron la viabilidad de los tres diseños para la monitorización del OD.

La caracterización del microsensor reveló que el funcionamiento del microsensor es susceptible a las características del medio en el que se utiliza. Se observó que la concentración de electrolito en el medio de medida influye en la sensibilidad del sensor. A pesar de esto, en medios diluidos (0.01 M) el sensor continua presentando una respuesta óptima (sensibilidad superior a $1.7 \text{ nA}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$), indicando que puede ser utilizado en un amplio rango de aplicaciones (tanto medios diluidos como concentrados). Sin embargo, se observó como el pH tiene un impacto mucho más importante en el funcionamiento del sensor. El pH del medio modifica el potencial de reducción del oxígeno, teniéndose que modificar el potencial de polarización de los WE en función del pH en el que se utilizan. Además se observó que en pH ácidos la sensibilidad del microsensor disminuye y la corriente residual aumenta, impidiendo la práctica monitorización del OD por debajo de pH 3.

Los perfiles de OD obtenidos utilizando el microsensor MEMS en el interior de la biopelícula heterótrofa demostraron que el diseño del microsensor desarrollado simplifica el procedimiento utilizado en la adquisición de perfiles de OD. El diseño multi-electrodo de la MEA permite la adquisición de un perfil de OD de 8 puntos sin utilizar un micromanipulador. La monitorización simultanea del OD en los diferentes

WE del microsensar permite obtener un perfil de OD en una sola medida, reduciendo el tiempo necesario para adquirir un perfil de OD y, por lo tanto, el impacto de la dinámica de la biopelícula (cambios en la concentración de OD provocados por la actividad de la biopelícula) sobre los valores de OD medidos.

Así pues, el desarrollo del microsensar MEMS ha permitido solventar algunas de las limitaciones que presentan los microsensares comerciales, tales como su extrema fragilidad, su elevado coste y el complejo procedimiento necesario para la obtención de un perfil de OD, convirtiéndose en herramienta de gran utilidad para la monitorización de biopelículas. Las limitaciones del microsensar MEMS detectadas en el proceso de desarrollo indican que su utilización debe ser cuidadosa, teniendo en cuenta los límites de aplicación del sensor (necesidad de un electrolito de soporte y efecto del pH). No obstante, en el capítulo 9 se presentarán mejoras tecnológicas que resuelven las limitaciones detectadas en este capítulo. Por un lado, se reducirá el grosor de los microsensares utilizando un sustrato polimérico más fino y se empleará una membrana selectiva para reducir la influencia sobre la respuesta del sensor de las condiciones experimentales.

Capítulo 6

Desarrollo de metodologías para la caracterización de biopelículas utilizando microsensores: transporte de materia y biocinética

6. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS UTILIZANDO MICROSENSORES: TRANSPORTE DE MATERIA Y BIOCINÉTICA

En este capítulo se presentan diversas metodologías, desarrolladas utilizando el microsensor MEMS de OD y microsensors convencionales, para caracterizar el transporte de materia y la biocinética a partir de la monitorización del interior de las biopelículas. Estas metodologías serán utilizadas para estudiar el funcionamiento de biopelículas heterótrofas (capítulo 7) y autótrofas (capítulo 8).

Resumen

Los fenómenos que tienen lugar en el interior de las biopelículas (transporte de materia y biocinética) han sido caracterizados en el interior de una biopelícula heterótrofa. La monitorización de la concentración de OD, utilizando diferentes microsensors, se utilizó para estimar el coeficiente de transferencia de materia líquido-biopelícula, el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula y los parámetros biocinéticos. El microsensor MEMS también se utilizó para realizar medidas de corriente límite, ofreciendo información acerca de la distribución de la resistencia al transporte de materia en el interior de la biopelícula. Estos resultados permitieron determinar el carácter heterogéneo de las biopelículas y su influencia sobre el transporte de materia. El valor de los parámetros biocinéticos, estimados a partir de perfiles de OD, presentaron una marcada variación a lo largo de la biopelícula, revelando que la actividad de los microorganismos varía a lo largo de ésta. La heterogeneidad de la biopelícula se confirmó en el análisis de la concentración de biomasa a lo largo del reactor.

Una versión modificada de este capítulo ha sido publicada en:

X. Guimerà, A. Moya, A. D. Dorado, R. Villa, D. Gabriel, G. Gabriel, X. Gamisans, 2014. Biofilm dynamics characterization using a novel DO-MEA sensor: mass transport and biokinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (1), 55-66

X. Guimerà, A. D. Dorado, A. Bonsfills, D. Gabriel, G. Gabriel, X. Gamisans. Dynamic characterization of external and internal mass transport in heterotrophic biofilm from microsensors measurements. *Wat. Res.* (Enviado)

Parte del contenido de este capítulo ha sido presentado en:

13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering (2014). *Development of a multi-analyte microelectrode array sensor for biofilm profiling.* X. Guimerà, A. Moya, A. D. Dorado, D. Gabriel, G. Gabriel, X. Gamisans.

7th European Meeting on Chemical Industry and Environment (2015). *Effect of biomass density on oxygen diffusivity measured inside biofilms with a MEA sensor.* X. Guimerà, A. D. Dorado, A. Bonsfills, D. Gabriel, X. Gamisans.

6.1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los mecanismos de biodegradación en sistemas de biofiltración (tanto para el tratamiento de efluentes líquidos como gaseosos) es esencial para una operación óptima de los bioreactores. La reducida información disponible sobre los procesos que tienen lugar en el interior de las biopelículas, indica que la optimización de las tecnologías de biofiltración debe abordarse a partir del estudio detallado de su funcionamiento. La descripción de los procesos que tienen lugar en el interior de las biopelículas se divide en dos etapas (Bishop, Zhang y Fu 1995; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000): (1) el transporte de sustratos y contaminantes a través de la interfase líquido-biopelícula (transporte de materia externo) y a lo largo de la biopelícula (transporte de materia interno), y (2) la biodegradación de los contaminantes en su interior.

El conocimiento de la estructura y el funcionamiento de las biopelículas ha sido mejorado a partir de la medida de la concentración de diferentes especies en su interior (Schramm et al. 1996; Schwermer et al. 2008; Melo y Frias 2004; Zhu et al. 2001). Entre las especies que pueden ser monitorizadas destaca el oxígeno, el principal aceptor de electrones en los procesos biológicos (condiciones aerobias). Las dificultades técnicas para monitorizar el OD en el interior de las biopelículas han sido resueltas a partir del desarrollo de diferentes microsensors, comúnmente microsensors electroquímicos o tipo Clark (Revsbech y Jørgensen 1986; Liu et al. 2007; Lee, Wahman y Pressman 2013).

Hasta el momento, los estudios de la resistencia de materia externa utilizando microsensors de OD sólo han permitido obtener información cualitativa (Zhang y Bishop 1995; Horn y Hempel 1995; Wäsche, Horn y Hempel 2002), que ha sido utilizada para complementar modelos teóricos existentes (Reiss y Hanratty 1963, Baerns et al. 1987). Por otro lado, el estudio del transporte de materia interno (o difusión) en el interior de biopelículas, a partir de medidas en su interior, se ha llevado a cabo utilizando microsensors específicos (Beyenal, Tanyolaç y Lewandowski 1998; Revsbech, Nielsen y Ramsing 1998) y microsensors de OD (Fu, Zhang y Bishop 1994; Chiu et al. 2006; Hille et al. 2009; Ning et al. 2012). Los estudios basados en el análisis de la concentración de OD (utilizando microsensors de OD) han permitido cuantificar la resistencia al transporte de materia del oxígeno, representada a partir de un

coeficiente de difusión (coeficiente definido en la ley de Fick) en el interior de la biopelícula. Estos estudios se basan en el análisis de la evolución de la concentración de OD en diferentes puntos del interior de la biopelícula. Para ello, desarrollaron sistemas experimentales complejos que les permitieron posicionar más de un microsensor en el interior de la biopelícula (Fu, Zhang y Bishop 1994; Chiu et al. 2006; Hille et al. 2009). Además, el efecto de la actividad de los microorganismos sobre la evolución de la concentración de OD en el interior de la biopelícula ha provocado que en muchas ocasiones el coeficiente de difusión haya sido estimado conjuntamente con los parámetros biocinéticos (Beuling, van Den Heuvel y Ottengraf 2000; Hibiya et al. 2004; Chiu et al. 2006).

Respecto a la actividad de cultivos de microorganismos inmovilizados, comúnmente se describe utilizando parámetros cinéticos estimados en cultivos en suspensión (Mora et al. 2014; Munz et al. 2009; Petersen, Gernaey y Vanrolleghem 2002). Sin embargo, las diferencias fisiológicas e hidrodinámicas entre los dos sistemas (Yurt et al. 2003) reducen la fiabilidad de esta aproximación. La fiabilidad de los parámetros biocinéticos ha sido incrementada estimándolos a partir de perfiles de OD adquiridos en el interior de las biopelículas (Zhou et al. 2012; Yurt et al. 2003).

La estimación de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos debe acompañarse de la evaluación de sus intervalos de confianza para asegurar su fiabilidad. Sin embargo, la incertidumbre de las estimaciones normalmente no es analizada. Por lo tanto, la incorporación en el procedimiento de estimación de los parámetros, de un método para la determinación de los intervalos de confianza es clave para incrementar su precisión. El método matemático basado en la matriz de información de Fisher (FIM) es un procedimiento validado para determinar los intervalos de confianza de los parámetros determinados en un procedimiento de optimización (Guisasola et al. 2006). La FIM se calcula a partir de la inversa de la matriz de covarianza, la cual está relacionada con la incertidumbre de los parámetros estimados, y es función de la cantidad y la cualidad de los datos experimentales. La fiabilidad de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos también puede ser mejorada mediante la selección de las condiciones experimentales bajo las que se realizan los experimentos de estimación. El diseño óptimo de los experimentos puede llevarse a cabo utilizando un procedimiento basado también en la FIM (Dochain y Vanrolleghem 2001).

En este capítulo se aprovecha el potencial del microsensor MEMS presentado en el capítulo 5. Utilizando este microsensor y un microsensor Clark se han caracterizado el transporte de materia y la biocinética en el interior de una biopelícula heterótrofa. Para ello, se estimaron los coeficientes de transferencia de materia y difusión y los parámetros biocinéticos. La fiabilidad de los parámetros estimados se incrementó seleccionando las condiciones óptimas de los experimentos y evaluando el intervalo de confianza de los parámetros estimados.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Monitorización de la biopelículas

6.2.1.1. Medidas con microsensores de oxígeno disuelto

El OD en el interior de la biopelícula fue monitorizado utilizando microsensores de OD, tipo Clark y tipo MEMS. El microsensor de tipo Clark permitió monitorizar el OD en el interior de la biopelícula con una resolución espacial superior a las 50 μm . Estos microsensores se utilizaron para adquirir perfiles de OD en el interior de una sección de biopelícula. Los perfiles fueron adquiridos conectando los microsensores (OXI-25, Unisense, Dinamarca) a un multímetro de 4 canales (Microsensors Multimeter, Unisense, Dinamarca) y posicionándolos dentro de las biopelículas con la ayuda de un micromanipulador (MM3-2, Unisense, Dinamarca). Utilizando el micromanipulador la punta del sensor se situó sobre la interfase gas-líquido en la sección del reactor a monitorizar. La concentración de OD desde la interfase hasta la zona más profunda de la biopelícula se registró, en pasos de 50 μm , utilizando un programa de adquisición específico (SensorTrace Basic, Unisense, Dinamarca). Por otro lado, el microsensor MEMS de OD se utilizó para monitorizar la evolución del OD en diferentes puntos de la biopelícula. El diseño multi-electrodo del microsensor MEMS, presentado en el capítulo 5, permitió medir simultáneamente la concentración de OD en diferentes profundidades de la biopelícula. El seguimiento del OD se realizó utilizando un RE externo de Ag/AgCl (REF321, Radiometer Analytical, Francia) y el CE integrado en el microsensor. Los perfiles fueron adquiridos siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3.2.

El calibrado de los dos tipos de sensores (microsensor Clark y microsensor MEMS) se llevó a cabo sumergiendo los microelectrodos en el medio mineral utilizado para el

cultivo de la biopelícula y analizando su respuesta en ausencia de OD (0% O₂) y en condiciones de saturación. Las condiciones de saturación se obtuvieron burbujando el medio de calibración con aire de red (21% O₂). Las condiciones anaerobias se consiguieron añadiendo Na₂SO₃ en exceso (a una razón de 1.5 g·L⁻¹ por cada 1 mg·L⁻¹ de OD) en el medio de calibrado.

El efecto de la heterogeneidad de la biopelícula sobre la actividad de los microorganismos se evaluó realizando un muestreo representativo y estimando los parámetros biocinéticos en diferentes puntos de la biopelícula. Para ello, la placa plana de 20 cm de longitud se dividió en 4 secciones de 5 cm, siguiendo el diagrama presentado en la Figura 6.1. Los puntos muestreados corresponden al punto central de cada una de las secciones.

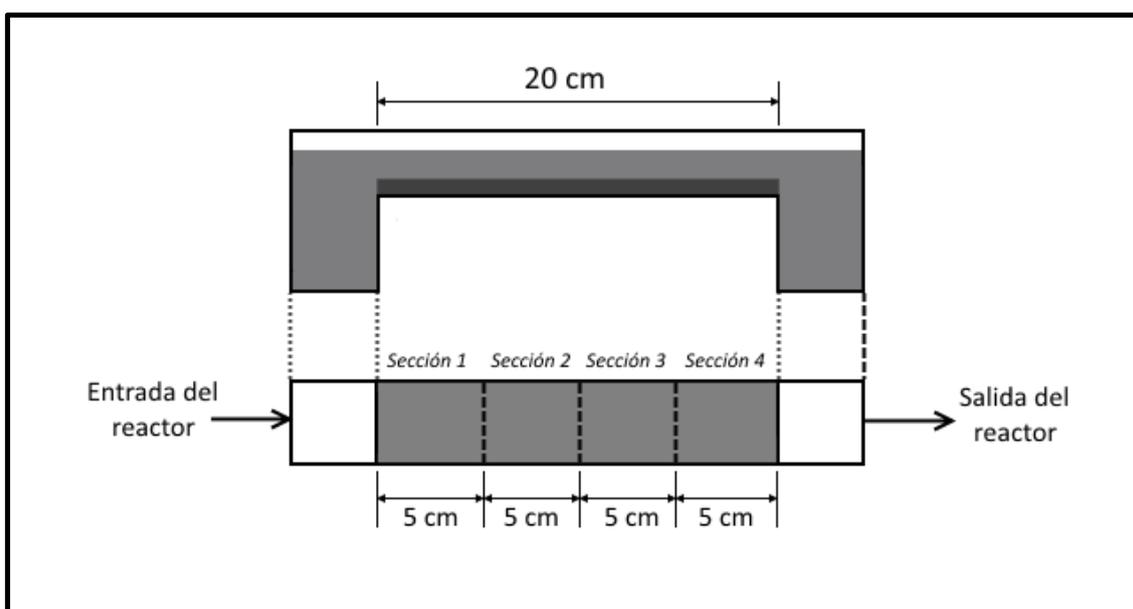


Figura 6.1. Detalle de la discretización del bioreactor para el estudio de la biopelícula.

Los coeficientes de transporte de materia, externo e interno, se estimaron evaluando la evolución del OD, durante la oxigenación de la fase líquida, en diferentes puntos en el interior de la biopelícula. Los experimentos se realizaron burbujando N₂ en la cámara de mezcla (recirculación del reactor) para desoxigenando el reactor. El burbujeo de N₂ se llevó a cabo hasta alcanzar la concentración de OD seleccionada en el diseño del experimento (condiciones óptimas). A continuación, se procedió a burbujear aire de red (21% O₂), registrando simultáneamente la concentración de OD en los puntos de interés durante la re-oxigenación.

La posición en la biopelícula de los puntos de interés para la caracterización del transporte de materia externo e interno se detalla en la Figura 6.2. El coeficiente de transferencia de materia se estimó monitorizando el OD en la superficie de la biopelícula y en el interior de la capa límite. El coeficiente de difusión se estimó introduciendo el microsensar MEMS en la biopelícula. Los 8 electrodos de oro se posicionaron desde la superficie de la biopelícula hacia su interior (Figura 6.2b), y la concentración de OD se registró simultáneamente en las 8 profundidades de la biopelícula (separadas por 50 μm).

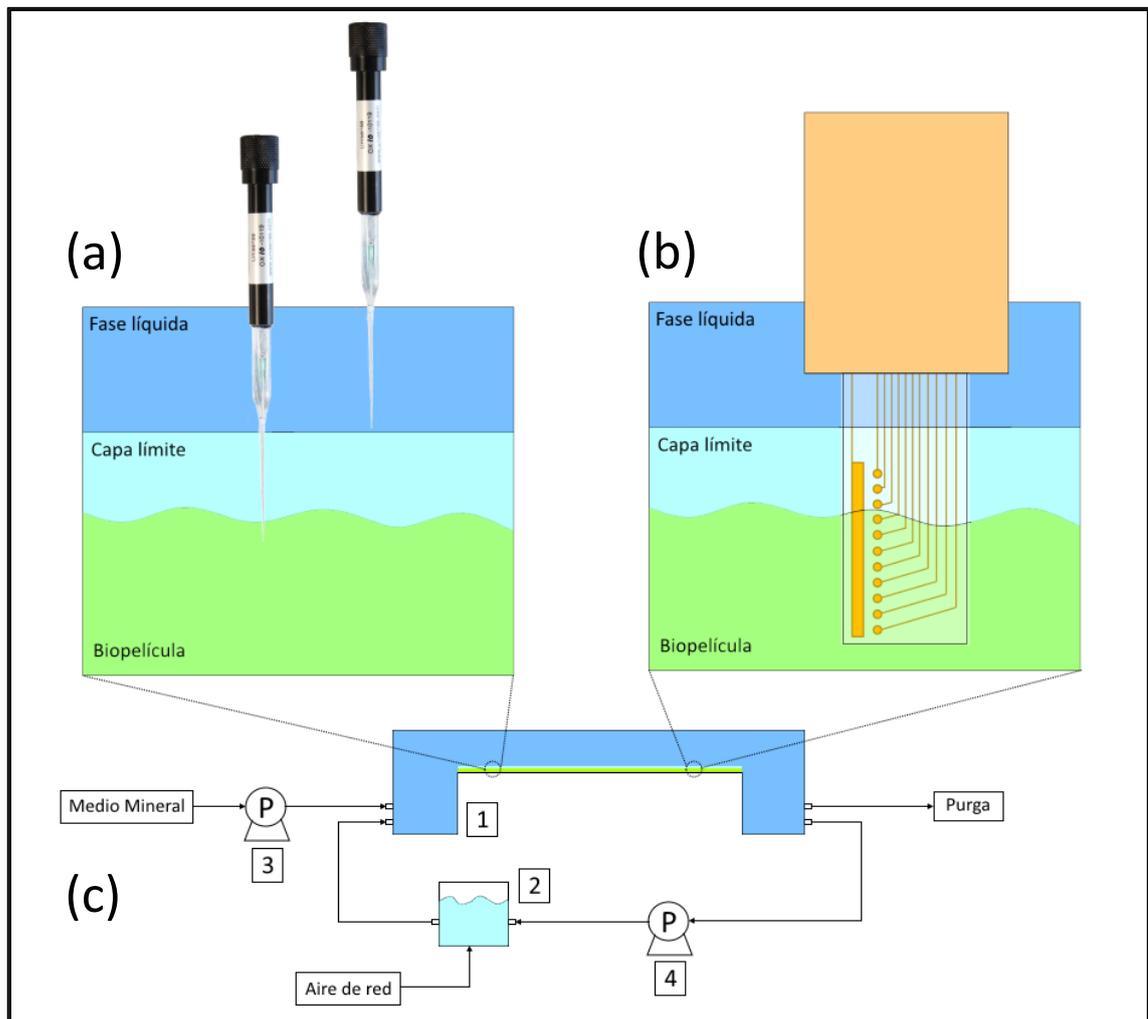


Figura 6.2. (c) Diagrama del sistema experimental utilizado en los experimentos de caracterización de la biopelícula: (1) bioreactor, (2) cámara de mezcla, (3) bomba de alimentación, (4) bomba de recirculación. (a) Diagrama conceptual del posicionamiento de los microsensares en los experimentos de caracterización del transporte de materia externo. (b) Diagrama conceptual del posicionamiento de los microsensares en los experimentos de caracterización del transporte de materia interno.

La evolución del OD en la biopelícula está afectada tanto por el transporte de materia como por el consumo de los microorganismos. Por este motivo la estimación de los parámetros cinéticos no se puede separar de la de los parámetros de transporte de

materia. En este trabajo se caracterizaron los dos tipos de parámetros por separado, inhibiendo la actividad de los microorganismos durante el estudio del transporte de materia. La inactivación de la biopelícula se consiguió mediante la recirculación en el reactor de una solución de NaN_3 . Horn y Morgenroth (2006) demostraron que la recirculación de una solución de NaN_3 ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 1 hora es suficiente para inhibir la actividad de biopelículas heterótrofas, manteniendo intactas las características de la biopelícula (estructura) (Matson y Characklis 1976). Los perfiles de OD para la estimación de los parámetros biocinéticos se adquirieron antes del estudio del transporte de materia, ya que la inactivación de la biopelícula es destructiva en términos de bioactividad.

6.2.1.2. Determinación de coeficientes de transporte mediante la medida del corriente límite en el interior de la biopelícula

Los electrodos de oro del microsensor MEMS (WE) son electrodos amperométricos que también pueden ser utilizados para realizar medidas de corriente límite. El valor de corriente límite medido por los WE puede utilizarse para cuantificar la velocidad del transporte de materia en la superficie de los electrodos (Dawson y Trass 1972; Yang y Lewandowski 1995). En este trabajo se utilizó la medida de corriente límite en el interior de la biopelícula para determinar su velocidad de difusión.

Aplicando un potencial que satisface las condiciones de corriente límite, la concentración de la especie electroactiva en la superficie de los WE es igual a cero, y el gradiente de su concentración entre la superficie y el medio electrolítico es constante. En estas condiciones se establece un equilibrio entre el consumo local de la especie electroactiva sobre la superficie de los electrodos (Ecuación 6.1), y su transporte de materia desde la solución a la superficie de los WE (Ecuación 6.2) (Rasmussen y Lewandowski 1998; Lewandowski y Beyenal 2007).

$$J = \frac{I}{n \cdot A_e \cdot F} \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde J es el flujo de las especies electroactivas hacia el WE ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), I es la intensidad (medida) generada por la polarización del WE (A), n es el número de electrones que intervienen en la reacción electroquímica, A_e es el área de los electrodos

(m^2) y F es la constante de Faraday ($A \cdot s \cdot mol^{-1}$). Por otro lado, el flujo de especies J puede calcularse como:

$$J = k_e \cdot (C_0 - C_e) \quad \text{Ecuación 6.2}$$

Donde k_e es el coeficiente de transporte de materia ($m \cdot s^{-1}$), C_0 es la concentración de la especie electroactiva en el medio ($mol \cdot m^{-3}$) y C_e es la concentración de la especie electroactiva en la superficie de los WE ($mol \cdot m^{-3}$). El equilibrio entre los dos flujos (Ecuación 6.1 y Ecuación 6.2) permite determinar el coeficiente de transporte de materia (k_e) (de la especie electroactiva) en la superficie de los WE.

Las medidas de corriente límite utilizadas para determinar el transporte de materia en el interior de biopelículas se realizaron utilizando ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$) como especie electroactiva (Yang y Lewandowski 1995). Esta especie fue seleccionada ya que está totalmente caracterizada tanto física como químicamente (Gao, Lee y White 1995). Para prevenir problemas de electromigración, la solución de ferricianuro potásico (0.025 M) se preparó utilizando KCl (0.2 M) como electrolito de soporte.

La preparación de la biopelícula para la medida del corriente límite consistió en el drenado de la solución de nutrientes y el lavado de la biopelícula con una solución de KCl (0.2 M) para eliminar las trazas de medio mineral. A continuación la solución de nutrientes se reemplazó por una solución de ferricianuro (0.025 M) y KCl (0.2M). Esta solución se recirculó durante 4 h antes de la realización de las medidas de corriente límite, para asegurar la concentración homogénea de ferricianuro en el interior la biopelícula.

La medida del coeficiente de difusión requiere establecer la relación entre las intensidades de corriente límite (utilizadas para estimar el coeficiente de transporte (k_e)) y el coeficiente de difusión. La relación entre los valores de corriente límite medidos y el coeficiente de difusión del ferricianuro ha sido estudiada en Beyenal, Tanyolaç y Lewandowski (1998). La difusividad del ferricianuro puede ser calculada a partir de las medidas de corriente límite utilizando la Ecuación 6.3.

$$D_{CN,b} = 1.12 \cdot 10^{-10} + 3.69 \cdot 10^{-12} \cdot \left(\frac{I}{A_e} \right) \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Donde $D_{CN,b}$ es la difusividad del ferricianuro en el interior de la biopelícula ($m^2 \cdot s^{-1}$).

6.2.1.3. Cultivo de biopelículas heterótrofas

Las biopelículas utilizadas en el desarrollo de las metodologías para la caracterización de biopelículas con microsensores se cultivaron en un BPP-CA. El reactor se puso en marcha y se operó siguiendo los procedimientos descritos en la sección 4.1.2.1.

La heterogeneidad de la biopelícula se caracterizó analizando el perfil de densidad que presenta a lo largo del reactor. La densidad de la biopelícula se cuantificó a partir de la medida de su concentración de biomasa, como concentración de SSV. Las reducidas dimensiones del reactor, y de la biopelícula cultivada, impidieron utilizar técnicas convencionales (análisis del peso seco en muestras de volumen conocido) para medir la concentración de SSV. Por este motivo se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976) para determinar la concentración de proteína en el interior de la biopelícula. Este método permitió medir la concentración de biomasa a partir de muestras de pequeño volumen (0.1 mL). La biopelícula se muestreó utilizando el método descrito en Hoehler et al. (1994). Utilizando este método, las muestras de biopelícula fueron recogidas con una jeringa de 1 mL posicionada sobre la biopelícula heterótrofa utilizando el micromanipulador.

El análisis de la concentración de biomasa se completó transformando la concentración de proteína en concentración de SSV. Para ello, el inóculo inicial se utilizó para preparar alícuotas de diferente concentración. Las muestras se analizaron mediante el análisis de proteína y el análisis de los SSV. Los resultados de los 2 análisis se correlacionaron, tal y como se muestra en la Figura 6.3.

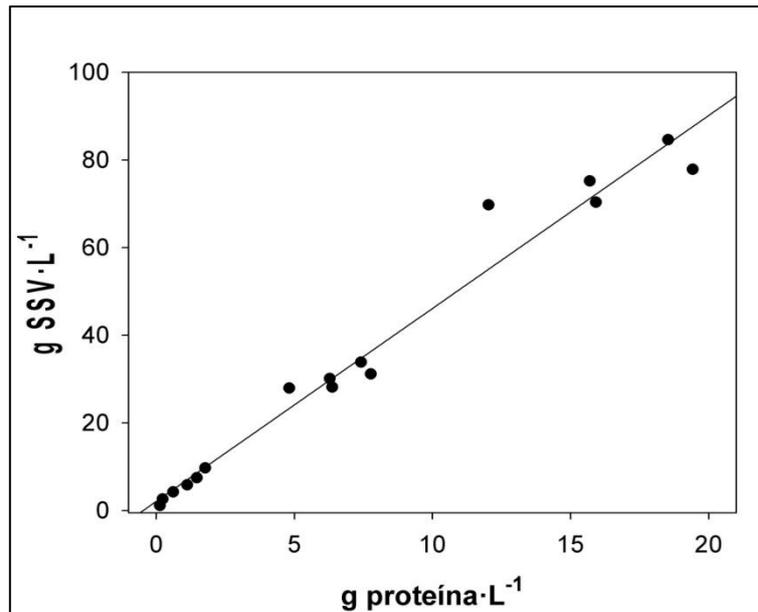


Figura 6.3. Correlación de los resultados del análisis de concentración de proteína de la biopelícula con la concentración de SSV de la biopelícula.

Los resultados de la Figura 6.3 muestran una relación de $4.40 \text{ g SSV} \cdot \text{g} \cdot \text{proteína}^{-1}$, que permite estimar la concentración de SSV en la biopelícula a partir de los resultados de los análisis de proteína.

6.2.2. Modelización de biopelículas

El transporte de materia externo e interno, y la biocinética de los microorganismos se modelizaron para estimar los coeficientes de transporte de materia y los parámetros biocinéticos.

6.2.2.1. Transporte de materia externo

El transporte de materia externo se modelizó a partir de la teoría de la doble película (Lewis y Whitman 1924), considerando que la resistencia al transporte de materia (representada por un coeficiente externo de transporte de materia) se encuentra en el lado líquido de la interfase (Ecuación 6.4).

$$\left. \frac{dC_{OD,B}}{dt} \right|_{\text{interfase}} = k_{OD,L} \cdot a \cdot [C_{OD,L} - C_{OD,B}] \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Donde C_{OD} es la concentración de OD ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), $k_{OD,L}$ es el coeficiente de transferencia de materia del lado líquido de la interfase ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), a es el área de transferencia específica (m^{-1}), t es el tiempo (s) y los subíndices L y B se refieren al líquido y a la superficie de la biopelícula respectivamente. La teoría de la doble película describe que la difusión

controla el transporte de materia en la interfase. De este modo, el coeficiente de transferencia de materia ($k_{OD,L}$) puede calcularse tal y como se indica en la Ecuación 6.5 (Reiss y Hanratty 1963).

$$k_{OD,L} = \frac{D_{OD,i}}{L_c} \quad \text{Ecuación 6.5}$$

Donde $D_{OD,i}$ es el coeficiente de difusión en el interior de la capa límite ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) y L_c es el espesor de la capa límite (m).

6.2.2.2. Transporte de materia interno

El transporte de materia interno se modelizó a partir del enfoque clásico que considera que los nutrientes y contaminantes difunden a través de la biopelícula siguiendo las leyes de Fick (Stewart 2003). La biopelícula se consideró una fase con propiedades homogéneas en una sección de biopelícula (a lo largo de su profundidad) y heterogénea a lo largo del reactor (diferentes en las diferentes secciones). En el procedimiento para la caracterización del transporte de materia interno se utilizó la ecuación de difusión en estado no estacionario (2ª Ley de Fick), tal y como se muestra en la Ecuación 6.6.

$$\frac{dC_{OD,b}}{dt} = D_{OD,b} \frac{\partial^2 C_{OD,b}}{\partial z^2} \quad \text{Ecuación 6.6}$$

Donde $C_{OD,b}$ es la concentración de OD en el interior de la biopelícula ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), t es el tiempo (s), z es la posición en la profundidad de la biopelícula (m) y $D_{OD,b}$ es el coeficiente de difusión promedio del oxígeno en el interior de la biopelícula ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

6.2.2.3. Biocinética

La actividad metabólica en el interior de la biopelícula se modelizó teniendo en cuenta el transporte de materia y el consumo de los nutrientes y contaminantes en su interior. El estudio dinámico de la evolución de las especies en el interior de la biopelícula se realizó a partir de la ecuación de difusión y reacción en una dimensión (Mitchell et al. 2004; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 1998) (Ecuación 6.7).

$$D_{OD,b} \cdot \frac{\partial^2 C_{OD,b}}{\partial z^2} = q_{max,OD} \cdot \frac{C_{OD,b}}{K_{S,OD} + C_{OD,b}} \cdot X_b + k_d \cdot X_b \quad \text{Ecuación 6.7}$$

Donde $q_{max,OD}$ ($\text{g O}_2 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) es el consumo específico de oxígeno máximo, $K_{S,OD}$ es la constante de semi-saturación del oxígeno (modelo de Monod) ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), X_b es la concentración de biomasa ($\text{g SSV} \cdot \text{m}^{-3}$) y k_d es el factor que describe el consumo de oxígeno endógeno ($\text{g O}_2 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Las suposiciones en las que se basa la Ecuación 6.7 se presentan a continuación.

1. El crecimiento de los microorganismos en el interior de la biopelícula se describe utilizando el modelo cinético de Monod.
2. El oxígeno es la única especie que limita el crecimiento de los microorganismos.
3. El transporte de materia del oxígeno través de la biopelícula tiene lugar mediante difusión en una dimensión.
4. La biopelícula se considera heterogénea a lo largo del reactor en el que se cultiva. La heterogeneidad se incorpora en el modelo discretizando el reactor en diferentes secciones.
5. La densidad de la biopelícula y el coeficiente de difusión se representan para cada sección de biopelícula mediante su valor promedio.

6.2.3. Estimación de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos

Los coeficientes de transporte de materia y biocinéticos se estimaron mediante un procedimiento de optimización no lineal. La concentración de OD medida en los diferentes experimentos de estimación se simuló resolviendo el conjunto de ecuaciones (Ecuación 6.4, Ecuación 6.6 y Ecuación 6.7. La Ecuación 6.4 se solucionó utilizando un método Runge-Kutta de paso variable (4 y 5), mientras que la Ecuación 6.6 y la Ecuación 6.7 se resolvieron utilizando un método para problemas de contorno de ecuaciones diferenciales ordinarias. Los parámetros de las diferentes ecuaciones diferenciales se estimaron ajustando las concentraciones de OD experimentales y simuladas, utilizando un método no lineal de optimización sin restricciones. La función objetivo del procedimiento de optimización se calculó tal y como se muestra en la Ecuación 6.8.

$$F_{\text{objetivo}} = \sqrt{\sum_{i=1}^{n_m} [y_{\text{exp},i} - y_{\theta,i}]^2}$$

Ecuación 6.8

Donde F_{objetivo} es la función objetivo a minimizar, n_m es el número de medidas experimentales, $y_{\theta,i}$ es la concentración de OD simulada y $y_{\text{exp},i}$ es la concentración de OD medida para la muestra i . Los procedimientos de simulación y minimización descritos para la estimación de los parámetros se llevaron a cabo mediante las funciones *ode 45*, *bvp4c* y *fminsearch* del software Matlab R2013a.

La calidad de los ajustes se analizó midiendo la diferencia entre los valores simulados por el modelo y los valores observados experimentalmente en el sistema modelizado. Para ello, se estimó el error cuadrático medio normalizado (NRMSE) entre los perfiles de OD simulados y experimentales. El NRMSE se calculó utilizando la Ecuación 6.9.

$$NRMSE = \frac{RMSE}{y_{\text{exp,max}} - y_{\text{exp,min}}}$$

Ecuación 6.9

Donde RMSE es el error cuadrático medio entre la concentración de OD experimental y simulada, calculado a partir de la Ecuación 6.10, $y_{\text{exp,max}}$ es la concentración de OD experimental máxima y $y_{\text{exp,min}}$ es la concentración de OD experimental mínima.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_m} (y_{\text{exp},i} - y_{\theta,i})^2}{n_m}}$$

Ecuación 6.10

6.2.3.1. Intervalos de confianza

El intervalo de confianza de los parámetros estimados se determinó a través de un método numérico basado en la determinación de la FIM (Dorado et al. 2008; Guisasola et al. 2006). La FIM se evaluó considerando el resultado de la función de sensibilidad y los errores experimentales, incorporando información de la cantidad y la calidad de los datos obtenidos en cada experimento, siguiendo la Ecuación 6.11. Considerando que las medidas experimentales presentan ruido blanco (datos sin correlación estadística entre ellos y distribución normal de los errores) y que el modelo no presenta desajustes, se puede asumir que los datos y los errores no están correlacionados entre ellos. En estas

condiciones, la inversa de la FIM proporciona el límite inferior de la matriz de covarianza del error en la estimación del parámetro (Ecuación 6.12). La matriz de covarianza se utilizó para evaluar la precisión de la estimación de los parámetros estimados, calculando los intervalos de confianza siguiendo la Ecuación 6.13.

$$FIM = \sum_{p=1}^{n_m} Y_{\psi}(p)^T \cdot Q_p \cdot Y_{\psi}(p) \quad \text{Ecuación 6.11}$$

$$COV \geq FIM^{-1} \quad \text{Ecuación 6.12}$$

$$\sigma(\psi) = \sqrt{COV} \quad \text{Ecuación 6.13}$$

Donde p hace referencia a un punto de muestreo, n_m son el número de medidas experimentales, Y_{ψ} es la sensibilidad de los parámetros ψ en el modelo, Q_k es el error de las medidas experimentales en los puntos de muestreo k , COV es la matriz de covarianza y σ es la desviación estándar en la estimación de los parámetros.

6.2.3.2. Diseño óptimo para la estimación de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos

El diseño experimental óptimo (DEO) se basó en la selección de las condiciones óptimas para obtener una estimación precisa de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos. Para ello, se evaluó la influencia de los datos experimentales sobre el intervalo de confianza de los parámetros del modelo. Los experimentos se realizaron bajo las condiciones que maximizan la precisión de las estimaciones (minimizan los intervalos de confianza).

El DEO consiste en el análisis de la calidad de los datos experimentales en función de las variables de salida, las variables de entrada (Ucinski y Patan 2007) y las características de muestreo (de Brauwere et al. 2009; Pagendam y Pollet 2009). De acuerdo con las medidas experimentales disponibles, la concentración de OD en diferentes puntos del reactor se definió como variable de salida. Por este motivo, el DEO se limitó a estudiar el efecto de las variables de entrada (condiciones iniciales) y las características del muestreo sobre la precisión de las estimaciones.

Las variables evaluadas en el DEO para la estimación del coeficiente de transferencia de materia externo fueron la concentración de OD de la fase líquida en la entrada del BPP-CA ($C_{OD,L} (inlet)$), la concentración de OD inicial en el interior de la capa límite

($C_{OD,L (t=0)}$) y la superficie de la biopelícula ($C_{OD,B (t=0)}$), la frecuencia de muestreo ($v_{muestreo}$), la durada del muestreo (t_{exp}), y el área interfacial del sistema monitoreado (A_{trans}). Las variables seleccionadas en el DEO para los experimentos de estimación del coeficiente de difusión fueron la $C_{OD,L (inlet)}$, la $C_{OD,B (t=0)}$, la $v_{muestreo}$, el t_{exp} , la profundidad del perfil de OD monitorizado (z_{perfil}) y la distancia entre los puntos monitorizados (Δz_{perfil}). Finalmente, las variables utilizadas en el DEO para la estimación de los parámetros biocinéticos fueron la $C_{OD,L (t=0)}$, la $C_{OD,B (t=0)}$, la z_{perfil} y la Δz_{perfil} .

Los experimentos de estimación fueron simulados, utilizando la Ecuación 6.4, la Ecuación 6.6 y la Ecuación 6.7, en la batería de condiciones presentada en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Valor de las variables de estudio utilizadas en el DEO de los experimentos para la estimación de los parámetros de transporte de materia (externo e interno) y biocinéticos en el interior de la biopelícula.

	Variable de estudio	Intervalo de estudio
Estimación k_L	$C_{OD,L (inlet)}$ [$mg \cdot L^{-1}$]	6 - 8.5
	$C_{OD,L (t=0)}$ [$mg \cdot L^{-1}$]	4 - 7
	$C_{OD,B (t=0)}$ [$mg \cdot L^{-1}$]	1 - 4
	A_{trans} [m^2]	$2 \cdot 10^{-3}$ - $7 \cdot 10^{-3}$
	$v_{muestreo}$ [s^{-1}]	1 - 0.1
	t_{exp} [s]	200 - 500
Estimación D_b	$C_{OD,L (inlet)}$ [$mg \cdot L^{-1}$]	4 - 8
	$C_{OD,B (t=0)}$ [$mg \cdot L^{-1}$]	0 - 2.5
	Δz_{perfil} [μm]	25 - 100
	z_{perfil} [cm]	0.1 - 0.2
	$v_{muestreo}$ [s^{-1}]	1 - 0.1
	t_{exp} [s]	100 - 1800
Estimación parámetros cinéticos	$C_{OD,L (t=0)}$ [$mg \cdot L^{-1}$]	4 - 8
	$C_{OD,B (t=0)}$ [$mg \cdot L^{-1}$]	4 - 8
	z_{perfil} [cm]	0.15 - 0.20
	Δz_{perfil} [μm]	10 - 50

La FIM se incluyó en los modelos para estimar la incertidumbre de los parámetros de transporte y biocinéticos. Los intervalos de confianza determinados se utilizaron para estimar el porcentaje de incertidumbre de los parámetros (% incertidumbre), calculado como la variación del valor medio de los intervalos respecto de los extremos, en función de las condiciones experimentales.

El valor de las variables seleccionadas para el DEO (Tabla 6.1) se seleccionó específicamente para la estimación de cada parámetro, a partir del rango que cada variable presenta en los diferentes experimentos y a partir del rango en el que pueden ser controladas.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Resultados del DEO para la estimación de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos

El DEO para la estimación de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos se realizó evaluando la precisión de las estimaciones en diferentes escenarios experimentales.

La Figura 6.4 muestra los resultados del DEO para la estimación del coeficiente de transporte de materia externo. El porcentaje de incertidumbre del coeficiente de transporte de materia externo se representa respecto del valor de las diferentes variables seleccionadas para el estudio. La interpretación de los resultados presentados en la Figura 6.4 y la Figura 6.5, se basó en determinar las variables seleccionadas para el DEO que presentan una influencia sobre la precisión de los parámetros a estimar, y en determinar el valor de las condiciones operacionales bajo las que se realizaron los experimentos. Las pendientes observadas en la Figura 6.4 y la Figura 6.5, indican la sensibilidad de las diferentes variables seleccionadas para el DEO sobre la precisión del parámetro estimado. De este modo, los experimentos se llevaron a cabo controlando sólo las variables que provocan una variación en la incertidumbre superior al 0.5 % a lo largo del intervalo de estudio. Las condiciones bajo las que se realizaron los experimentos se seleccionaron a partir de los resultados del DEO, estableciendo un 2 % como incertidumbre máxima asumible y considerando la relación de compromiso entre la complejidad añadida al procedimiento para alcanzar las condiciones experimentales y la reducción en la incertidumbre del parámetro. En este sentido, en el caso concreto de los resultados presentados en la Figura 6.4c, se observa como el valor óptimo de la concentración inicial de OD en la superficie de la biopelícula es de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo, la dificultad desoxigenar el reactor hasta esta concentración de OD (consumo de N_2 y tiempo de desoxigenación elevados) obligó a establecer como condición inicial para la realización de los experimentos un valor de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

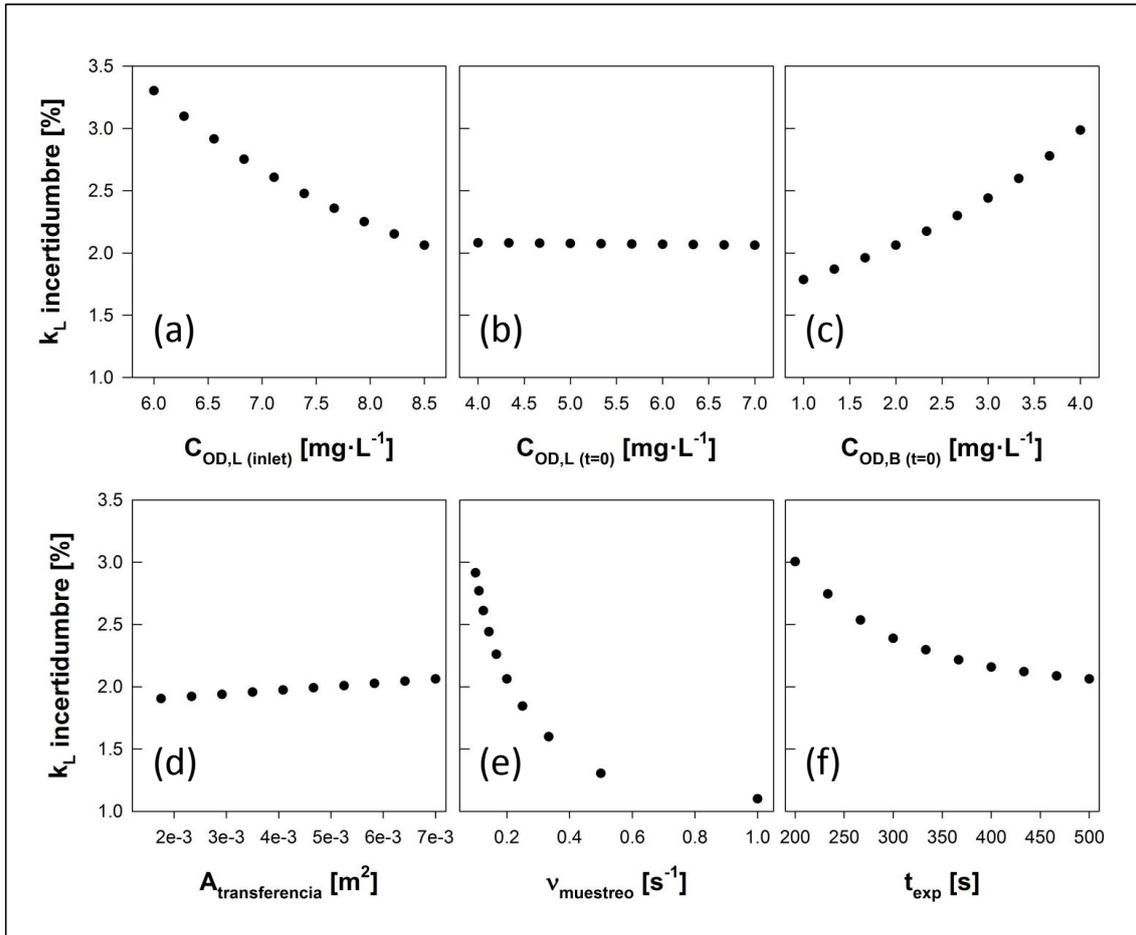


Figura 6.4. Porcentaje de incertidumbre en la determinación del coeficiente de transporte externo (a) respecto a (a) la concentración de OD en la entrada del reactor, (b) la concentración inicial del OD en la capa límite, (c) la concentración inicial del OD en la superficie de la biopelícula, (d) el área de transferencia del sistema estudiado, (e) la frecuencia de muestreo y (f) el tiempo de muestreo.

Analizando las pendientes de los resultados presentados en la Figura 6.4, se observó que el control de la concentración inicial en la capa límite (Figura 6.4b) y el área de transferencia del sistema monitorizada (Figura 6.4d) no son críticos para aumentar la precisión de la estimación. Siguiendo el criterio establecido para la selección de las condiciones de operación, se determinó que la precisión óptima en la estimación del k_L se obtiene deteniendo la desoxigenación cuando se alcanza una concentración de OD en la superficie de la biopelícula inferior a $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 6.4c), y reiniciando la aireación hasta una concentración de OD en la fase líquida de $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 6.4a). Estos resultados también muestran que la oxigenación debe monitorizarse durante al menos 500 segundos (Figura 6.4f) con una frecuencia de muestreo de 1 s^{-1} (Figura 6.4e). Las condiciones experimentales bajo las que se estimaron los coeficientes de transporte de materia interno (coeficiente de difusión) también fueron evaluadas (Figura 6.5).

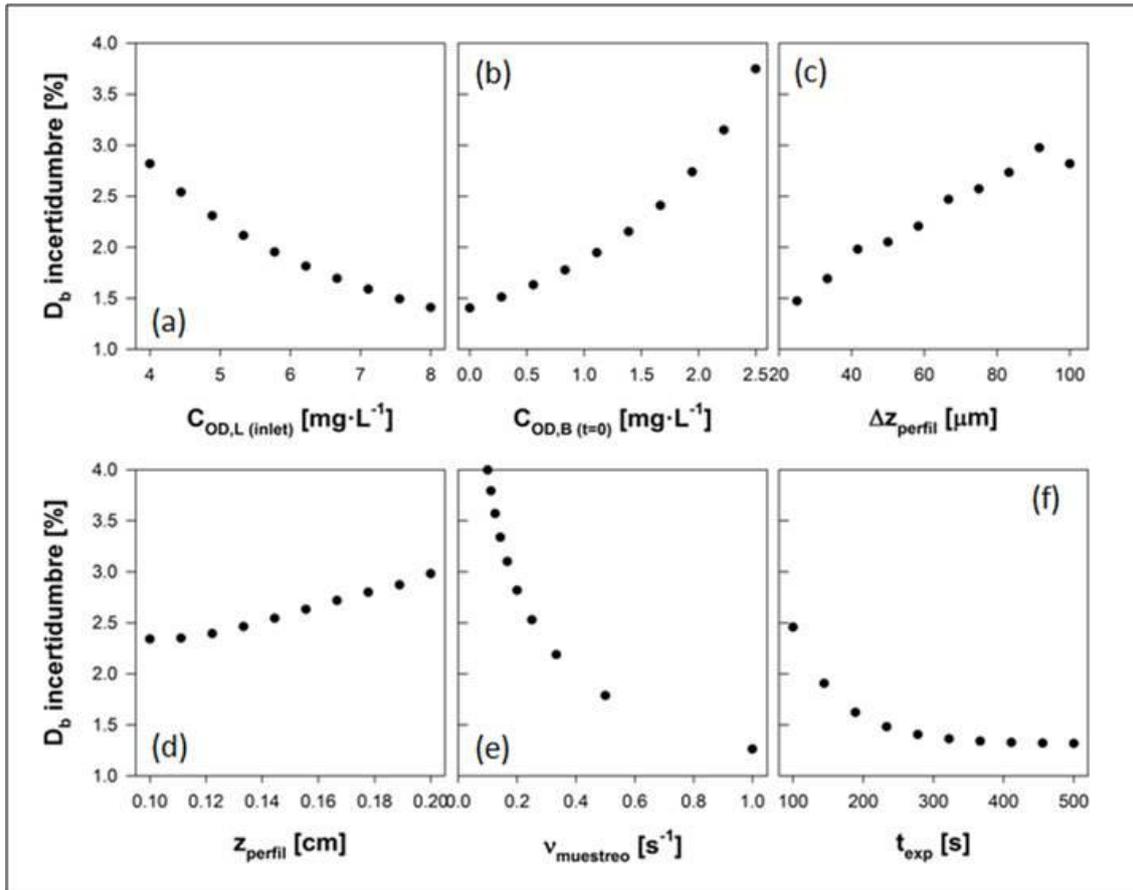


Figura 6.5 Porcentaje de incertidumbre del coeficiente de difusión (D_b) respecto a (a) la concentración de OD en la entrada del reactor, (b) la concentración de OD inicial en la superficie de la biopelícula, (c) la distancia entre los puntos monitorizados en el interior de la biopelícula, (d) la profundidad de biopelícula monitorizada, (e) la frecuencia de muestreo y (f) la duración del muestreo.

El análisis de las pendientes observadas en los resultados del DEO para la estimación del coeficiente de difusión (Figura 6.5), mostró que el control de todas las variables seleccionadas para el estudio es clave para minimizar la incertidumbre de la estimación. Las condiciones experimentales fueron seleccionadas siguiendo el mismo criterio utilizado anteriormente para la interpretación de los resultados de la Figura 6.4. De este modo la adquisición de los perfiles de oxigenación en el interior de la biopelícula se inició cuando la concentración de OD en la superficie de la biopelícula era inferior a 1.5 mg·L⁻¹ (Figura 6.5b), y el sistema fue aireado hasta alcanzar una concentración de OD en la fase líquida de 7 mg·L⁻¹ (Figura 6.5a). Además, los perfiles de oxigenación se adquirieron durante 500 segundos (Figura 6.5f) con una frecuencia de muestreo de 1 s⁻¹ (Figura 6.5e). Los resultados de la Figura 6.5c y de la Figura 6.5d permitieron seleccionar el diseño del microsensor MEMS (entre los tres diseños presentados en el capítulo 5). Se seleccionó el sensor que permite monitorizar una profundidad de 1 mm en el interior de la biopelícula en intervalos de 50 μm (D1 en la Tabla 5.1).

Finalmente los resultados del DEO para la estimación de los parámetros biocinéticos se presentan en la Figura 6.6. Considerando que los perfiles de OD utilizados en la estimación de los diferentes parámetros biocinéticos se adquirieron bajo las mismas condiciones, el DEO se realizó conjuntamente para los tres parámetros ($q_{max,OD}$, $K_{S,OD}$ y k_d). Los valores de la incertidumbre representados en la Figura 6.6, corresponden a la media de los intervalos de confianza de los tres parámetros biocinéticos.

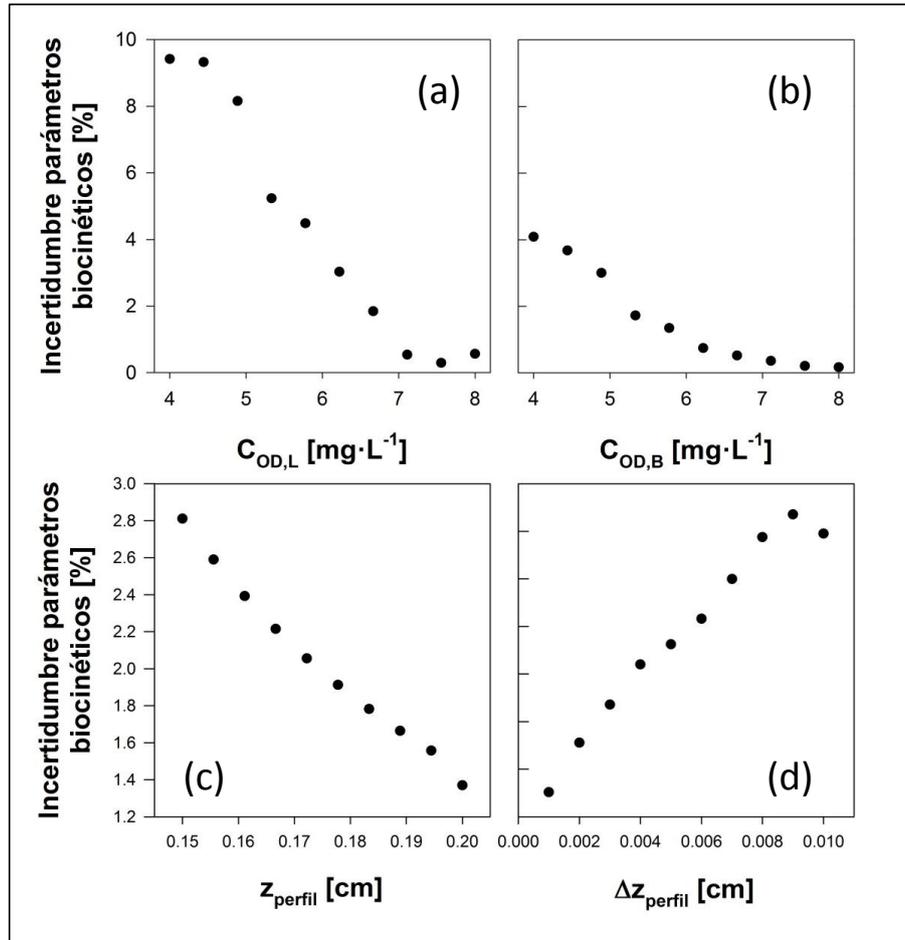


Figura 6.6. Porcentaje de incertidumbre de los parámetros biocinéticos respecto a (a) la concentración de OD en la fase líquida, (b) la concentración de OD en la superficie de la biopelícula, (c) la profundidad de biopelícula monitorizada y (d) la distancia entre los puntos monitorizados en el interior de la biopelícula.

La interpretación de los resultados presentados en la Figura 6.6 se llevó a cabo siguiendo el mismo criterio utilizado anteriormente tanto para determinar las variables que son críticas para el DEO como para seleccionar el valor de las condiciones de operación bajo las que se realizaron los experimentos. De acuerdo con este criterio, los resultados de la Figura 6.6 muestran que la precisión de los parámetros biocinéticos es más sensible a cambios en la concentración de OD en el líquido que al resto de las variables estudiadas en el DEO. A pesar de que la influencia de las diferentes variables sobre la incertidumbre de los parámetros biocinéticos es desigual, se observa como

todas ellas provocan cambios superiores al 0.5 % en la incertidumbre de los 3 parámetros estimados. Por este motivo, los perfiles de OD fueron adquiridos considerando el valor óptimo de las 4 variables incluidas en el DEO.

Siguiendo el criterio establecido anteriormente, se consideró que el valor óptimo de la concentración de OD en la fase líquida y en la superficie de la biopelícula durante la adquisición de los perfiles debía ser $6.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 6.6a) y $5.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 6.6b) respectivamente. Los resultados de la Figura 6.6c muestran como el espesor de biopelícula monitorizada (profundidad del perfil de OD adquirido) disminuye el intervalo de confianza de los 3 parámetros biocinéticos. Por este motivo, los perfiles de OD fueron adquiridos monitorizando el espesor máximo de biopelícula (hasta la profundidad en la que se agota el OD). Finalmente, los resultados mostrados en la Figura 6.6d sugieren que el aumento de la distancia entre los puntos monitoreados para la adquisición del perfil disminuye la precisión de la estimación. Por lo tanto la distancia óptima utilizada en la obtención de los perfiles de OD fue la menor posible.

6.3.2. Caracterización del transporte de materia externo

La resistencia al transporte de materia externo se estudió utilizando dos procedimientos diferentes. Por un lado, el $k_{OD,L}$ se estudió cualitativamente a partir del espesor de la capa límite (L_C) (Ecuación 6.5). Por el otro lado, el $k_{OD,L}$ se cuantificó utilizando una metodología de estimación dinámica desarrollada en este trabajo.

6.3.2.1. Espesor de la capa límite

El transporte de materia a través de la interfase líquido-biopelícula se estudió a partir del análisis de un perfil de OD adquirido en una sección de la biopelícula (Figura 6.7). El análisis del perfil de OD permite determinar el espesor de la capa límite sobre la superficie de la biopelícula (Wäsche, Horn y Hempel 2002). A partir de la Ecuación 6.5 esta medida puede utilizarse para evaluar la resistencia al transporte de materia a través de la interfase.

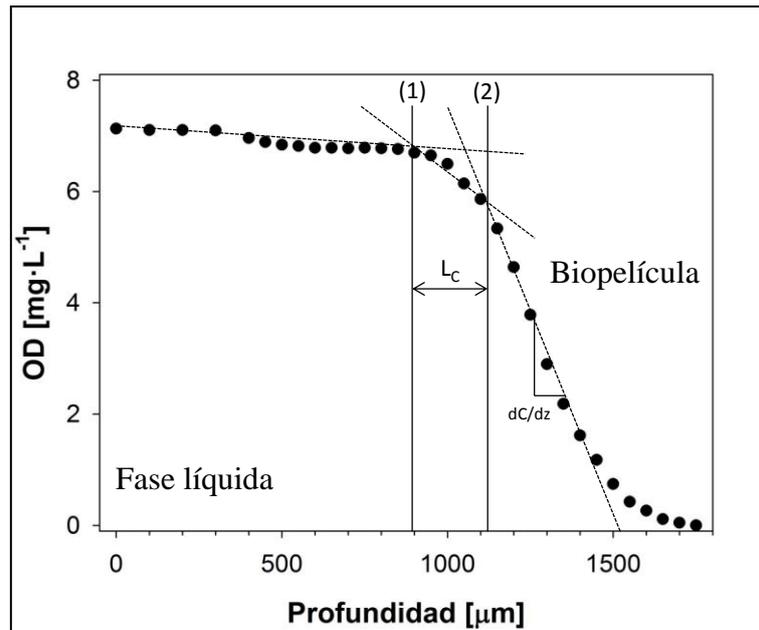


Figura 6.7. Perfil de OD utilizado para determinar el espesor de la capa límite (L_c) y la posición de las superficies de la capa límite (1) y la biopelícula (2).

En la Figura 6.7 se muestra un perfil obtenido monitorizando el OD desde la fase líquida hasta la zona más profunda de la biopelícula. La zona lineal del perfil (OD prácticamente constante) corresponde al interior de la fase líquida (considerando condiciones de mezcla completa en el interior de la biopelícula). Por el otro lado, la parte del perfil prácticamente vertical (gradiente de concentración dC/dz constante) corresponde al interior de la biopelícula. El espesor de la capa límite se define como la distancia entre las dos zonas lineales. Los resultados de la Figura 6.7 revelan un espesor de la capa límite, a una velocidad de circulación de $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ ($Re=4$), de $150 \mu\text{m}$. Este valor se comparó con el presentado en estudios similares (Zhang y Bishop 1995; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000), en los que para Re similares estimaron espesores de la capa límite entre la fase líquida y la biopelícula en el rango entre $75 \mu\text{m}$ y $200 \mu\text{m}$. La utilización de esta medida para estimar el $k_{OD,L}$ requiere considerar la biopelícula como una superficie plana y una difusión homogénea a través de la capa límite. Sin embargo, algunos autores advierten de los inconvenientes de utilizar estas aproximaciones para describir el transporte de materia externo (Beyenal y Lewandowski 2000; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000; Wäsche, Horn y Hempel 2002). Por lo tanto, estos resultados carecen de la precisión suficiente para describir detalladamente el transporte de materia externo en sistemas líquido-biopelícula.

El análisis del perfil de OD también permite determinar la posición de las superficies de la capa límite (1) y de la biopelícula (2). En este sentido, la adquisición de perfiles de

OD a lo largo de la biopelícula y su interpretación siguiendo el método descrito en la Figura 6.7, permite definir en cada punto del reactor el espesor de la película de líquido y la profundidad en la que se encuentra la superficie de la biopelícula.

6.3.2.2. Estimación dinámica del coeficiente externo de transferencia de materia

El $k_{OD,L}$ se cuantificó experimentalmente a partir de la monitorización del flujo de oxígeno a través de la interfase líquido-biopelícula. Para ello, se midieron perfiles dinámicos de oxigenación en los dos lados de la capa límite (resolución espacial de 50 μm). Los perfiles se adquirieron en el centro del reactor ya que, tal y como se observa en la Figura 6.4d, el área de transferencia no influye en la precisión de la estimación. Los perfiles de oxigenación (simulados y experimentales) utilizados en la estimación del $k_{OD,L}$ se muestran en la Figura 6.8.

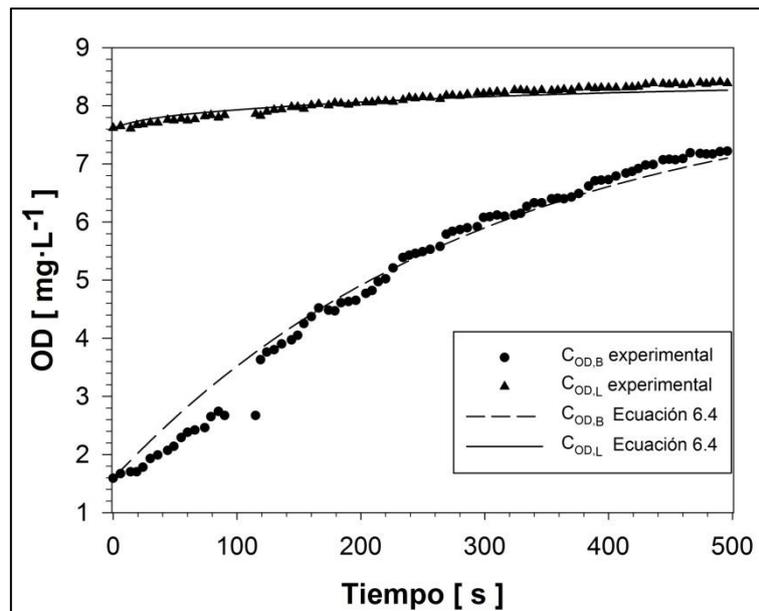


Figura 6.8. Perfiles de oxigenación (experimentales y simulados) adquiridos utilizando microsensores en la capa límite y en la superficie de la biopelícula, utilizados en la estimación del coeficiente de transporte externo (k_L). Los perfiles de OD se adquirieron en el centro del reactor. La velocidad de circulación durante la adquisición de los perfiles se mantuvo en $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

Los perfiles de oxigenación, adquiridos a una velocidad de circulación de la fase líquida de $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, se utilizaron para estimar el $k_{OD,L}$ a través de la interfase, ajustando los perfiles simulados a partir de la Ecuación 6.4. Los resultados de la Figura 6.8 revelan una rápida oxigenación de la fase líquida desde el principio de la re-aireación. La concentración de OD inicial ($7.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) estaba cerca de las condiciones de saturación, y sólo aumento $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante la re-oxigenación. Por el otro lado, la

resistencia al transporte del oxígeno a través de la capa límite determinó la evolución de la concentración de OD en la superficie de la biopelícula. El perfil de concentración de OD en la superficie de la biopelícula muestra un valor inicial de $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una creciente oxigenación hasta $7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El valor de $k_{OD,L}$ estimado ($1.05\cdot 10^{-5} \pm 5.25\cdot 10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) fue comparado con valores de coeficientes de transporte de materia externo en biopelículas reportados en condiciones hidrodinámicas similares (Beyenal y Lewandowski 2000; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000). A pesar de la dificultad para comparar valores obtenidos en diferentes sistemas experimentales, el valor del $k_{OD,L}$ estimado en este estudio está dentro del rango típico reportado en los estudios referenciados (entre $5\cdot 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ y $2.5\cdot 10^{-5} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$).

6.3.3. Caracterización del transporte de materia interno

El transporte de materia interno se caracterizó en la biopelícula heterótrofa cultivada en el BPP-CA. El coeficiente de difusión se estimó adaptando el microsensor MEMS para realizar medidas de corriente límite, y utilizando una metodología para la cuantificación del coeficiente de difusión a partir de perfiles de oxigenación en diferentes profundidades de la biopelícula (adquiridos utilizando el microsensor MEMS).

6.3.3.1. Estimación del coeficiente de difusión a partir de medidas de corriente límite

El estudio del transporte de materia en el interior de la biopelícula, adaptando el microsensor MEMS para realizar medidas de corriente límite, requiere la selección del potencial que satisface las condiciones de corriente límite sobre la superficie de los WE. El potencial de corriente límite se determina a partir del análisis del barrido de potencial en el rango de potencial donde se consume la especie electroactiva (reducción del ferricianuro a ferrocianuro). En la Figura 6.9 se muestra el barrido lineal de potencial entre -1.2 V y -0.3 V (vs. Ag/AgCl), con una velocidad de barrido de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, de un WE sumergido en la solución de ferricianuro.

Los resultados del barrido lineal de potencial (Figura 6.9) permiten seleccionar el potencial a utilizar en la polarización de los WE. El rango de potencial del barrido en el que la intensidad medida es constante (entre -0.5 V y -0.8 V vs. Ag/AgCl) corresponde con los potenciales en los que se cumplen las condiciones de corriente límite. El

potencial seleccionado para realizar las medidas de corriente límite, utilizando el microsensar MEMS, fue -0.70 V (vs. Ag/AgCl). Este potencial se seleccionó porque pequeñas variaciones en el potencial aplicado no afectan la intensidad medida.

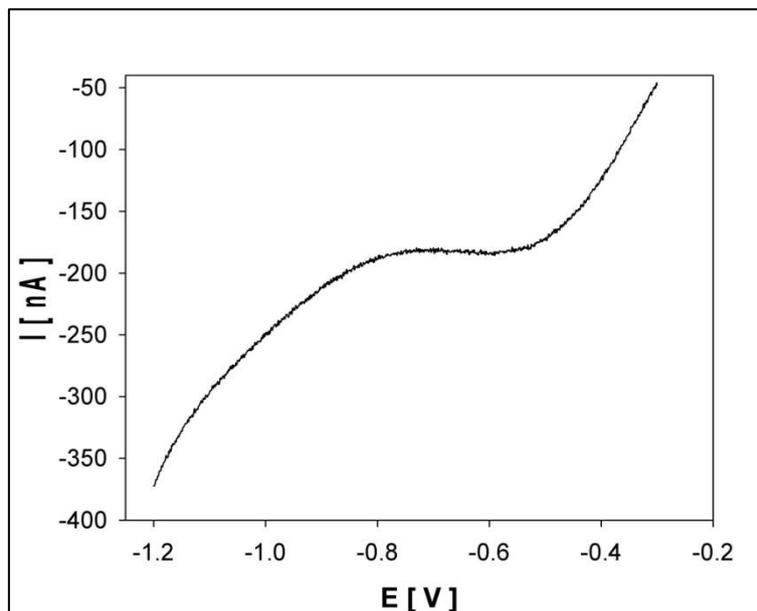


Figura 6.9. Barrido lineal de potencial entre -1.2 y -0.3 V (vs. Ag/AgCl) de un WE del microsensar MEMS en una solución de 0.025 M de ferricianuro.

La validez de la correlación, presentada en la Ecuación 6.3, para estimar el coeficiente de difusión a partir de las medidas de corriente límite realizadas con el microsensar MEMS, debe ser evaluada antes de su utilización. La corriente límite en una solución de ferricianuro (0.025M) y KCl (0.2 M) fue medida con el microsensar MEMS. La corriente medida en la solución se utilizó para estimar el coeficiente de difusión molecular del ferricianuro (utilizando la Ecuación 6.3). El valor del coeficiente de difusión obtenido ($7.225 \cdot 10^{-10} \pm 5.96 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) se comparó con el valor reportado en Gao, Lee y White (1995) ($7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). La pequeña diferencia entre los dos valores validó la utilización de la Ecuación 6.3 para determinar del coeficiente de difusión del ferricianuro a partir de las medidas de corriente límite obtenidas con el microsensar MEMS.

La técnica de corriente límite se utilizó para medir la distribución del coeficiente de difusión del ferricianuro en el interior de la biopelícula (Figura 6.10). Los resultados se estandarizaron, respecto al coeficiente de difusión en el agua, calculando el coeficiente de difusión relativo (D_r), como se muestra en la Ecuación 6.14.

$$D_r = \frac{D_{CN,b}}{D_{CN,w}}$$

Ecuación 6.14

Donde $D_{CN,b}$ es el coeficiente de difusión del ferricianuro en la biopelícula ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) y $D_{CN,w}$ es el coeficiente de difusión del ferricianuro en agua ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). El coeficiente de difusión del oxígeno en la biopelícula ($D_{OD,b}$) puede calcularse a partir del coeficiente relativo (D_r) y la difusividad molecular ($D_{OD,w}$) (Nguyen et al. 2014), tal y como se muestra en la Ecuación 6.15.

$$D_{OD,b} = D_r \cdot D_{OD,w}$$

Ecuación 6.15

Los perfiles de difusión en el interior de la biopelícula se midieron bajo diferentes velocidades de circulación de la fase líquida. En la Figura 6.10 se muestran los perfiles adquiridos utilizando 6 velocidades de circulación diferentes en el rango típico de velocidades de circulación en biofiltros percoladores, entre $2 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ y $25 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ (Devinny, Deshusses y Webster 1999).

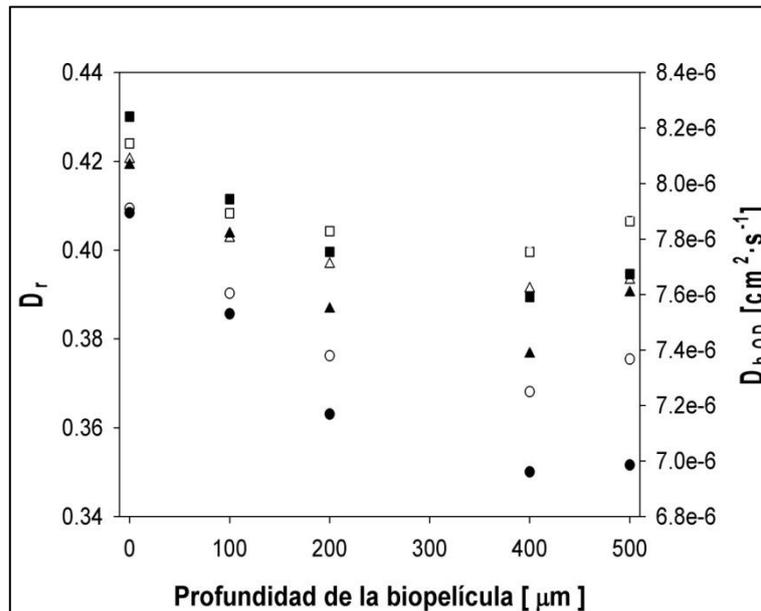


Figura 6.10. Perfiles del coeficiente de difusión (relativo y para el oxígeno) en el interior de la biopelícula heterótrofa medidos utilizando la técnica de corriente límite. Los perfiles se adquirieron en 6 velocidades de circulación diferentes (2 (\bullet), 3 (\circ), 5 (\blacktriangle), 10 (\triangle), 18 (\blacksquare) y 25 (\square) $\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$).

Los resultados (Figura 6.10) muestran que la resistencia al transporte de materia interno aumenta desde la superficie hasta las zonas más profundas de la biopelícula. Este fenómeno se explica por el aumento de la densidad de la biopelícula en las zonas más profundas, tal y como se describe en Zhang y Bishop (1994), que da lugar a una disminución de la porosidad y a la velocidad de difusión. Estos resultados muestran que

la estructura de la biopelícula es heterogénea, influyendo en el valor de la velocidad de transporte de materia.

Comparando los resultados de los 6 perfiles se observa una progresiva disminución de las pendientes al aumentar la velocidad de circulación de la fase líquida. El coeficiente de difusión, que en la menor velocidad de circulación estudiada variaba entre 0.41 en la superficie de la biopelícula y 0.34 en la zona más profunda de la biopelícula, pasó a variar entre 0.43 y 0.41. Estos resultados demuestran que la heterogeneidad de la biopelícula se ve favorecida en condiciones de régimen laminar, y que sus propiedades (en una misma sección) se homogenizan cuando aumentan la turbulencia en el reactor.

Por último, los resultados obtenidos con el microsensor MEMS del coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula se compararon con los resultados reportados en estudios similares con microsensors específicos para la medida de la corriente límite (Beyenal y Lewandowski 2000). Los resultados presentados en el estudio actual para una velocidad de circulación de la fase líquida de $17 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ muestran un coeficiente de difusión relativo que varía entre 0.44 y 0.39. Estos resultados coinciden con los presentados por Beyenal y Lewandowski (2000) (coeficiente de difusión relativo entre 0.45 y 0.41 para una velocidad de circulación de $15 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$). Por lo tanto, la utilización del microsensor MEMS para la obtención de perfiles del coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula resulta muy útil, permitiendo incrementar el conocimiento de la heterogeneidad de la biopelícula. Además, estos perfiles incluso pueden ser utilizados para estimar la distribución de densidad en el interior de la biopelícula (Beyenal, Tanyolaç y Lewandowski 1998) (estudio no presentado en este trabajo).

Sin embargo, esta técnica necesita utilizar una solución electrolítica específica (solución de ferricianuro) que desnaturaliza las biopelículas. Además, la utilización de estos resultados se basa en la suposición de que, a pesar de la diferencia de tamaño, no hay diferencias entre la difusión a través de la biopelícula de las moléculas de ferricianuro y oxígeno. Por este motivo, a pesar de que el método presentado ofrece avances sustanciales en el conocimiento de los mecanismos que dirigen el transporte de oxígeno en el interior de las biopelículas, estos dos factores condicionan la utilización de esta técnica para el estudio del transporte de materia en el interior de biopelículas.

6.3.3.2. Estimación dinámica del coeficiente de difusión

El coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula se estimó a partir de los perfiles de oxigenación adquiridos utilizando el microsensar MEMS. En la Figura 6.11 se muestra la distribución experimental de OD en el interior de la biopelícula durante la re-aireación del reactor, con una velocidad de circulación de $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ y en una sección de biopelícula de concentración $21.20 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, y la distribución de OD simulada utilizando la Ecuación 6.6.

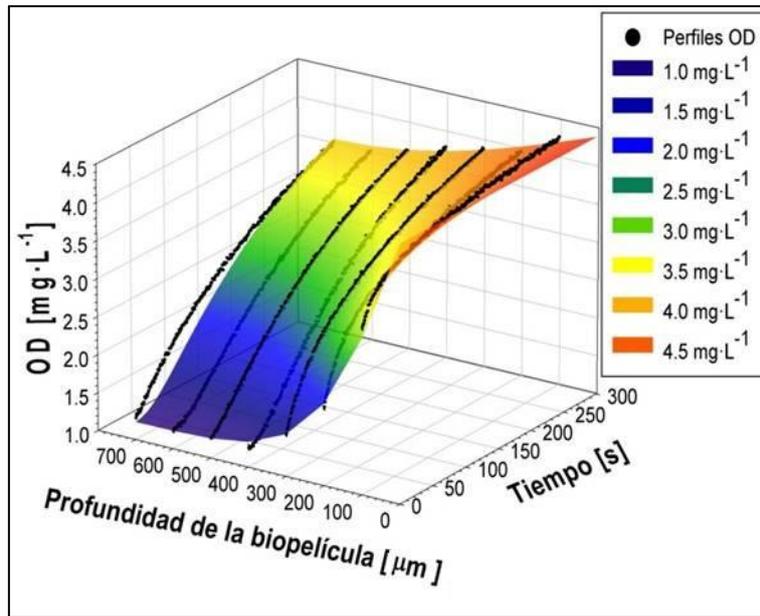


Figura 6.11. Perfiles de oxigenación en diferentes profundidades de la biopelícula simulados utilizando la Ecuación 6.6 (malla) y determinados experimentalmente utilizando el microsensar MEMS (●). Los perfiles experimentales fueron adquiridos en el interior de una sección de biopelícula con una densidad de $21.20 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$. La velocidad de circulación de la fase líquida durante la oxigenación se mantuvo en $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

Los resultados de la Figura 6.11 revelan un buen ajuste entre los resultados experimentales y simulados, que permite estimar el coeficiente de difusión medio en el interior de la sección de biopelícula monitorizada. El valor del coeficiente de difusión medio en la sección de biopelícula monitorizada, obtenido en el ajuste fue de $1.16\cdot 10^{-5} \pm 7.31\cdot 10^{-7} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Los perfiles de oxigenación presentados en la Figura 6.11, muestran como la concentración de OD disminuye en el inicio del experimento desde $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la superficie de la biopelícula hasta $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a una profundidad de $700 \mu\text{m}$. Los perfiles de oxigenación registrados en las diferentes profundidades de la biopelícula presentan una tendencia similar, con una velocidad de oxigenación (calculada como el pendiente de los perfiles) homogénea, alrededor de $1.5\cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Al final del período de oxigenación se observa como la biopelícula presenta una concentración de

OD más homogénea, variando entre $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la superficie y $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la zona más profunda.

El valor del coeficiente de difusión estimado a partir de los perfiles de oxigenación (utilizando el microsensor MEMS) se comparó con el presentado en estudios bibliográficos (Beuling, van Den Heuvel y Ottengraf 2000; Fu, Zhang y Bishop 1994; Bishop, Zhang y Fu 1995). El coeficiente de difusión estimado en estos trabajos (en biopelículas similares a la utilizada en este estudio) presento unos valores relativos entre 0.55 y 0.65. La comparación de estos valores con el valor obtenido en este estudio (0.60) demuestra que el método presentado permite obtener resultados coherentes, dentro del rango típico del coeficiente de difusión en biopelículas heterótrofas.

6.3.4. Caracterización de la biocinética

Los parámetros biocinéticos, presentados en la Ecuación 6.7, se determinaron experimentalmente a partir de perfiles de OD adquiridos en el interior de la biopelícula heterótrofa. La determinación del parámetro de consumo endógeno de OD y los parámetros de crecimiento bacteriano se realizó por separado. Para ello los perfiles de OD se adquirieron en primer lugar bajo condiciones endógenas (sin alimentación de glucosa en el reactor) y posteriormente bajo condiciones de consumo de sustrato (alimentando glucosa). La velocidad de circulación de la fase líquida durante la adquisición de los perfiles de OD se ajustó en $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

La concentración de biomasa en las secciones del reactor (Figura 6.1) fue analizada, obteniendo como resultados $20.10 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, $24.80 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, $28.80 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ y $29.90 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ (desde la entrada hacia la salida de reactor). Estos resultados muestran una elevada heterogeneidad de la biopelícula provocada por el efecto de las condiciones hidrodinámicas del reactor sobre la formación de las biopelículas (Lewandowski y Beyenal 2007). La densidad de la biopelícula disminuye a lo largo del reactor porque las características de la circulación de la fase líquida en este tipo de reactores provocan que el esfuerzo cortante sobre la biopelícula (que provoca el desprendimiento de parte de los microorganismos que forman la biopelícula) disminuya desde la entrada hasta la salida del reactor. A partir de la estimación de los parámetros biocinéticos en las diferentes secciones del reactor fue posible estudiar el efecto de la heterogeneidad de la biopelícula sobre la actividad de los microorganismos. Los parámetros biocinéticos se estimaron utilizando el coeficiente de difusión estimado en la sección 6.3.3.2.

6.3.4.1. Determinación del parámetro de consumo endógeno

El parámetro biocinético endógeno (k_d) se estimó en las 4 secciones citadas anteriormente. Los perfiles de OD se adquirieron por duplicado. La zona de los perfiles correspondiente al interior de la biopelícula se seleccionó utilizando el procedimiento presentado en la Figura 6.7. En la Figura 6.12 se muestran los perfiles experimentales (en condiciones endógenas) y los perfiles simulados (sin tener en cuenta el término de consumo de la Ecuación 6.7) utilizados en la estimación del k_d .

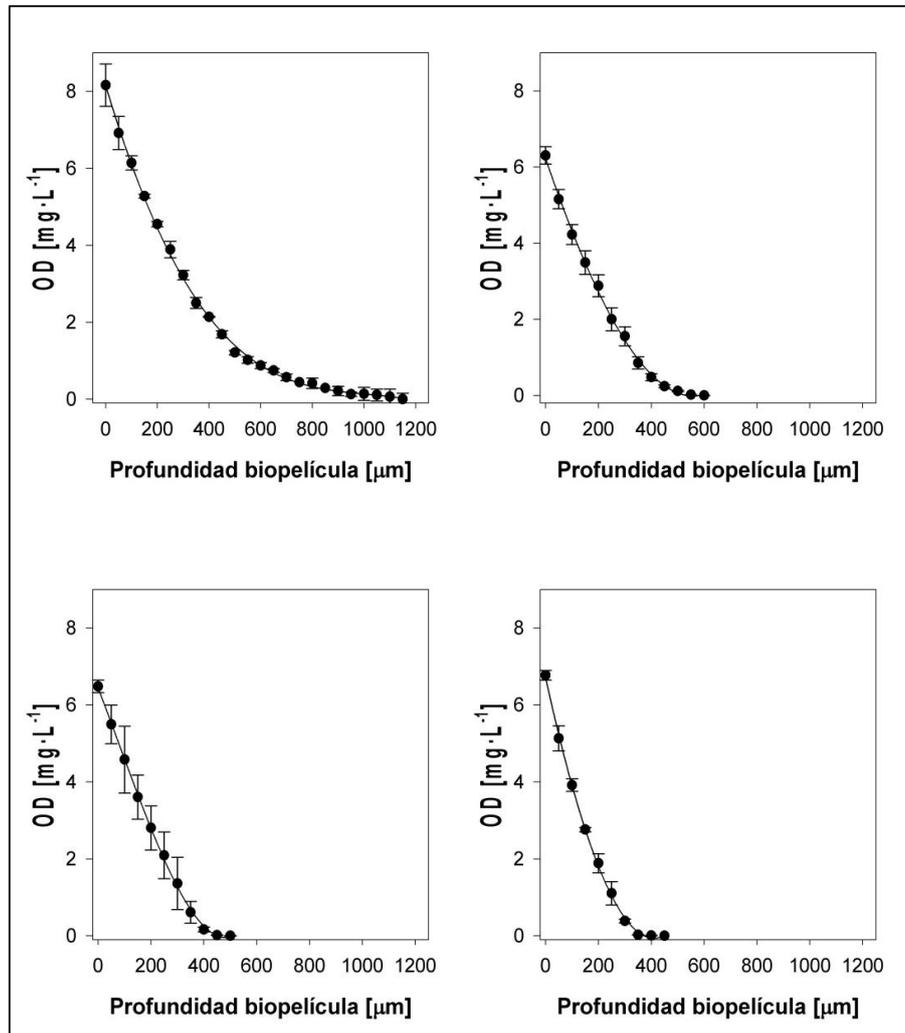


Figura 6.12. Perfiles de OD en el interior de la biopelícula adquiridos en condiciones endógenas utilizando microsensores de OD. Los puntos y las barras de error corresponden al valor medio y la dispersión de la concentración de OD medida en las dos replicas. Los perfiles corresponden a secciones de biopelícula de (a) 20.10 g SSV·L⁻¹, (b) 24.80 g SSV·L⁻¹, (c) 28.80 g SSV·L⁻¹ y (d) 29.90 g SSV·L⁻¹.

Los resultados de la Figura 6.12 muestran un excelente ajuste entre los perfiles experimentales y simulados en las 4 secciones del reactor, confirmado por el valor de los NRMSE (Tabla 6.2), inferiores al 1.5 %. Los valores de k_d resultantes de los ajustes se muestran en la Tabla 6.2. Los perfiles de OD de la Figura 6.12 presentan diferencias

importantes en los valores de OD medido en la superficie de la biopelícula (profundidad 0 μm) y en la profundidad de penetración del OD. Se observa como la concentración de OD en la superficie de la biopelícula disminuye desde la sección del reactor más cercana a la entrada del reactor ($8.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la Figura 6.12a) hasta la salida del reactor ($7.11 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la Figura 6.12d), como resultado del consumo de OD a lo largo del reactor.

El aumento de la densidad de la biopelícula observado a lo largo del reactor (heterogeneidad de la biopelícula) provoca una disminución de la profundidad de penetración del OD (desde 1150 μm hasta 500 μm). Este fenómeno se explica porque la mayor densidad de biopelícula provoca que el agotamiento del OD ocurra a una menor profundidad.

Tabla 6.2. Valores de k_d estimados a partir de perfiles de OD adquiridos en la biopelícula heterótrofa. Los valores se estimaron a partir de los perfiles de la Figura 6.12a (sección 1), la Figura 6.12b (sección 2), la Figura 6.12c (sección 3) y la Figura 6.12d (sección 4).

	Sección 1	Sección 2	Sección 3	Sección 4
k_d [$\text{mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]	$1.68\cdot 10^{-4}\pm 5.54\cdot 10^{-6}$	$1.87\cdot 10^{-4}\pm 1.07\cdot 10^{-6}$	$1.13\cdot 10^{-4}\pm 2.71\cdot 10^{-6}$	$1.25\cdot 10^{-4}\pm 9.75\cdot 10^{-6}$
NRMSE [%]	1.08	1.14	0.94	0.89

Las diferencias observadas en los perfiles de OD se traducen en los valores de k_d estimados (Tabla 6.2), a pesar de que la heterogeneidad de la biopelícula se tiene en cuenta en el procedimiento de estimación (a partir del valor de densidad de biopelícula). Los valores de k_d estimados variaron entre $1.13\cdot 10^{-4} \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $1.87\cdot 10^{-4} \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ a lo largo de la biopelícula. La variación de k_d (39% a lo largo de la biopelícula), muestra la importancia de tener en cuenta el impacto de la heterogeneidad de la biopelícula sobre la actividad de los microorganismos.

Zhou et al. (2012) presentan parámetros cinéticos estimados en una biopelícula heterótrofa. La comparación de estos resultados con los presentados en la Tabla 6.2 es compleja dado que este tipo de parámetros es específico para los microorganismos en los que se estiman y las condiciones de cultivo. No obstante los resultados bibliográficos de k_d (en el intervalo entre $2.5\cdot 10^{-4} \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $2.71\cdot 10^{-4} \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) muestran que los valores obtenidos en este capítulo están dentro del mismo orden de magnitud.

Los resultados obtenidos en este estudio también se compararon con el valor típico de los parámetros de consumo endógeno de biomasa heterótrofa en suspensión (Henze

et al. 2000). El valor típico del consumo endógeno en sistemas en suspensión (en el rango entre $1.0 \cdot 10^{-3}$ y $1.7 \cdot 10^{-3}$ mg OD·g SSV⁻¹·s⁻¹) es un orden de magnitud mayor al observado en este trabajo. Esta diferencia demuestra la importancia de la metodología presentada en este trabajo. La utilización de parámetros biocinéticos estimados a partir de perfiles de OD mejora la descripción de la actividad de la biopelícula.

6.3.4.2. Determinación de los parámetros de crecimiento bacteriano

Los parámetros biocinéticos se estimaron a partir de perfiles de OD. La adquisición de los perfiles se realizó siguiendo el procedimiento descrito para la estimación del k_d , pero incluyendo el crecimiento bacteriano en el modelo. El reactor se alimentó con una concentración de glucosa de 13 g·L⁻¹. Los perfiles de OD se adquirieron pasadas 24 horas del inicio de la alimentación para asegurar que las concentraciones de OD y glucosa en el interior de la biopelícula se encontraban en estado estacionario. El estado estacionario se comprobó antes de la estimación de los parámetros biocinéticos, adquiriendo dos perfiles consecutivos (separados por 15 minutos), en la Figura 6.13.

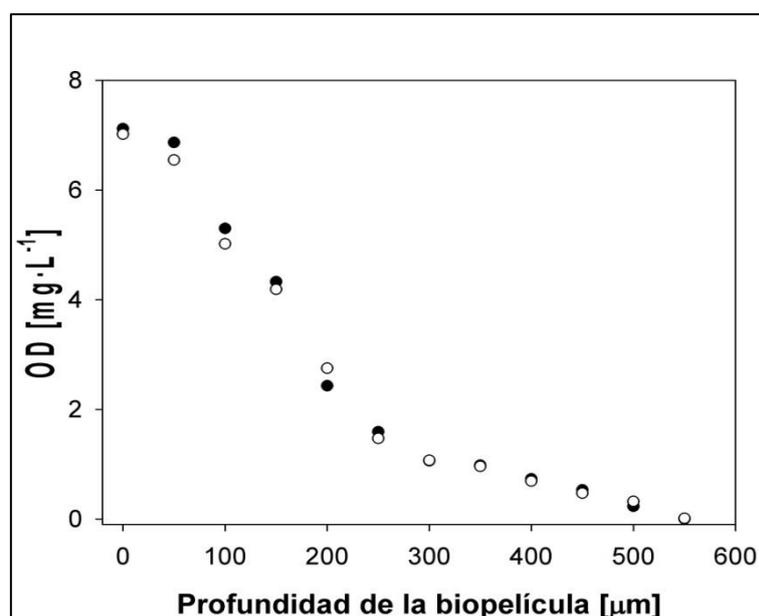


Figura 6.13. Perfiles de OD adquiridos después de 24 horas con alimentación de glucosa (13 g·L⁻¹) en el reactor. Los dos perfiles de OD (●) y (○) se obtuvieron en la misma posición sobre la biopelícula, con un lapsus de 15 minutos entre ambos.

Los resultados de la Figura 6.13 muestran que después de 24 horas del inicio de la alimentación de glucosa en el reactor, los perfiles de OD en el interior de la biopelícula no presentan diferencias a lo largo del tiempo. El valor de NRMSE entre los dos perfiles, 2.21 %, indica que la concentración de OD en el interior de la biopelícula se encuentra en estado estacionario.

En la Figura 6.14 se muestran los perfiles de OD en las diferentes secciones de la biopelícula (experimentales y simulados) adquiridos para la estimación de los parámetros de crecimiento bacteriano ($q_{max,OD}$ y $K_{S,OD}$).

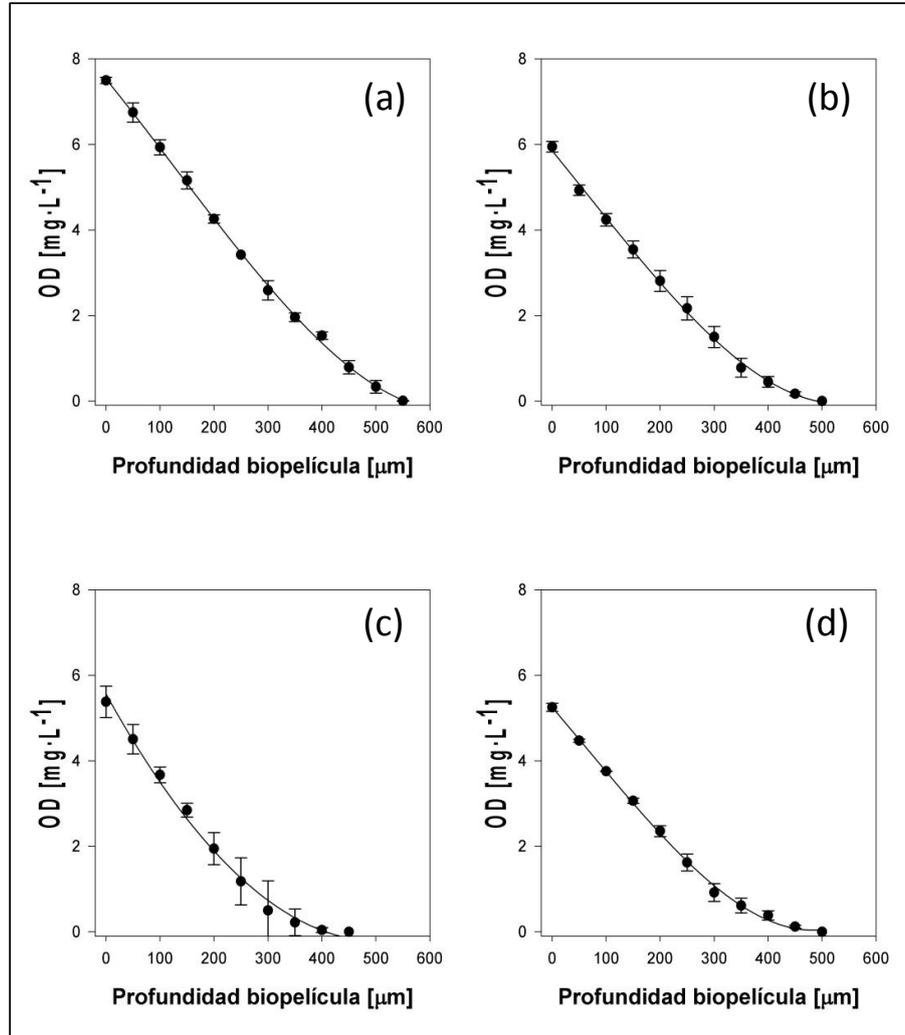


Figura 6.14. Perfiles de OD en el interior de la biopelícula adquiridos utilizando microsensores de OD para la estimación de $q_{max,OD}$ y $K_{S,OD}$. Los perfiles corresponden a secciones de biopelícula de (a) $20.10\text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) $24.80\text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, (c) $28.80\text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ y (d) $29.90\text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los perfiles de OD simulados y adquiridos experimentalmente a lo largo de la biopelícula, en la Figura 6.14, muestran una buena concordancia confirmada por los valores de NRMSE calculados (Tabla 6.3). El excelente ajuste entre los diferentes perfiles dio lugar a una estimación fiable de los parámetros biocinéticos. El valor de los parámetros $q_{max,OD}$ y $K_{S,OD}$ estimados se presentan en la Tabla 6.3. La principal diferencia entre los perfiles de OD en los diferentes puntos del reactor se encuentra en la concentración de OD en la superficie de la biopelícula. El consumo de OD a lo largo del reactor provoca una clara disminución de la concentración de OD en la superficie de la biopelícula desde la entrada ($7.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el perfil de la Figura 6.14a) hasta la salida

(5.09 mg·L⁻¹ en el perfil de la Figura 6.14d) del reactor. Comparando los perfiles de OD en condiciones de consumo (Figura 6.14) y en condiciones endógenas (Figura 6.12), se puede comprobar que la actividad de los microorganismos elimina las diferencias en la profundidad de penetración del OD observadas a lo largo de la biopelícula trabajando bajo condiciones endógenas (entre 450 μm y 1100 μm en condiciones endógenas, y entre 450 μm y 550 μm en condiciones de consumo). El consumo de oxígeno debido a la actividad de los microorganismos disminuye la penetración del OD en el interior de la biopelícula, reduciendo las diferencias observadas a lo largo de la biopelícula en la Figura 6.12.

Tabla 6.3. Valores de $q_{max,OD}$ y $K_{S,OD}$ estimados a partir de perfiles de OD adquiridos en la biopelícula heterótrofa. Los valores se estimaron a partir de los perfiles de la Figura 6.14a (sección 1), la Figura 6.14b (sección 2), la Figura 6.14c (sección 3) y la Figura 6.14d (sección 4).

	Sección 1	Sección 2	Sección 3	Sección 4
$q_{max,OD}$ [mg OD·g SSV ⁻¹ ·s ⁻¹]	0.0015±6.75·10 ⁻⁵	0.0019±1.01·10 ⁻⁴	0.0025±1.88·10 ⁻⁴	0.0037±1.22·10 ⁻⁴
$K_{S,OD}$ [mg OD·L ⁻¹]	0.425±0.020	0.475±0.030	0.510±0.040	0.550±0.020
NRMSE [%]	0.95	1.20	3.04	1.31

Los resultados presentados en la Figura 6.14 y en la Tabla 6.3 muestran que la heterogeneidad de la biopelícula tiene una influencia importante en la estimación de los parámetros de consumo. El efecto de la heterogeneidad de la biopelícula es diferente para la estimación de los parámetros $q_{max,OD}$ y $K_{S,OD}$. Los valores de $q_{max,OD}$ presentan una variación del 59 % (entre 0.0015 mg OD·g SSV⁻¹·s⁻¹ y 0.0037 mg OD·g SSV⁻¹·s⁻¹), mientras los valores de $K_{S,OD}$ sólo varían un 20% (entre 0.425 mg·L⁻¹ y 0.550 mg·L⁻¹).

El valor obtenido en la estimación de los parámetros de crecimiento (Tabla 6.3) se comparó con el valor bibliográfico presentado en trabajos similares (Zhou et al. 2012; Yurt et al. 2003). En Zhou et al. (2012), los parámetros biocinéticos se estiman sin tener en cuenta el efecto de la heterogeneidad de la biopelícula. Sin embargo, los resultados presentados por los autores revelan una variabilidad el valor de los parámetros similar a la observada en los resultados presentados en este capítulo. Esta variabilidad confirma la suposición de que la heterogeneidad de la biopelícula influye en el valor de los parámetros biocinéticos estimados. La variabilidad del parámetro $q_{max,OD}$ presentado en la Tabla 6.3 es comparable con la que se observa en Zhou et al. (2012) donde el parámetro biocinético presenta una variación del 20% (entre 0.0025 mg OD·g SSV⁻¹·s⁻¹ y 0.0030 mg OD·g SSV⁻¹·s⁻¹). Del mismo modo, los resultados de $K_{S,OD}$ presentados en la Tabla 6.3 presenta unos valores similares a los bibliográficos, donde se observa una

variación en el valor del parámetro del 10 % (entre $0.45 \text{ mg OD}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.55 \text{ mg}\cdot\text{OD}\cdot\text{L}^{-1}$). En Yurt et al. (2003) estimaron los parámetros de crecimiento en una biopelícula heterótrofa a partir de perfiles de OD. Sin embargo, los autores sólo fueron capaces de estimar el coeficiente de semi-saturación, obteniendo un valor ligeramente inferior al observado en el presente trabajo ($0.33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados bibliográficos muestran como los valores de los parámetros de crecimiento estimados utilizando la metodología presentada en este capítulo están dentro el rango típico de estos parámetros.

El valor estimado para los parámetros de crecimiento también se comparó con el valor típico de biomasa heterótrofa cultivada en sistemas de suspensión (Henze et al. 2000). Como se observó en la comparación del coeficiente de consumo endógeno, los valores típicos de $q_{max,OD}$ en cultivos en suspensión (entre $0.01 \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $0.017 \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) sobreestiman la actividad de la biomasa inmovilizada. El coeficiente de semi-saturación ($K_{S,OD}$) en biomasa en suspensión presenta un valor típico ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) inferior al observado en cultivos inmovilizados. Estos resultados demuestran de nuevo la importancia de utilizar parámetros estimados a partir de perfiles de OD para describir la actividad de los microorganismos cuando se encuentran inmovilizados, ya que no siempre es posible considerar su comportamiento igual que el de cultivos en suspensión.

6.4. CONCLUSIONES

La utilización de microsensores para la monitorización dinámica del OD en experimentos de re-aireación ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para la caracterización de biopelículas. Utilizando estas técnicas ha sido posible desarrollar metodologías para la cuantificación de las resistencias al transporte externo e interno y para la estimación de los parámetros biocinéticos en el interior de una biopelícula heterótrofa. Las metodologías presentadas han sido complementadas con la evaluación de los intervalos de confianza y con un diseño experimental para aumentar la fiabilidad de los parámetros estimados.

El potencial de los microsensores para realizar medidas con una elevada resolución espacial se ha aprovechado para desarrollar un método dinámico para la estimación del coeficiente de transporte de materia externo, que ha permitido sustituir los métodos de estudio cualitativo. Este método permite obtener información cuantitativa a partir de medidas directas en sistemas de biopelículas.

La adaptación del microsensar MEMS para realizar medidas de corriente límite ha permitido comprobar que el transporte de materia en el interior de la biopelícula está muy influenciado por la heterogeneidad de la biopelícula (en términos de densidad de biopelícula) y por las condiciones hidrodinámicas en el reactor. Sin embargo, las diferencias entre la especie electroactiva utilizada en esta técnica y el OD sólo permite utilizar estos resultados de forma cualitativa.

La utilización del microsensar MEMS ha permitido simplificar el procedimiento necesario para adquirir simultáneamente perfiles de oxigenación a diferentes profundidades de la biopelícula. Estos perfiles han sido utilizados con éxito en la estimación del coeficiente de difusión medio en la sección de biopelícula monitorizada. Este procedimiento resulta de gran utilidad ya que su simplicidad permite su utilización para la caracterización del transporte de materia en diferentes sistemas experimentales.

Por último, se ha desarrollado una metodología para la estimación de los parámetros cinéticos de los microorganismos que crecen en la biopelícula a partir de la adquisición de perfiles de OD. La estimación de los parámetros biocinéticos a partir de la adquisición de medidas en su interior mejora el conocimiento sobre la actividad de la biopelícula, que comúnmente se describe a partir de estudios en cultivos en suspensión.

Capítulo 7

Modelización de un Bioreactor de Placa Plana a partir de la caracterización del transporte de materia externo e interno en biopelículas heterótrofas utilizando microsensores

7. MODELIZACIÓN DE UN BIOREACTOR DE PLACA PLANA A PARTIR DE LA CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE MATERIA EXTERNO E INTERNO EN BIOPELÍCULAS HETERÓTROFAS UTILIZANDO MICROSENSORES

En este capítulo se han utilizado las metodologías (desarrolladas en el capítulo 6) para caracterizar el transporte de materia externo e interno en una biopelícula heterótrofa, estudiando el efecto de dos parámetros clave del proceso como las condiciones hidrodinámicas y la densidad de la biopelícula. Los coeficientes de transporte de materia estimados experimentalmente se han incorporado en el desarrollo de un modelo para una biopelícula heterótrofa.

Resumen

El efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la resistencia al transporte de materia se ha evaluado en el rango típico de velocidades de circulación de la fase líquida sobre biopelículas en sistemas de biofiltración (Reynolds entre 0.5 y 7). La tendencia de los coeficientes de transporte de materia externo, dentro de este rango, mostraron discrepancias con las predicciones de los modelos convencionales que describen el transporte de materia externo en condiciones laminares. Por otro lado, el estudio del transporte de materia interno reveló una estrecha relación entre la estructura de la biopelícula y los mecanismos de transporte. En este sentido, se observó como el transporte de materia en el interior de la biopelícula está controlado por la difusión a través de los agregados de microorganismos a velocidades de circulación inferiores a $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Re 2.8). Sin embargo, a velocidades de circulación superiores a $20 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Re 5.6), se observó como el transporte de materia interno está impulsado por mecanismos de convección dentro de los poros, los huecos y los canales de la biopelícula. Entre las dos velocidades de circulación, el transporte de materia interno ocurre por una combinación de mecanismos de transporte de materia difusivos y convectivos. El coeficiente de difusión estimado en biopelículas de diferente densidad mostró un incremento lineal de la resistencia al transporte de materia cuando aumenta la densidad de la biopelícula (debido a la disminución de la porosidad) hasta una densidad de la biopelícula de $50 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$. En biopelículas de densidades superiores se observaron limitaciones en el transporte de materia interno. La fiabilidad de los resultados en la determinación de los coeficientes de transportes de materia externo e interno se aseguró a partir del diseño experimental óptimo y de la estimación de los intervalos de confianza

de los parámetros estimados, utilizando el procedimiento matemático presentado en el capítulo 6. Los resultados de estos estudios se utilizaron para proponer correlaciones empíricas para el cálculo de los coeficientes de transporte de materia a partir del Re en el sistema y la densidad de la biopelícula. Estas correlaciones y el modelo cinético desarrollado en el capítulo 6 se incorporaron en el desarrollo del modelo de una biopelícula heterótrofa. El modelo resultante simplificó la etapa de calibrado y mejoró su respuesta respecto a modelos basados en parámetros bibliográficos, incorporando el efecto de la densidad de la biopelícula y las condiciones hidrodinámicas en las predicciones del modelo.

Una versión modificada de este capítulo ha sido publicada en:

X. Guimerà, A. D. Dorado, A. Bonsfills, D. Gabriel, G. Gabriel, X. Gamisans. Dynamic characterization of external and internal mass transport in heterotrophic biofilm from microsensors measurements. *Wat. Res.* (Enviado)

Parte del contenido de este capítulo ha sido presentado en:

7th European Meeting on Chemical Industry and Environment (2015). *Effect of biomass density on oxygen diffusivity measured inside biofilms with a MEA sensor.* X. Guimerà, A. D. Dorado, A. Bonsfills, D. Gabriel, X. Gamisans.

7.1. INTRODUCCIÓN

La modelización de los sistemas de biofiltración es una herramienta de gran utilidad para el diseño y control de los bioreactores. La descripción de los mecanismos de degradación, que generalmente tienen lugar en el interior de las biopelículas, es la etapa más importante en el desarrollo de modelos matemáticos de sistemas de biofiltración. El funcionamiento de las biopelículas se modeliza teniendo en cuenta el transporte de materia de nutrientes y contaminantes desde la fase líquida hasta el interior de la biopelícula (transporte de materia externo e interno) y la velocidad de consumo de los microorganismos (biocinética).

El escaso conocimiento del funcionamiento de las biopelículas debido a las limitaciones para su monitorización ha llevado a asumir simplificaciones importantes en el desarrollo de modelos para biopelículas (Beyenal y Lewandowski 2005). Entre las simplificaciones que comprometen la fiabilidad de estos modelos destacan la adaptación de parámetros cinéticos estimados en cultivos en suspensión para describir la actividad de las biopelículas (Hille et al. 2009; Mannucci et al. 2012) (a pesar de las diferencias fisiológicas entre los dos tipos de crecimiento), y la utilización de coeficientes de difusión constantes a lo largo de las biopelículas sin tener en cuenta el efecto de la densidad y la heterogeneidad de la biopelícula (Dorado et al. 2008), incluso aproximando su valor al de coeficientes de difusión en el agua (Kim y Deshusses 2003).

La monitorización del OD mediante microsensores es una técnica muy potente, utilizada en el capítulo 6 para la caracterización del transporte de materia y las cinéticas biológicas en el interior de biopelículas. El conocimiento de los mecanismos de degradación obtenido en estos estudios puede utilizarse para desarrollar modelos rigurosos y precisos que permiten avanzar en el estudio y la optimización de los bioreactores. De este modo, estas medidas han sido utilizadas para desarrollar el modelo cinético de una biopelícula heterótrofa. Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando microsensores no han sido utilizados para desarrollar modelos que consideren conjuntamente la influencia de las condiciones hidrodinámicas y la estructura de la biopelícula sobre el transporte de materia.

La influencia de las condiciones hidrodinámicas sobre el transporte de materia externo ha sido estudiado, utilizando microsensores, por diferentes autores (Horn y Hempel 1995; Zhang y Bishop 1995), que han desarrollado correlaciones empíricas para

el cálculo del coeficiente de transferencia de materia. Sin embargo, estos estudios no consideran el efecto de la heterogeneidad superficial de la biopelícula sobre los mecanismos de transporte (suponen la interfase entre la fase líquida y la biopelícula como una superficie plana). Esta suposición entra en contradicción con lo que sugieren diferentes autores (Beyenal y Lewandowski 2000; Wäsche, Horn y Hempel 2002), que no consideran válida esta aproximación para describir el transporte de materia entre una fase líquida y una biopelícula.

El estudio del impacto de las condiciones hidrodinámicas sobre el transporte de materia en el interior de biopelículas, convencionalmente utilizando herramientas ópticas (microscopio confocal) ha revelado la existencia del movimiento de la fase líquida a través de ella (De Beer, Stoodley y Lewandowski 1994; Stoodley, Lewandowski y de Beer 1994).

Respecto a la influencia de la estructura de la biopelícula sobre el transporte de materia interno, ha sido estudiada utilizando tanto técnicas ópticas (De Beer et al. 1994) como microsensores (Bishop, Zhang y Fu 1995; Schramm et al. 1996; Okabe et al. 1999; Zhu et al. 2001). Los resultados de estos estudios sugieren que el efecto de la heterogeneidad de las biopelículas sobre la difusión debe abordarse considerando la influencia de las condiciones hidrodinámicas y la densidad de la biopelícula. Sin embargo, las correlaciones desarrolladas por diferentes autores para el cálculo del coeficiente de difusión en el interior de biopelículas sólo consideran el efecto de la estructura de las biopelículas a partir de parámetros macroscópicos como la porosidad o la densidad (Fan et al. 1990; Horn y Morgenroth 2006; Hinson y Kocher 1996; Zhang y Bishop 1994b; Beyenal, Seker y Tanyolaç 1997). A pesar de que estas correlaciones han sido utilizadas en modelos de biofiltración, el procedimiento utilizado en su desarrollo compromete su fiabilidad. La mayoría de estas correlaciones se basa en modelos teóricos (Zhang y Bishop 1995) o en suposiciones importantes (Hinson y Kocher 1996). Por el otro lado, las correlaciones empíricas se han desarrollado utilizando estimaciones experimentales del coeficiente de difusión en el interior de agregados de biomasa (Fan et al. 1990; Beyenal et al. 1997). Las diferencias estructurales entre las biopelículas y los gránulos de biomasa pone en compromiso la extrapolación de estas correlaciones para describir el transporte de materia en el interior de biopelículas.

Teniendo en cuenta las limitaciones que presentan los modelos disponibles para describir el transporte de materia externo e interno, las metodologías desarrolladas en el capítulo 6 para la estimación de los coeficientes de transferencia de materia y difusión han sido utilizadas para investigar la relación entre las condiciones hidrodinámicas y la densidad de la biopelícula, y el transporte de materia. La fiabilidad de estos estudios se aseguró utilizando el procedimiento basado en la FIM (presentado en el capítulo 6) para seleccionar las condiciones experimentales óptimas y evaluar los intervalos de confianza durante la estimación de los parámetros. Los resultados de estos estudios se utilizaron para proponer dos correlaciones para evaluar los coeficientes de transporte de materia. Finalmente, las correlaciones empíricas y el modelo cinético desarrollado a partir de perfiles de OD (capítulo 6) se incluyeron en el modelo que describe la degradación de la glucosa en el interior de una biopelícula heterótrofa, para evaluar la mejora de la respuesta del modelo utilización de parámetros experimentales en lugar de parámetros bibliográficos.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Caracterización del transporte de materia

La influencia de las condiciones hidrodinámicas y la estructura de la biopelícula sobre el transporte de materia, se evaluó estimando los coeficientes de transferencia de materia y de difusión en diferentes condiciones de velocidad de circulación de la fase líquida (entre $2.5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ y $24 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, correspondiente a Re entre 0.5 y 7) y de densidad de biopelícula (entre $9 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ y $70 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados de estos estudios se utilizaron para desarrollar correlaciones empíricas para evaluar los parámetros de transporte de materia. Las metodologías utilizadas en la estimación de los parámetros de transporte de materia y el procedimiento utilizado en el desarrollo de las correlaciones empíricas se presentan a continuación.

7.2.1.1. Metodologías para la caracterización del transporte de materia

El coeficiente de transferencia de materia externo y el coeficiente de difusión se estimaron sobre una biopelícula heterótrofa cultivada en un bioreactor de placa plana de canal abierto (BPP-CA). Los coeficientes de transporte de materia se estimaron utilizando las metodologías de estimación dinámica, presentadas en las secciones 6.3.2.2 y 6.3.3.2, que proporcionaron una estimación precisa de los coeficientes de

transporte de materia. Las condiciones experimentales bajo las cuales se determinaron los coeficientes de transporte de materia se seleccionaron utilizando el diseño de experimentos óptimos, con el objetivo de incrementar la fiabilidad de las estimaciones. Este procedimiento también se utilizó para evaluar los intervalos de confianza de los parámetros estimados.

7.2.1.2. Desarrollo de correlaciones empíricas para evaluar el transporte de materia

Los modelos disponibles para la descripción del transporte de materia externo expresan el coeficiente de transferencia de materia como el número adimensional de Sherwood (Sh), calculado a partir de los números de Reynolds (Re) y Schmidt (Sc) siguiendo la relación $Sh-Re$ que se muestra en la Ecuación 7.1.

$$Sh = \alpha \cdot Re^{\beta} \cdot Sc^{\gamma}$$

Ecuación 7.1

Donde α , β y γ son los parámetros que definen la relación $Sh-Re$. Los resultados experimentales de k_L a diferentes velocidades de circulación se utilizaron para proponer una correlación empírica del tipo $Sh-Re$ (Ecuación 7.1). Para ello, los resultados de k_L se utilizaron para calcular el Sh , la velocidad de circulación se utilizó para calcular el Re y las propiedades físicas del fluido se utilizaron para determinar el Sc . El valor de los números adimensionales, calculados a partir de los resultados del estudio sobre el transporte de materia externo, se ajustaron a la (Ecuación 7.1) determinando los parámetros de la correlación empírica (α , β y γ). El ajuste se llevó a cabo siguiendo un procedimiento de optimización sin restricciones.

El valor de las propiedades físicas del fluido, utilizados en la estimación de los números adimensionales se muestran en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Propiedades físicas del fluido en el interior de la capa límite, necesarias para el cálculo de los números adimensionales de Sh , Re y Sc .

Parámetro	Valor	Descripción
$D_{OD,i}$ [$m^2 \cdot s^{-1}$]	$2 \cdot 10^{-9}$	Coefficiente de difusión del oxígeno (20°C) (Nguyen et al. 2014)
$\rho_{OD,i}$ [$kg \cdot m^{-3}$]	1000	Densidad del fluido (20°C) (Perry y Green 1997)
$\mu_{OD,i}$ [$kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$]	0.001	Viscosidad dinámica del fluido (20°C) (Perry y Green 1997)
x_L [m]	$1 \cdot 10^{-3}$	Longitud hidrodinámica característica (determinada experimentalmente)

La baja concentración de sales del medio mineral utilizado permitió aproximar las propiedades físicas del fluido en el interior de la capa límite (Tabla 7.1) a las del agua. La longitud hidrodinámica característica (x_L) utilizada en la estimación del Sh y del Re , se definió como el grueso de la fase líquida a lo largo del reactor, tal y como se propone en Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen (2000). El grosor de la película de líquido se determinó experimentalmente a partir del análisis de los perfiles de OD (adquiridos a lo largo de la biopelícula) siguiendo el procedimiento presentado en la Figura 6.7.

Los resultados del estudio del transporte de materia interno se utilizaron para proponer una correlación experimental para la estimación del coeficiente de difusión. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo general multi-variable. Utilizando Minitab se realizó un análisis de regresión y correlación en el que se definieron las relaciones entre la variable dependiente (coeficiente de difusión) y las variables independientes (velocidad de circulación de la fase líquida y densidad de la biopelícula).

7.2.2. Cultivo de biopelículas heterótrofas

Los experimentos presentados en este capítulo se realizaron sobre una biopelícula heterótrofa cultivada en un bioreactor de placa plana. El reactor se puso en marcha y se operó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.1.2.1, utilizando como inóculo un consorcio de microorganismos procedente de una planta piloto para el tratamiento de agua residual. El reactor se alimentó con una solución de medio mineral (sección 4.1.2.1) utilizando glucosa como fuente de carbono y energía ($13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Las condiciones de operación (tiempo de residencia y velocidad de la fase líquida) durante la formación de las biopelículas se seleccionaron reproduciendo la operación de un biofiltro percolador (8 horas y $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivamente) (Devinny, Deshusses y Webster 1999). Durante la operación del bioreactor se monitorizaron la densidad de biopelícula y la concentración de glucosa, siguiendo las técnicas analíticas descritas en la sección 4.2.1.

La caracterización del transporte de materia en el interior de la biopelícula requirió la inactivación de los microorganismos. La bioactividad de la biopelícula se inhibió recirculando una solución de NaN_3 . Este procedimiento de desactivación (descrito en detalle en la sección 6.2.1.1) permitió mantener intactas las características estructurales de la biopelícula (Matson y Characklis 1976; Horn y Morgenroth 2006).

7.3. MODELO MATEMÁTICO DEL BIOREACTOR DE PLACA PLANA

En este apartado se presenta un modelo matemático desarrollado para simular el comportamiento de la biopelícula heterótrofa aerobia cultivada en un bio reactor de placa plana, utilizando glucosa como la única fuente de carbono y energía. El modelo se desarrolló considerando el transporte físico de nutrientes y sustratos, y los procesos biológicos a lo largo del bio reactor. El modelo matemático describe la biodegradación aerobia de la glucosa en el interior de la biopelícula heterótrofa.

7.3.1. Suposiciones del modelo

El desarrollo y la resolución del modelo matemático se basaron en una serie de simplificaciones. Las suposiciones asumidas, basadas en modelos consolidados (Dorado et al. 2008; Kim y Deshusses 2003), se presentan a continuación:

- 1) No hay acumulación de biomasa en el reactor, y las propiedades de la biomasa (espesor, densidad y parámetros biocinéticos) son constantes a lo largo de toda la biopelícula.
- 2) El espesor de la capa de líquido que recubre la biopelícula es constante en las diferentes secciones en las que se divide la biopelícula.
- 3) La circulación de la fase líquida a lo largo de la placa plana se puede considerar de tipo pistón despreciando la dispersión axial (Dorado 2009; Rodriguez 2013).
- 4) El transporte de materia desde la fase líquida hasta la biopelícula se define a partir de un coeficiente de transferencia de materia.
- 5) El transporte de materia en el interior de la biopelícula tiene lugar por difusión, siguiendo la ley de Fick.
- 6) La profundidad de la biopelícula se discretiza en diferentes capas de espesor homogéneo, con una entrada desde la capa anterior y una salida hacia la capa siguiente.
- 7) No se considera reacción en la fase líquida (la fracción de biomasa en la fase líquida es despreciable) (Kim y Deshusses 2003; Rodriguez 2013).
- 8) La degradación de la glucosa en el interior de la biopelícula heterótrofa se describe utilizando el modelo cinético de Monod, con la concentración de oxígeno como único factor limitante del crecimiento de los microorganismos. Esta suposición se validó a partir de la medida de glucosa en el reactor, y de

la comparación de estos resultados (concentraciones de glucosa superiores a $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con el valor típico de la constante de semi-saturación de la glucosa en cultivos heterótrofos (inferiores a $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Wick, Weilenmann y Egli 2002).

7.3.2. Balances de materia en el bioreactor de placa plana

El modelo del bioreactor de placa plana se basa en los balances de materia de la glucosa y el oxígeno a lo largo del reactor. Las ecuaciones utilizadas para plantear los balances de materia en las diferentes fases se muestran a continuación. Las variables de concentración que se presentan hacen referencia a las especies m estudiadas (glucosa y oxígeno).

7.3.2.1. Fase líquida

De acuerdo con el régimen de circulación de la fase líquida, definido en las suposiciones del modelo, el balance de materia de las diferentes especies en la fase líquida se expresa siguiendo la Ecuación 7.2.

$$\frac{\partial C_{m,L}}{\partial t} = -v_L \cdot \frac{\partial C_{m,L}}{\partial l} \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Donde $C_{m,L}$ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) es la concentración de las especies m en la fase líquida, v_L es la velocidad de circulación de la fase líquida ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), t es el tiempo (s) y l es la posición en la longitud del reactor (m). La velocidad de circulación de la fase líquida se define a partir del caudal de alimentación (Q_{alim}), el de recirculación (Q_{rec}) y la sección de la película de líquido.

7.3.2.2. Transferencia de materia de la fase líquida a la biopelícula

La transferencia de materia entre la fase líquida y la biopelícula generalmente se estudia utilizando la teoría de la doble película (Lewis y Whitman 1924), considerando que la resistencia al transporte de materia sólo se encuentra en la película de líquido sobre la superficie de la biopelícula. Teniendo esto en cuenta, el flujo de las dos especies a través de la interfase del líquido se expresa siguiendo la Ecuación 7.3.

$$\left. \frac{dC_{m,B}}{dt} \right|_{\text{interfase}} = k_{m,L} \cdot a \cdot [C_{m,L} - C_{m,B}] \quad \text{Ecuación 7.3}$$

Donde $C_{m,B}$ es la concentración de las dos especies en la superficie de la biopelícula ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), $k_{m,L}$ es el coeficiente de transferencia de materia externa ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) y a es el área específica de transferencia (m^{-1}).

7.3.2.3. Biopelícula

Las propiedades de la biopelícula heterótrofa modelizada (grosor, densidad y parámetros biocinéticos) se consideran homogéneas en las diferentes secciones en las que se discretiza el reactor. Estas propiedades se consideran homogéneas a lo largo del tiempo, considerando que no hay acumulación de microorganismos en la biopelícula. El efecto de la heterogeneidad de la biopelícula se incluye en el modelo utilizando un coeficiente de difusión variable en función de las características estructurales de la biopelícula. De acuerdo con estas consideraciones el balance de materia en el interior de la biopelícula sigue la Ecuación 7.4.

$$\frac{dC_{m,b}}{dt} = D_{m,b} \frac{\partial^2 C_{m,b}}{\partial z^2} \quad \text{Ecuación 7.4}$$

Donde $C_{m,b}$ es la concentración de las dos especies en el interior de la biopelícula ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), $D_{m,b}$ es el coeficiente de difusión de cada una de las especies en la biopelícula ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) y z es la posición en la profundidad de la biopelícula (m).

7.3.2.4. Velocidad de crecimiento de los microorganismos

La cinética de degradación de los microorganismos heterótrofos generalmente se describe utilizando el modelo cinético de Monod (Henze et al. 2000; Zhou et al. 2012; Yurt et al. 2003), considerando que el crecimiento de los microorganismos está limitado por la concentración de oxígeno y sustrato (Yurt, Sears y Lewandowski 2002; Henze et al. 2000) o sólo por la concentración de oxígeno (Zhou et al. 2012). La expresión general de la velocidad de crecimiento de los microorganismos, a partir de la cual se definen las velocidades de consumo de las dos especies, se muestra en la Ecuación 7.5.

$$\frac{dX_b}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{C_{OD,b}}{K_{S,OD} + C_{OD,b}} \cdot \frac{C_{G,b}}{K_{S,G} + C_{G,b}} \cdot X_b \quad \text{Ecuación 7.5}$$

Donde X_b es la concentración de microorganismos en la biopelícula ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), μ_{max} es la velocidad máxima de crecimiento de los microorganismos (s^{-1}), $C_{OD,b}$ es la concentración de oxígeno en la biopelícula ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), $K_{S,OD}$ es el coeficiente de semi-saturación de Monod para el oxígeno ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), $C_{G,b}$ es la concentración de glucosa en la biopelícula ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) y $K_{S,G}$ es el coeficiente de semi-saturación de Monod para la glucosa ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$).

7.3.3. Resolución numérica

La resolución de las ecuaciones de balance que describen los fenómenos que tienen lugar en el interior del reactor de placa plana se realiza mediante un procedimiento de discretización (Figura 7.1). El objetivo de la discretización es simplificar las ecuaciones diferenciales parciales (que dependen del tiempo (t), de la longitud del reactor (x) y de la profundidad de la biopelícula (z)) a ecuaciones diferenciales ordinarias (que sólo dependen del tiempo). Para ello, el flujo (tipo pistón) se divide en nL secciones que se comportan como un reactor de tanque agitado (propiedades constantes). Esta división se realiza tanto en la fase líquida como en la biopelícula. La discretización del sistema se completa dividiendo cada una de las secciones de biopelículas resultantes en nb capas, en las que las propiedades también se consideran homogéneas. El resultado de la discretización se puede observar en la Figura 7.1.

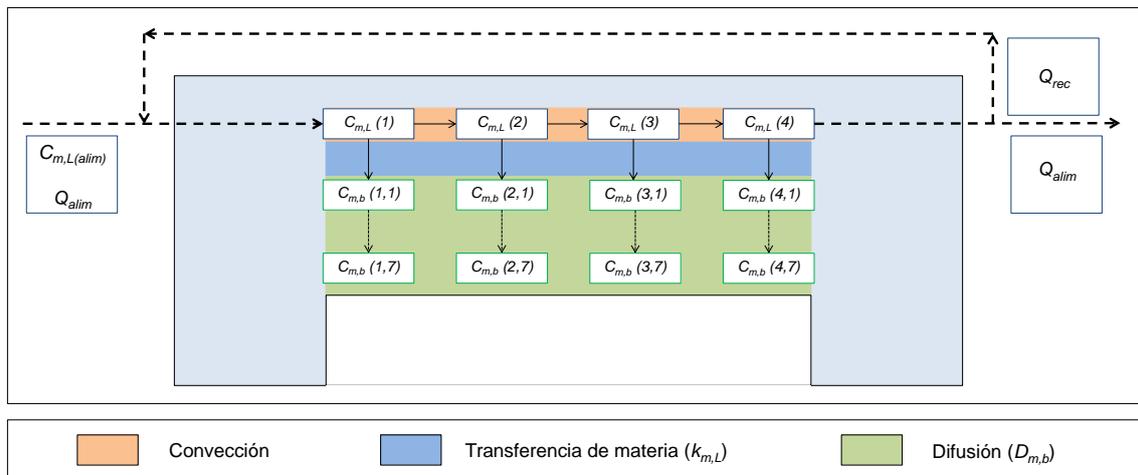


Figura 7.1. Estructura del modelo resultante de la discretización del BPP-CA en nL secciones a lo largo del reactor y nb capas de biopelícula.

El resultado de la discretización es un conjunto de secciones de líquido y biopelículas consideradas como reactores de tanque agitado. Como se observa en la Figura 7.1, cada sección de la fase líquida tiene una entrada desde la sección anterior, una salida hacia la siguiente sección y una salida adicional hacia la biopelícula, y cada sección de biopelícula tiene una entrada desde la capa anterior (menos profunda) y una salida hacia la siguiente capa (más profunda). El valor óptimo de secciones de reactor y secciones de biopelícula se evaluó analizando la relación entre la calidad de los resultados y el tiempo de cálculo, concluyendo que para el sistema modelado una división en 4 nL y 7 nb era óptima. Con estas simplificaciones el modelo quedó definido por un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias que redujeron considerablemente el tiempo y el esfuerzo requerido para su resolución matemática.

7.3.4. Ecuaciones del modelo matemático del bioreactor de placa plana

El modelo matemático está definido por las ecuaciones diferenciales planteadas después de la discretización del sistema. Estas expresiones se presentan a continuación para las diferentes fases del reactor.

7.3.4.1. Ecuaciones del modelo en la fase líquida

Las ecuaciones del modelo para describir la evolución de la concentración de los dos componentes m (oxígeno y glucosa) en la fase líquida se muestran a continuación para las diferentes secciones en las que se discretizó la fase líquida (diferenciadas con el subíndice i). La Ecuación 7.6 presenta el balance de materia en la primera sección del reactor ($i=1$), mientras que la Ecuación 7.7 presenta los balances de materia desde la segunda sección ($i=2$) hasta la salida del reactor ($i=nL$).

$$\left. \frac{dC_{m,l}(i)}{dt} \right|_{i=1} = \frac{(Q_{rec} + Q_{alim})}{\left(\frac{V_L}{nL} \right)} \cdot (C_{m,L(inlet)} - C_{m,L}(i)) - k_{m,L} \cdot \frac{A_{trans}}{V_L} \cdot (C_{m,L}(i) - C_{m,b}(i,1))$$

Ecuación 7.6

$$\frac{dC_{m,L}(i)}{dt} \Big|_{i=2}^{i=nL} = \frac{(Q_{rec} + Q_{alim})}{\left(\frac{V_L}{nL}\right)} \cdot (C_{m,L}(i-1) - C_{m,L}(i)) - k_{m,L} \cdot \frac{A_{trans}}{V_L} \cdot (C_{m,L}(i) - C_{m,b}(i,1))$$

Ecuación 7.7

Donde V_L es el volumen de la fase líquida (m^3), Q_{rec} es el caudal de recirculación ($m^3 \cdot s^{-1}$), Q_{alim} es el caudal de alimentación ($m^3 \cdot s^{-1}$), $C_{m,L}(inlet)$ es la concentración de entrada en el reactor de las especies m ($kg \cdot m^{-3}$), nL es el número de secciones en las que se divide el reactor y A_{trans} es el área de transferencia entre el líquido y la biopelícula (m^2).

La concentración de las dos especies en la entrada del reactor se define a partir de la operación del reactor. La fase líquida se considera saturada de oxígeno en la entrada del reactor ($8 \text{ mg} \cdot L^{-1}$) (temperatura de trabajo entre 20°C y 25°C) debido a la oxigenación de la fase líquida en la cámara de mezcla situada en la recirculación. La concentración de glucosa en la entrada del reactor se calcula a partir de la Ecuación 7.8.

$$C_{G,L}inlet = \frac{(C_{G,L(alim)} \cdot Q_{alim} + C_{G,L}(7) \cdot Q_{rec})}{Q_{alim} + Q_{rec}}$$

Ecuación 7.8

Donde $C_{G,L(alim)}$ es la concentración de glucosa con la que se alimenta el reactor ($13 \text{ kg} \cdot m^{-3}$).

7.3.4.2. Ecuaciones del modelo en la biopelícula

Las ecuaciones del modelo para simular la concentración en el interior de la biopelícula de las dos especies m (oxígeno y glucosa) se muestran a continuación para las secciones nL del reactor y para las diferentes subcapas de la biopelícula (diferenciadas con el subíndice j). La Ecuación 7.9 presenta el balance en la primera subcapa de la biopelícula ($j=1$) (superficie de la biopelícula). La Ecuación 7.10 presenta el balance entre la primera y la última subcapa de biopelícula. Finalmente, la Ecuación 7.11 presenta el balance en la última subcapa de la biopelícula ($j=nb$) (antes de la base del reactor).

$$\frac{dC_{m,b}(i,j)}{dt} \Bigg|_{j=1}^{i=nL} = k_{m,L} \cdot \frac{A_{trans}}{V_L} \cdot (C_{m,L}(i) - C_{m,b}(i,1)) - \frac{D_{m,b}}{\left(\frac{z_b}{nb}\right)^2} \cdot (C_{m,b}(i,1) - C_{m,b}(i,j+1)) - R_{m,b}(i,1)$$

Ecuación 7.9

$$\frac{dC_{m,b}(i,j)}{dt} \Bigg|_{j=2}^{i=nL} = \frac{D_{m,b}}{\left(\frac{z_b}{nb}\right)^2} \cdot (C_{m,b}(i,j-1) - 2 \cdot C_{m,b}(i,j) + C_{m,b}(i,j+1)) - R_{m,b}(i,j)$$

Ecuación 7.10

$$\frac{dC_{m,b}(i,j)}{dt} \Bigg|_{j=nb}^{i=nL} = \frac{D_{m,b}}{\left(\frac{z_b}{nb}\right)^2} \cdot (C_{m,b}(i,j-1) - C_{m,b}(i,j)) - R_{m,b}(i,nb)$$

Ecuación 7.11

Donde $D_{m,b}$ es el coeficiente de difusión de la especie m en el interior de la biopelícula ($m^2 \cdot s^{-1}$), z_b es el espesor de la biopelícula (m), nb es el número de subcapas en las que se dividen las secciones de biopelícula y $R_{m,b}$ es la velocidad de consumo biológico de las especies m ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$), expresadas en la Ecuación 7.12 y la Ecuación 7.13.

7.3.4.3. Cinética de biodegradación

Las velocidades de consumo de las dos especies se expresaron a partir de la Ecuación 7.5, teniendo en cuenta el consumo de oxígeno por el metabolismo endógeno de los microorganismos. La Ecuación 7.5 se simplificó considerando que el metabolismo de los microorganismos sólo estaba limitado por la concentración de oxígeno. Las velocidades de consumo de glucosa y oxígeno en las diferentes secciones i del reactor y las diferentes capas j de la biopelícula, se presentan en la Ecuación 7.12 y la Ecuación 7.13.

$$R_{OD,b}(i,j) = q_{max,OD} \cdot \frac{C_{OD,b}(i,j)}{K_{S,OD} + C_{OD,b}(i,j)} \cdot X_b(i,j) + k_d \cdot X_b(i,j)$$

Ecuación 7.12

$$R_{G,b}(i, j) = \frac{1}{Y_{O/G}} \cdot \left[q_{\max,OD} \cdot \frac{C_{OD,b}(i, j)}{K_{S,OD} + C_{OD,b}(i, j)} \cdot X_b(i, j) \right] \quad \text{Ecuación 7.13}$$

Donde $R_{OD,b}$ es la velocidad de consumo del oxígeno ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$), $R_{G,b}$ es la velocidad de consumo de glucosa ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$), $q_{\max,OD}$ es el consumo específico máximo del oxígeno ($\text{kg O}_2\cdot\text{kg SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), k_d es el coeficiente de consumo endógeno para el oxígeno ($\text{kg O}_2\cdot\text{kg SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) y $Y_{O/G}$ es el rendimiento oxígeno-glucosa de los microorganismos ($\text{kg O}_2\cdot\text{kg glucosa}^{-1}$).

7.3.4.4. Parámetros del modelo

El valor de los parámetros del modelo (características y condiciones de operación del reactor) utilizados en su simulación, se presenta en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Valor de los parámetros del modelo utilizados en su simulación (características del reactor y condiciones de operación).

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
Volumen de la fase líquida en el reactor	V_L	0.014	L	Diseño del reactor
Sección de la fase líquida	A_L	$7\cdot 10^{-5}$	m^2	Operación del reactor
Área interfacial de la biopelícula	A_{trans}	$7\cdot 10^{-3}$	m^2	Diseño del reactor
Espesor de la biopelícula	z_b	$2\cdot 10^{-3}$	m	Operación del reactor
Espesor de la película líquida	x	$1\cdot 10^{-3}$	m	Operación del reactor
Caudal de alimentación del reactor	Q_{alim}	$1.75\cdot 10^{-3}$	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	Operación del reactor
Caudal de recirculación del reactor	Q_{rec}	0.7	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	Operación del reactor

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Estudio del transporte de materia externo

La influencia de las condiciones hidrodinámicas sobre el transporte de materia externo se evaluó estimando el coeficiente de transferencia de materia en el rango de velocidades de circulación de la fase líquida entre $2.5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ y $25 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ (correspondientes a Re laminares entre 0.5 y 7) (Figura 7.2). Las condiciones experimentales bajo las que se realizaron los experimentos de estimación del coeficiente de transferencia de materia externo se seleccionaron a partir del diseño de los experimentos óptimos.

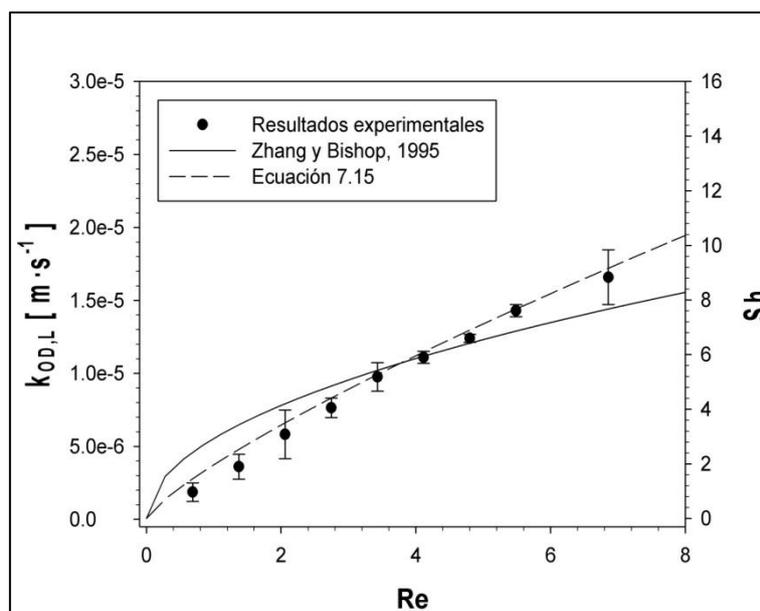


Figura 7.2. Coeficiente de transferencia de materia externa, estimado experimentalmente y calculado utilizando la Ecuación 7.14 y la Ecuación 7.15, representado como k_L absoluto y como Sh en función del número de Reynolds. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza determinado en la estimación del $k_{OD,L}$.

Los resultados de la Figura 7.2 muestran el efecto de las condiciones hidrodinámicas del reactor sobre la resistencia al transporte de materia externa. Se puede observar como la resistencia al transporte de materia entre la fase líquida y la superficie de la biopelícula disminuye cuando aumenta la velocidad de circulación de la fase líquida. Esta tendencia coincide con la observada en trabajos similares (Horn y Hempel 1997; Wäsche, Horn y Hempel 2002; Zhang y Bishop 1995; Prades et al. 2015). En estos trabajos se describe una reducción de la capa límite de líquido cuando aumenta la velocidad de circulación de la fase líquido, que aumenta la velocidad de transferencia de materia.

A pesar de que pocos autores (Zhang y Bishop 1995; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000; Prades et al. 2015) centraron sus estudios en sistemas experimentales y condiciones de operación similares a las utilizadas en este estudio, los resultados experimentales se compararon con correlaciones empíricas y teóricas. El objetivo de la comparación fue avanzar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la transferencia de materia entre la fase líquida y la biopelícula. En este sentido, es necesario realizar una comparación cuidadosa porque la resistencia al transporte de materia externo depende de las condiciones hidrodinámicas, la geometría del sistema experimental y las propiedades físicas del fluido. La mayoría de estudios sobre coeficientes de transferencia de materia encontrados en la bibliografía se basan en la medida del espesor de la capa límite (L_C), considerando que en el interior de la capa

límite el transporte de materia sólo tiene lugar por difusión. Los resultados presentados en Zhang y Bishop (1995) mostraron una buena concordancia con modelos teóricos desarrollados utilizando la solución de Blasius en condiciones laminares (Ecuación 7.14), pero no proporcionaron una buena estimación de los coeficientes de transferencia de materia, tal y como se observa en la Figura 7.2.

$$Sh = 0.369 \cdot Re^{0.5} \cdot Sc^{0.33} \qquad \text{Ecuación 7.14}$$

Donde Sh es el número adimensional de Sherwood, relacionado con el coeficiente de transferencia de materia, Re es el número adimensional de Reynolds, relacionado con las condiciones hidrodinámicas y Sc es el número de Schmidt, relacionado con las propiedades físicas del fluido. Las desviaciones observadas entre la tendencia laminar, descrita por la Ecuación 7.14, y los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, revelan que es necesario un análisis más exhaustivo de los mecanismos de transporte de materia externo. Esta discrepancia se explica por el efecto de la heterogeneidad de la superficie de la biopelícula sobre el mecanismo de transferencia de materia. Este efecto ha sido incluido por diferentes autores en el estudio del transporte de materia externo (Beyenal y Lewandowski 2000; Picioreanu, van Loosdrecht y Heijnen 2000; Wäsche, Horn y Hempel 2002). Estos estudios revelaron que el transporte de materia tiene lugar por una combinación de mecanismos (difusión y convección), demostrando que la aproximación lineal (Ecuación 7.14) no es apropiada para describir el transporte de materia externo en sistemas de biopelícula. En este sentido, los modelos laminares que consideran una capa límite de Blasius presentan problemas de fiabilidad para describir la transferencia de materia a través de la interfase líquido-biopelícula.

El procedimiento de estimación dinámico del coeficiente de transferencia de materia externo, presentado en el capítulo 6, permite incluir el efecto de todos los mecanismos de transporte en el valor del coeficiente estimado. Por este motivo, los resultados experimentales del coeficiente de transferencia de materia en función de las condiciones hidrodinámicas se utilizaron para proponer una correlación, basada en la Ecuación 7.1, que proporciona una descripción fiable y completa del transporte de materia externo. Los resultados de la correlación (Ecuación 7.15) se muestran en la Figura 7.2.

$$Sh = 0.239 \cdot Re^{0.8} \cdot Sc^{0.33} \quad \text{Ecuación 7.15}$$

Tal y como se recoge en Piciooreanu, van Loosdrecht y Heijnen (2000) las turbulencias en el interior de la capa límite generadas por la rugosidad de la superficie, provoca el incremento del exponente del Re , que en el caso actual toma valores cercanos a los que muestran los modelos en condiciones turbulentas (Horn y Lackner 2014).

7.4.2. Estudio del transporte de materia interno

El impacto de la heterogeneidad estructural sobre los mecanismos de transporte de materia interno se estudió analizando el efecto de las condiciones hidrodinámicas y de la densidad de la biopelícula sobre los coeficientes de difusión estimados en el interior de la biopelícula. Los coeficientes de difusión del oxígeno experimentales se utilizaron para calcular el coeficiente de difusión relativo (intrínseco) (D_r) de las secciones de biopelícula monitorizadas, dividiéndolos por el coeficiente de difusión del oxígeno en el agua ($D_{w,OD}$) (Nguyen et al. 2014).

7.4.2.1. Efecto de las condiciones hidrodinámicas en el coeficiente de difusión estimado en el interior de la biopelícula

El efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre el transporte de materia interno se analizó relacionando los coeficientes de difusión estimados en el interior de la biopelícula y el Re en el reactor. En la Figura 7.3 se muestran los coeficientes de difusión estimados para diferentes valores de Re (entre 0 y 7). De acuerdo con los resultados del diseño de experimentos (presentados en el capítulo 6), el coeficiente de difusión se estimó en la sección central del reactor, donde la biopelícula presentaba una densidad de $21.20 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$.

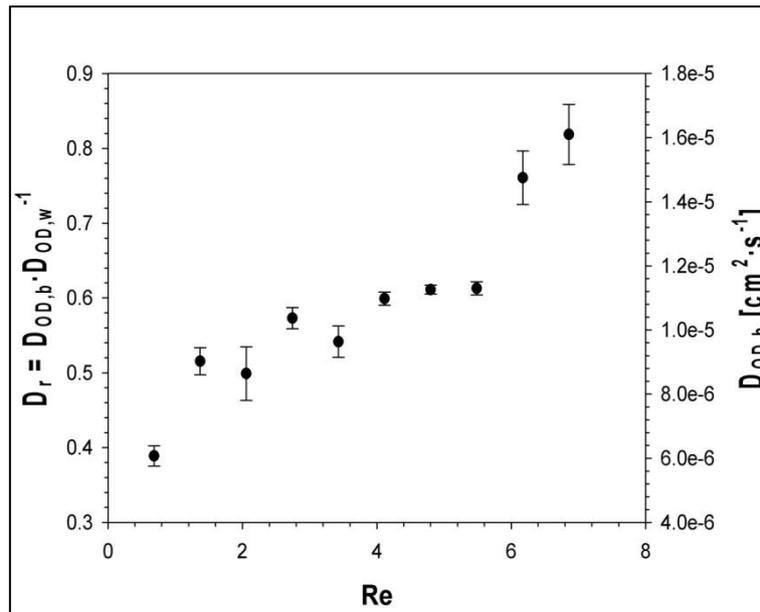


Figura 7.3. Coeficiente de difusión medio ($D_{b,OD}$) y adimensional (D_r) estimados experimentalmente (●) en el interior de una sección de biopelícula ($21.20 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) a diferentes velocidades de circulación de la fase líquida. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza determinados en la estimación de $D_{OD,b}$.

En la Figura 7.3 se observa como en velocidades de circulación inferiores a $10 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ el coeficiente de difusión decrece desde un 60% hasta un 40% de su valor en agua ($D_{W,OD}$). Los coeficientes de difusión estimados presentan una tendencia prácticamente constante, alrededor de un valor de $1.1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, en velocidades de circulación entre 10 y $20 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$, mientras que en velocidades superiores a $20 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ se observaron coeficientes de difusión mayores, incluso cercanos al coeficiente de difusión molecular ($D_r=1$). Los tres comportamientos diferentes, observados a lo largo del rango de velocidades de circulación analizado, están provocados por la heterogeneidad de la biopelícula y por los mecanismos de transporte que tienen lugar. En Stoodley et al. (1997) observaron que en velocidades de circulación del líquido bajas, no se observaban cambios en el coeficiente de transferencia de materia en los canales del interior de la biopelícula. En nuestro caso, se observó que a velocidades de circulación inferiores a $10 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$ la contribución convectiva al transporte de materia interno era despreciable, y que por lo tanto el transporte de materia interno estaba controlado por la difusión a través de los agregados de células, dando lugar a coeficientes de difusión más bajos. Por el otro lado, De Beer, Stoodley y Lewandowski (1996) demostraron que por encima de una velocidad de circulación crítica, el transporte de materia por convección a través de los poros, los huecos y los canales crecía sustancialmente, mejorando el transporte de materia de sustratos y nutrientes a través de la biopelícula. Debido a este fenómeno, en velocidades de circulación superiores a $20 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$, el transporte de materia interno estaba

impulsado por la convección a través de la fase líquida móvil en el interior de la biopelícula, dando lugar a coeficientes de difusión muy elevados, cercanos a los coeficientes de convección. Entre 10 y $20 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, el transporte de materia en el interior de la biopelícula es el resultado de la combinación de mecanismos convectivos y difusivos, observando una tendencia estable en los coeficientes de difusión estimados en este intervalo de velocidades.

7.4.2.2. Influencia de la densidad de la biopelícula en el coeficiente de difusión estimado en el interior de la biopelícula

La biopelícula heterótrofa cultivada en el BPP-CA presentó una densidad creciente desde la entrada hasta la salida del reactor. Este perfil de densidad se aprovechó para correlacionar experimentalmente el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula con la densidad de la biopelícula. Con este objetivo, el coeficiente de difusión se estimó en diferentes secciones a lo largo del reactor, midiendo la densidad de la biopelícula en cada sección monitorizada. La velocidad de circulación del líquido en todos los experimentos se fijó en $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Re 2.8) para asegurar que los coeficientes de difusión estimados no estaban influenciados por la velocidad de circulación del líquido (Figura 7.3). En la Figura 7.4 se muestran los coeficientes de difusión estimados en el interior de la biopelícula en función de su densidad.

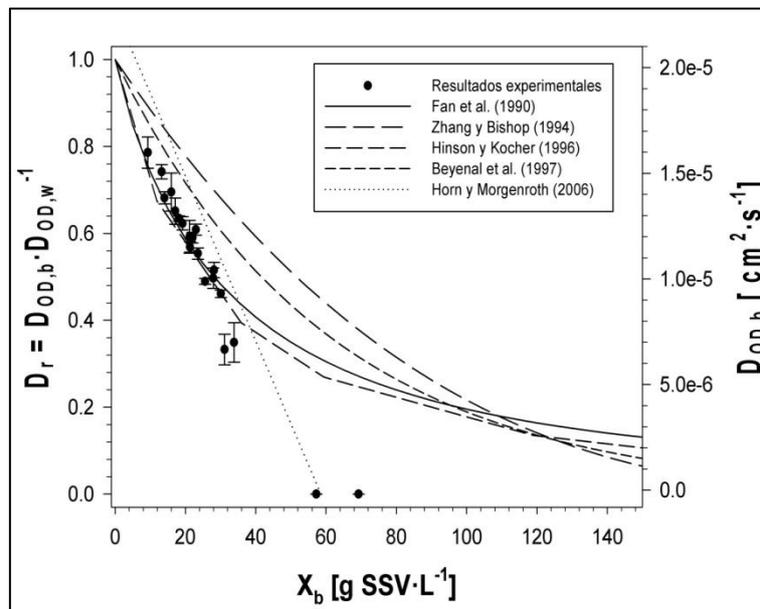


Figura 7.4. Coeficiente de difusión del oxígeno en el interior de la biopelícula en función de la densidad de la biopelícula. Los coeficientes de difusión medios ($D_{b,OD}$) y adimensionales (D_r) se estimaron experimentalmente, a una velocidad de circulación de la fase líquida de $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, y se calcularon teóricamente utilizando diferentes correlaciones. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza determinado en la estimación de $D_{OD,b}$.

Los resultados de la Figura 7.4 muestran una disminución lineal del coeficiente de difusión adimensional desde 0.80 hasta el 0.32 cuando la densidad de la biopelícula heterótrofa aumenta desde 9 hasta 33 g SSV·L⁻¹. Los resultados también muestran que el transporte de materia está fuertemente limitado en el interior de biopelículas con densidades superiores a 50 g SSV·L⁻¹, donde los coeficientes de difusión estimados presentan un valor inferior al 5% de su valor en agua. Esta tendencia se explica porque el incremento de la densidad de la biopelícula provoca una disminución de la porosidad de la biopelícula, incrementando la resistencia al transporte de materia.

Diferentes trabajos han desarrollado correlaciones para el coeficiente de difusión teniendo en cuenta la heterogeneidad de la biopelícula, normalmente abordada utilizando un parámetro estructural, tales como la densidad o la porosidad de la biopelícula. Los modelos de difusión más relevantes se analizaron exhaustivamente utilizando los resultados experimentales presentados en este capítulo (Figura 7.2). Las correlaciones estudiadas (en la Tabla 7.3) se adaptaron para estimar el coeficiente de difusión adimensional a partir de la densidad de biopelícula.

Tabla 7.3. Modelos propuestos en la bibliografía para la estimación del coeficiente de difusión a partir de la densidad de la biopelícula.

Modelos de difusión	Correlaciones para el coeficiente de difusión	
Fan et al. (1990)	$D_r = 1 - \frac{0.43 \cdot X_b^{0.92}}{11.19 + 0.27 \cdot X_b^{0.99}}$	Ecuación 7.16
Zhang and Bishop (1994)	$D_r = \left(1 - \frac{X_b}{\rho_o}\right)^3$	Ecuación 7.17
Hinson and Kocher (1996)	$D_r = \frac{2 \cdot (1 - \varepsilon_o) \cdot \varepsilon_w}{(2 + \varepsilon_o) \cdot \left(\varepsilon_w + \frac{\varepsilon_p}{0.022}\right)}$	Ecuación 7.18
	$X_b = \varepsilon_o \cdot 235 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \varepsilon_p \cdot 1000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	Ecuación 7.19
Beyenal et al. (1997)	$D_r = 10^{-0.0072367X_b}$	Ecuación 7.20
Horn and Morgenroth (2006)	$D_r = 1.112 - 0.019 \cdot X_b$	Ecuación 7.21

En la Figura 7.4 se observa como la tendencia de los resultados experimentales coincide con la mayoría de correlaciones, empíricas y teóricas (Tabla 7.3), en biopelículas con densidades inferiores a 40 g SSV·L⁻¹. Sin embargo, en biopelículas más densas sólo las correlaciones experimentales (Horn y Morgenroth 2006) muestran coeficientes de difusión parecidos a los estimados experimentalmente en este trabajo. Las correlaciones teóricas predicen una del coeficiente de difusión mayor cuando

aumenta la densidad de la biopelícula, mostrando coeficientes de difusión relativos alrededor de 0.2 en el interior de biopelículas de densidad superior a $100 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$.

Las desviaciones más grandes se observan respecto a la Ecuación 7.17 (Zhang y Bishop 1994b) y la Ecuación 7.20 (Beyenal, Seker y Tanyolaç 1997). Estas diferencias se explican porque la correlación de Zhang y Bishop (1994) se desarrolló a partir del modelo de un catalizador poroso, considerando la biopelícula como una matriz porosa a través de la cual difunden nutrientes y sustrato, y la correlación de Beyenal, Seker y Tanyolaç (1997) se construyó extrapolando la tendencia de los coeficientes de difusión estimados en gránulos de biomasa, de densidad entre 40 y $100 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, a todo el rango de densidad de biopelícula (0 - $150 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$). Del mismo modo, los coeficientes de difusión determinados utilizando la ecuación de Fan et al. (1990) sobreestiman los coeficientes de difusión estimados en el rango de densidades superiores a $40 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$. Este comportamiento está relacionado con el desarrollo de la correlación, que se llevó a cabo utilizando coeficientes de difusión experimentales estimados en gránulos de biomasa en el rango de densidades más altas. Por este motivo, esta correlación presenta problemas de fiabilidad para describir el transporte de materia en el interior de biopelículas. Los resultados obtenidos utilizando la correlación de (Hinson y Kocher 1996) presentan el mismo comportamiento observado en los resultados de la correlación de Fan, ya que este modelo se desarrolló corrigiendo la ecuación de Fan utilizando resultados experimentales estimados en biopelículas con densidades por debajo de $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo, los resultados obtenidos con la correlación de Horn y Morgenroth (2006), desarrollada a partir de coeficientes de difusión experimentales estimados en el interior de biopelículas, se ajustan bien con los resultados obtenidos en este trabajo en todo el rango de densidad de biopelícula. Las diferencias más grandes respecto al modelo de Horn y Morgenroth se observan en las densidades más bajas, donde la correlación sobreestima el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula, con valores teóricos incluso superiores a la difusión molecular. Tal y como explican los autores, estas desviaciones están provocadas por la elevada dispersión de los resultados utilizados en el desarrollo de la correlación.

La comparación de los coeficientes de difusión experimentales con los coeficientes de difusión estimados utilizando las diferentes correlaciones existentes pone de manifiesto las limitaciones de utilizar correlaciones para describir el transporte de materia interno en diferentes sistemas. Por lo tanto, la extrapolación y la utilización de

correlaciones bibliográficas, puede no ser adecuada. Estos resultados demuestran que siempre que sea posible, es preferible desarrollar los modelos de transporte de materia a partir de un estudio experimental minucioso en el sistema de interés.

7.4.2.3. Correlación empírica para el cálculo del coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula

Los resultados experimentales del coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula, obtenidos en un amplio rango de condiciones hidrodinámicas y densidades de biopelícula, se utilizaron para proponer una correlación empírica para el coeficiente de difusión. En la Figura 7.3 y la Figura 7.4 se observa que la difusión del oxígeno en el interior de la biopelícula está claramente influenciada por las condiciones hidrodinámicas y la densidad de la biopelícula. Por este motivo, la correlación propuesta en este capítulo tuvo en cuenta el efecto de ambas condiciones sobre el coeficiente de difusión. La correlación de los resultados presentados en la Figura 7.3 y la Figura 7.4 se utilizó para desarrollar un modelo de difusión simple, ajustando los datos experimentales con un modelo general multi-variable (Figura 7.5). El resultado de este ajuste es una ecuación (Ecuación 7.22) que permite estimar el coeficiente de difusión adimensional en función de la densidad de la biopelícula y las condiciones hidrodinámicas (Re) en el reactor.

$$D_r = 0.93 - 0.023 \cdot X_b + 1.2 \cdot 10^{-2} \cdot \text{Re}^2 + 1.1 \cdot 10^{-4} \cdot X_b^2 \quad \text{Ecuación 7.22}$$

Donde D_r es el coeficiente de difusión relativo en el interior de la biopelícula, X_b es la densidad de la biopelícula ($\text{g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) y Re es el número adimensional de Reynolds en el reactor. La idoneidad de la correlación (Ecuación 7.22) se analizó comparando los resultados experimentales con los resultados obtenidos utilizando esta correlación, en la Figura 7.5.

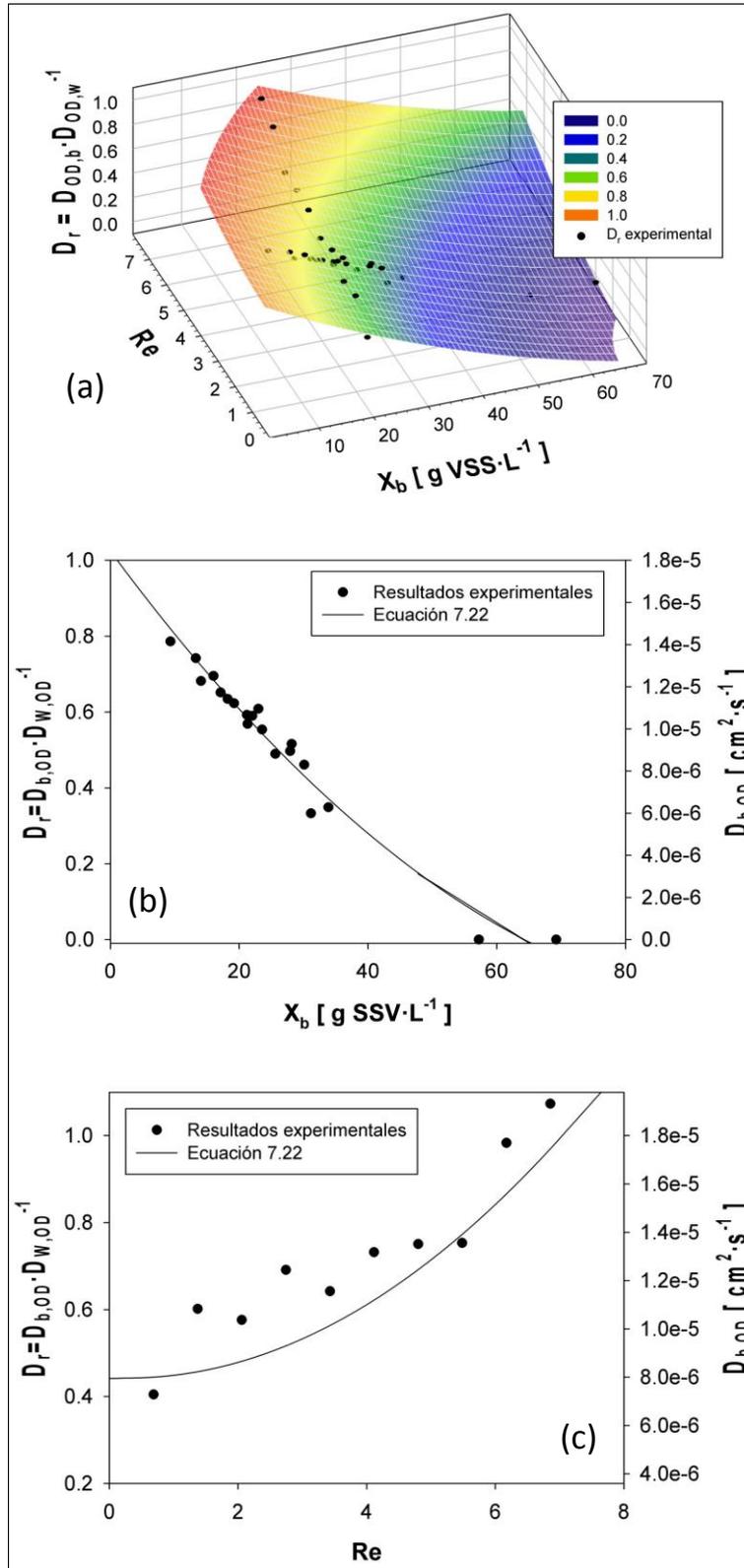


Figura 7.5. (a) Coeficiente de difusión adimensional estimado utilizando un modelo general multi-variable (superficie) y estimados experimentalmente en diferentes velocidades de circulación de la fase líquida y en diferentes densidades de biopelícula. (b) Coeficiente de difusión (del oxígeno y adimensional) estimado experimentalmente y calculado a partir de la Ecuación 7.22, en función de la densidad de la biopelícula. (c) Coeficiente de difusión (del oxígeno y adimensional) estimado experimentalmente y calculado a partir de la Ecuación 7.22, en función de la velocidad de circulación de la fase líquida.

En la Figura 7.5a se muestran los coeficientes de difusión, experimentales y teóricos (Ecuación 7.22), en función de las condiciones hidrodinámicas en el reactor y de la densidad de la biopelícula. Tal y como se observa, el modelo de difusión propuesto permite estimar el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula en la batería de condiciones experimentales que describen los rangos de densidad y velocidad de circulación estudiados. La calidad de los coeficientes de difusión estimados utilizando este modelo se comprobó analizando su respuesta de forma individual en función la densidad de la biopelícula (Figura 7.5b) y de las condiciones hidrodinámicas (Figura 7.5c). Estos resultados demuestran una buena concordancia entre los resultados experimentales y teóricos, confirmada por el coeficiente de correlación (0.949), demostrando la validez del modelo de difusión desarrollado para describir el transporte de materia en el interior de la biopelícula heterótrofa.

7.4.3. Modelización del bioreactor de placa plana

La modelización de biopelículas, dentro de los sistemas de biofiltración, tiene como objetivo entender las relaciones entre los parámetros de operación de los equipos y la eliminación de los contaminantes. Los parámetros de transporte de materia y biocinéticos utilizados en la modelización de biopelículas se adaptan comúnmente de estudios bibliográficos. Los resultados obtenidos utilizando estos parámetros pueden variar significativamente de los resultados experimentales. Por este motivo es necesario calibrar los modelos, variando el valor inicial de los parámetros, para reproducir el comportamiento del sistema experimental.

En este apartado se estudia la modelización de una biopelícula heterótrofa sustituyendo los parámetros de transporte de materia y biocinéticos bibliográficos, y la etapa de calibrado necesaria, por los parámetros estimados experimentalmente a partir de perfiles de OD adquiridos su interior (secciones 6.3.4, 7.3.1 y 7.3.2).

7.4.3.1. Validación del modelo de biopelícula utilizando parámetros determinados experimentalmente

La utilización de parámetros de transporte de materia y biocinéticos experimentales permite simplificar el desarrollo de modelos de biopelícula (etapa de calibrado) e incrementar la fiabilidad de los modelos resultantes. El modelo de la biopelícula heterótrofa (presentado en la sección 7.2.2) desarrollado utilizando las correlaciones

presentadas en la Ecuación 7.15 y la Ecuación 7.22, y los parámetros biocinéticos estimados en la sección 6.3.4, se validó comparando la respuesta del modelo con los perfiles de OD adquiridos experimentales. Los perfiles de OD se adquirieron por duplicado para asegurar que la dinámica de la biopelícula no interfiere en la etapa de validación.

La mejora aportada al modelo la utilización de parámetros experimentales en lugar de parámetros bibliográficos se evaluó comparando las dos predicciones. El valor de los parámetros bibliográficos y experimentales utilizados en las simulaciones del modelo se muestra en la Tabla 7.4 y la Tabla 7.5 respectivamente.

Tabla 7.4. Valores bibliográficos de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos utilizados en la simulación del modelo.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
<i>Parámetros de transporte de materia</i>				
Coeficiente de difusión molecular de la glucosa	$D_{G,W}$	$6.73 \cdot 10^{-6}$	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Perry y Green 1997)
Coeficiente de difusión molecular del oxígeno	$D_{OD,W}$	$1.88 \cdot 10^{-5}$	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Nguyen et al. 2014)
Espesor de la capa límite	L_C	225	μm	Estimación experimental
Coeficiente de difusión de la glucosa en la biopelícula	$D_{G,b}$	$6.73 \cdot 10^{-6}$	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Perry y Green 1997)
Coeficiente de difusión del oxígeno en la biopelícula	$D_{OD,b}$	$1.88 \cdot 10^{-5}$	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Nguyen et al. 2014)
<i>Parámetros biocinéticos de los microorganismos</i>				
Consumo específico máximo de oxígeno	$q_{max,OD}$	0.017	$\text{mg O}_2 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	(Henze et al. 2000)
Constante de semi-saturación del oxígeno	$K_{S,OD}$	0.2	$\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	(Henze et al. 2000)
Consumo endógeno de oxígeno	k_d	$1.7 \cdot 10^{-3}$	$\text{mg O}_2 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	(Henze et al. 2000)
Rendimiento oxígeno-glucosa	$Y_{O/G}$	1.07	$\text{mg O}_2 \cdot \text{mg glucosa}^{-1}$	Teórico

En relación con los valores bibliográficos seleccionados para la simulación del modelo (Tabla 7.4), el coeficiente de transferencia de materia se estimó a partir de la medida experimental de espesor de la capa límite (sección 6.3.2.1). Por otro lado, el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula se definió a partir de la aproximación, muy extendida en la modelización de biopelículas, de utilizar el coeficiente de difusión en agua (Dorado et al. 2008; Rodriguez 2013). Finalmente los parámetros biocinéticos se aproximaron a los de un consorcio de microorganismos

heterótrofos para el tratamiento de aguas residuales (cultivo en suspensión) (Henze et al. 2000).

Tabla 7.5. Valores experimentales de los parámetros de transporte de materia y biocinéticos utilizados en la simulación del modelo.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
<i>Parámetros de transporte de materia</i>				
Coefficiente de difusión molecular de la glucosa	$D_{G,W}$	$6.73 \cdot 10^{-6}$	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Perry y Green 1997)
Coefficiente de difusión molecular del oxígeno	$D_{OD,W}$	$1.88 \cdot 10^{-5}$	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	(Nguyen et al. 2014)
Coefficiente de transferencia de materia de la glucosa	$k_{G,L}$	-	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	Ecuación 7.15
Coefficiente de transferencia de materia del oxígeno	$k_{OD,L}$	-	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	Ecuación 7.15
Coefficiente de difusión de la glucosa en la biopelícula	$D_{G,b}$	-	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	Ecuación 7.22
Coefficiente de difusión del oxígeno en la biopelícula	$D_{OD,b}$	-	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	Ecuación 7.22
<i>Parámetros biocinéticos de los microorganismos</i>				
Consumo específico máximo de oxígeno	$q_{max,OD}$	0.0027	$\text{mg O}_2 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Capítulo 6
Constante de semi-saturación del oxígeno	$K_{S,OD}$	0.503	$\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	Capítulo 6
Consumo endógeno de oxígeno	k_d	$1.55 \cdot 10^{-4}$	$\text{mg O}_2 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Capítulo 6
Rendimiento oxígeno-glucosa	$Y_{O/G}$	1.07	$\text{mg O}_2 \cdot \text{mg glucosa}^{-1}$	Teórico

Las simulaciones obtenidas utilizando los parámetros presentados en la Tabla 7.4 y la Tabla 7.5 se compararon con los perfiles de OD adquiridos experimentalmente en el interior de biopelículas de diferente densidad: $9.30 \text{ g} \cdot \text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$, $13.50 \text{ g} \cdot \text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ y $18.20 \text{ g} \cdot \text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$.

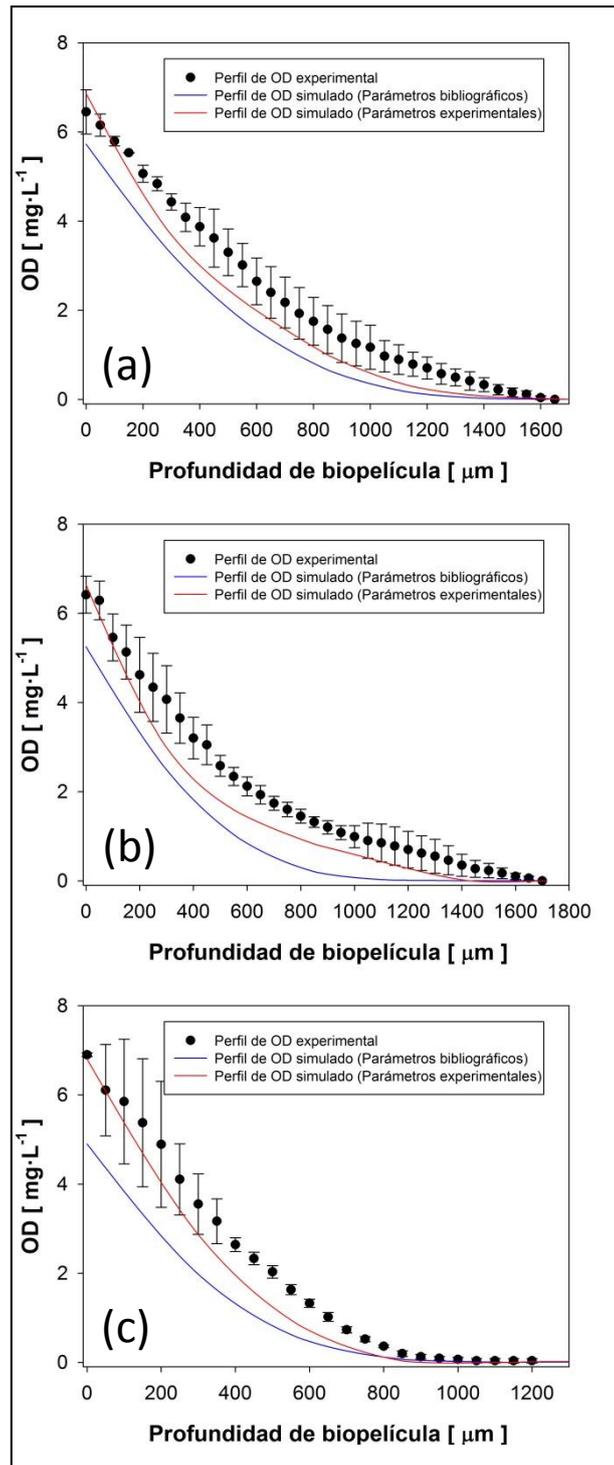


Figura 7.6. Perfiles de OD experimentales y simulados, utilizando parámetros experimentales y bibliográficos, en el interior de 3 biopelículas de densidades diferentes, (a) 9.30 g SSV·L⁻¹, (b) 13.50 g SSV·L⁻¹ y (c) 18.20 g SSV·L⁻¹. Los perfiles experimentales se adquirieron por duplicado, los puntos corresponden al valor medio de los dos perfiles y las barras de error a la desviación estándar.

Los perfiles de OD adquiridos presentan una concentración de OD similar en el inicio del perfil (alrededor de 6.7 mg·L⁻¹), demostrando que la densidad de la biopelícula no afecta la concentración de OD en la superficie de la biopelícula. Por otro lado, los resultados de la Figura 7.6 muestran como el aumento de la densidad de la

biopelícula reduce la penetración del oxígeno, desde 1700 μm en la biopelícula de 9.30 g SSV·L⁻¹ (Figura 7.6a) hasta 1200 μm en la biopelícula de 18.20 g SSV·L⁻¹ (Figura 7.6c). Los perfiles de OD simulados (utilizando los dos grupos de parámetros) muestran la misma tendencia presentada por los perfiles adquiridos en el interior de la biopelícula. Sin embargo, se observa como los perfiles simulados utilizando los parámetros estimados experimentalmente se ajustan mejor a los perfiles experimentales. Los perfiles simulados utilizando parámetros experimentalmente predicen con precisión la concentración de OD observada experimentalmente en la superficie de la biopelícula. En cambio, los perfiles simulados utilizando parámetros bibliográficos subestiman el transporte de materia externo, prediciendo una concentración de OD 1 mg·L⁻¹ inferior a la observada a lo largo de todo el perfil.

Tabla 7.6. Errores cuadráticos medios normalizados (NRMSE) de los perfiles de OD simulados utilizando los parámetros de la Tabla 7.4 y la Tabla 7.5 respecto a los perfiles de OD experimentales en tres biopelículas de densidad diferente.

Densidad de biopelícula [g SSV·L ⁻¹]	NRMSE [%]	
	Perfiles de OD simulados (parámetros Tabla 7.5)	Perfiles de OD simulados (parámetros Tabla 7.4)
9.3	13.60	18.65
13.5	15.90	26.46
18.2	15.54	25.72

Estas diferencias se confirman analizando los resultados de los errores cuadráticos medios normalizados (NRMSE) entre los perfiles experimentales y los perfiles simulados (en la Tabla 7.6). Como se observa en los resultados de la Tabla 7.6, el NRMSE disminuye desde el 18-26% hasta el 13-15% cuando el modelo se simula utilizando los parámetros de la Tabla 7.5 en lugar de los de la Tabla 7.4. Estos resultados demuestran la mejora en la simulación del comportamiento de la biopelícula heterótrofa utilizando parámetros estimados experimentalmente en el sistema modelizado.

7.4.3.2. Validación del modelo en diferentes condiciones hidrodinámicas

Las correlaciones experimentales desarrolladas en las secciones 7.3.1 y 7.3.2 incorporan la influencia de las condiciones hidrodinámicas sobre la resistencia, externa e interna, al transporte de materia. De este modo, el desarrollo del modelo de biopelícula heterótrofa utilizando la Ecuación 7.15 y la Ecuación 7.22 en lugar de un valor constante de coeficiente de transferencia de materia y de difusión permite

incorporar el efecto de las condiciones hidrodinámicas (velocidad de circulación de la fase líquida) en las simulaciones del modelo. La capacidad del modelo para incluir el efecto de las condiciones hidrodinámicas en sus predicciones se validó comparando las simulaciones del modelo con perfiles de OD experimentales adquiridos en diferentes condiciones hidrodinámicas. Los perfiles de OD se adquirieron por duplicado en una sección de biopelícula de $22.78 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.2.1.

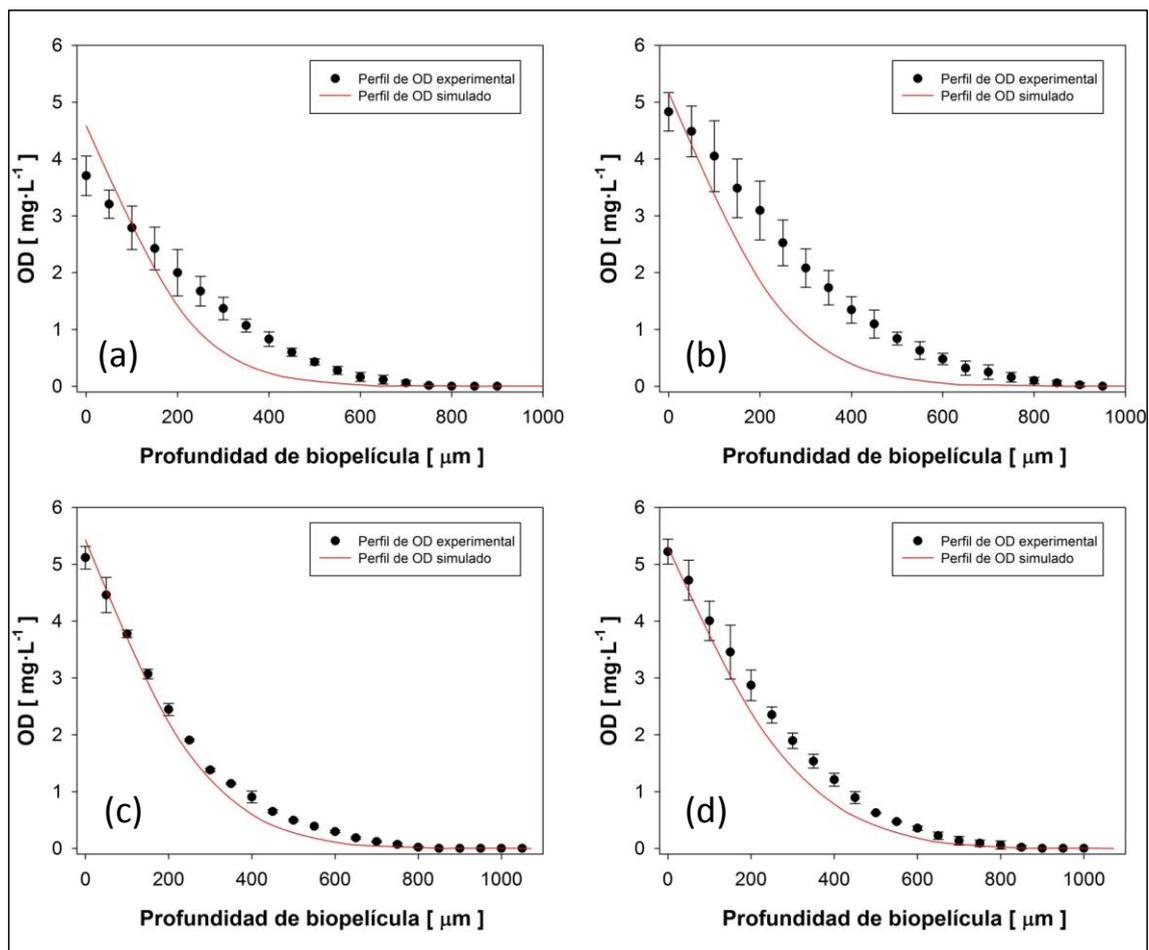


Figura 7.7. Perfiles de OD experimentales y simulados en una sección de biopelícula de $22.78 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ a 4 velocidad de circulación de la fase líquida, (a) $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, (b) $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, (c) $15 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ y (d) $20 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

Los perfiles experimentales de OD de la Figura 7.7 muestran como la concentración de OD en la superficie de la biopelícula aumenta cuando lo hace la velocidad de circulación de la fase líquida, desde $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de circulación de $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Figura 7.7a) hasta $5.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de $20 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ (Figura 7.7d). Esta tendencia está provocada por la mejora en la transferencia de materia cuando aumenta la velocidad de circulación, observada anteriormente en la Figura 7.2. Los perfiles de OD simulados, presentados en la Figura 7.7, también siguen esta tendencia, demostrando

que el modelo es capaz de predecir el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la transferencia de materia. En el análisis de los perfiles de OD también se observó como el aumento de la velocidad de circulación sobre la biopelícula incrementó la penetración del OD. Este fenómeno se explica por el incremento de la velocidad de difusión, observado en la Figura 7.3, cuando aumenta la velocidad de circulación de la fase líquida. Tal y como se observó anteriormente los perfiles simulados también describen esta tendencia, demostrando que el modelo es capaz de predecir el efecto de la velocidad de circulación sobre el transporte de materia interno. El ajuste entre los perfiles de OD experimentales y simulados se cuantificó evaluando los NRMSE, en la Tabla 7.7.

Tabla 7.7. Errores cuadráticos medios normalizados (NRMSE) de los perfiles de OD simulados utilizando los parámetros de la Tabla 7.5 respecto a los perfiles de OD experimentales adquiridos en diferentes velocidades de circulación de la fase líquida.

Velocidad de circulación [m·h ⁻¹]	NRMSE [%]
	<i>Perfiles de OD simulados (parámetros Tabla 7.5)</i>
5	11.97
10	14.85
15	3.54
20	5.63

Los resultados de la Tabla 7.7 confirman el buen ajuste entre los perfiles de OD experimentales y simulados. El NRMSE que presentan los perfiles simulados de la Figura 7.7 es inferior al observado en el apartado anterior para la validación del modelo. Los resultados de la Tabla 7.7 muestran como el error en el ajuste disminuye en velocidades de circulación más altas, 11.97% a una velocidad de circulación de 5 m·h⁻¹ respecto a 5.63% a una velocidad de 20 m·h⁻¹. Los perfiles simulados a una velocidad de 5 m·h⁻¹ (Figura 7.7a) y de 10 m·h⁻¹ (Figura 7.7b) muestran como a las velocidades de circulación más bajas el modelo sobrestima ligeramente la difusión en el interior de la biopelícula, explicando la diferencia en la calidad del ajuste. Sin embargo, estos resultados confirman que utilizando las correlaciones para estimar los parámetros de transporte de materia, el modelo es capaz de predecir el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre el comportamiento de la biopelícula heterótrofa.

7.4.3.3. Predicción del comportamiento del BPP-CA

La validación del modelo permite su utilización para describir el comportamiento de la biopelícula heterótrofa en diferentes escenarios (teniendo en cuenta las suposiciones del modelo). El modelo desarrollado se utilizó para simular el comportamiento de la biopelícula heterótrofa cultivada en el BPP-CA, discretizando el reactor en 4 secciones y la biopelícula en 7 capas. El comportamiento del bioreactor se simuló considerando la misma densidad de biopelícula para las 4 secciones del reactor ($18 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$), y una concentración de glucosa en la solución de nutrientes alimentada ($C_{G,L} \text{ alim}$) de $13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La fase líquida en la entrada de la placa plana (proveniente de la recirculación) se consideró saturada en oxígeno (con una concentración de $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). El reactor se simuló considerando una velocidad de circulación y un tiempo de residencia de la fase líquida de $10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ y 8 h, respectivamente. Los resultados de la simulación del modelo se muestran conjuntamente para el OD y la glucosa en la fase líquida (en la Figura 7.8), y por separado para el OD y la glucosa en la biopelícula (en la Figura 7.9 y la Figura 7.10 respectivamente).

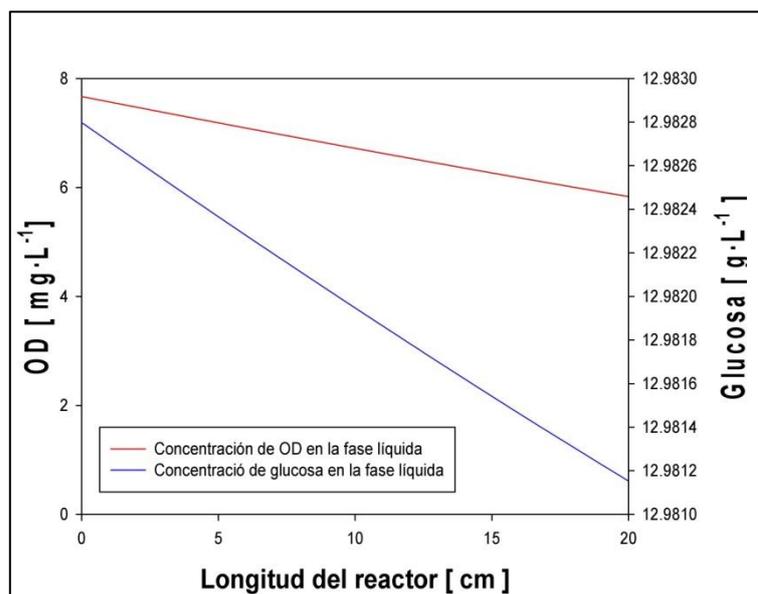


Figura 7.8. Concentración de OD y glucosa simulada en la fase líquida sobre la biopelícula heterótrofa a lo largo la placa plana del reactor.

En la Figura 7.8 se muestran los resultados de la simulación de la concentración de OD y glucosa en la fase líquida, a lo largo del reactor. La concentración de OD en la fase líquida disminuye desde $7.67 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la entrada del reactor (0 cm) hasta $5.83 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en la salida del reactor (20 cm), mientras que la de glucosa disminuye desde $12.983 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $12.981 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La diferencia en la concentración de las dos especies

entre la entrada y la salida del reactor está provocada por su transferencia hacia la biopelícula y su consumo en el interior de ésta. Estos resultados muestran que el consumo de OD ($1.84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) es ligeramente superior al de glucosa ($1.64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Esta diferencia se explica por el oxígeno consumido en la respiración endógena de los microorganismos. La tendencia de la concentración de las dos especies a lo largo del reactor indica que la biodegradación de la glucosa puede estar limitada por la transferencia de materia desde la fase líquida hasta la biopelícula.

La concentración de OD y glucosa se simuló en el interior de la biopelícula heterótrofa (en la Figura 7.9 y la Figura 7.10 respectivamente)

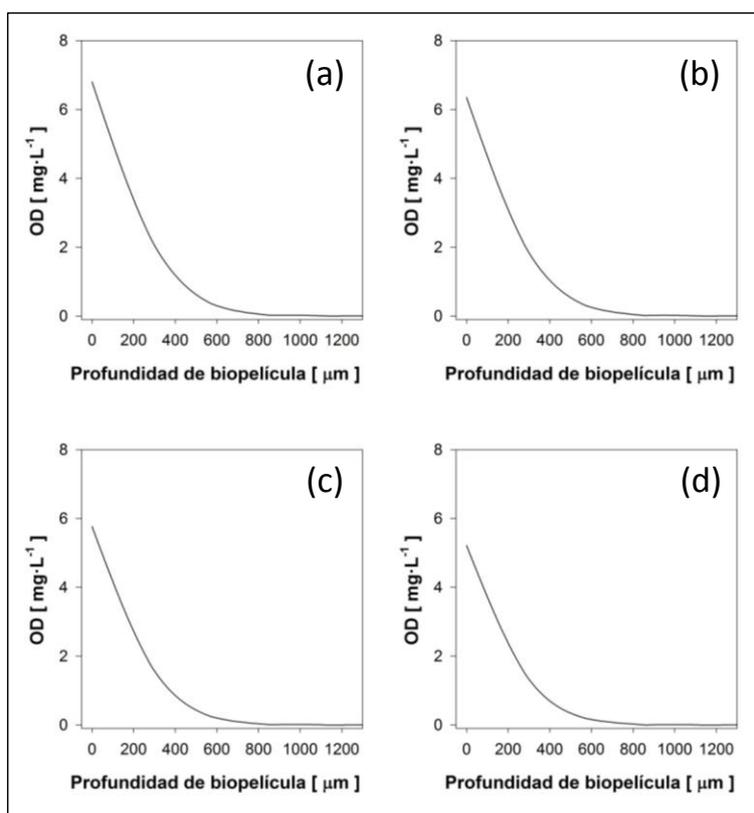


Figura 7.9. Concentración de OD en el interior de la biopelícula en las 6 secciones de reactor resultado de la discretización. Los perfiles corresponden a una sección de biopelícula a 2.5 cm (a), 7.5 cm (b), 12.5 cm (c) y 17.5 cm (d) de la entrada del reactor.

La simulación de la concentración de OD en el interior de la biopelícula se muestra en la Figura 7.9 para las diferentes secciones del reactor, desde la entrada hasta la salida. Los resultados de la simulación muestran como la tendencia de la concentración de OD en la fase líquida observada en la Figura 7.8, entre la entrada y la salida del reactor, se repite en los perfiles de OD en el interior de la biopelícula. En este sentido, la concentración de OD en la superficie de la biopelícula disminuye a lo largo del reactor desde $6.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $5.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Las diferencias observadas entre los valores de

concentración de OD simulados en la fase líquida y en la biopelícula, se explican por la resistencia a la transferencia de materia considerada entre las dos fases.

Los resultados de la Figura 7.9 también muestran como el oxígeno en el interior de la biopelícula se agota antes de 1000 μm de profundidad en las diferentes secciones del reactor simuladas. Estos resultados demuestran que la velocidad de consumo del sustrato está limitada por la concentración de OD.

Por otro lado, la penetración del OD en los perfiles simulados se mantiene constante a lo largo de todo el reactor. Esta tendencia se explica porque en la simulación de la biopelícula se utiliza un valor constante de densidad y de velocidad de circulación a lo largo de todo el reactor. La profundidad de penetración del oxígeno está definida por la difusión del OD, y tal y como se observa en la Figura 7.6 y en la Figura 7.7 que depende de la densidad de la biopelícula y de las condiciones hidrodinámicas en el reactor.

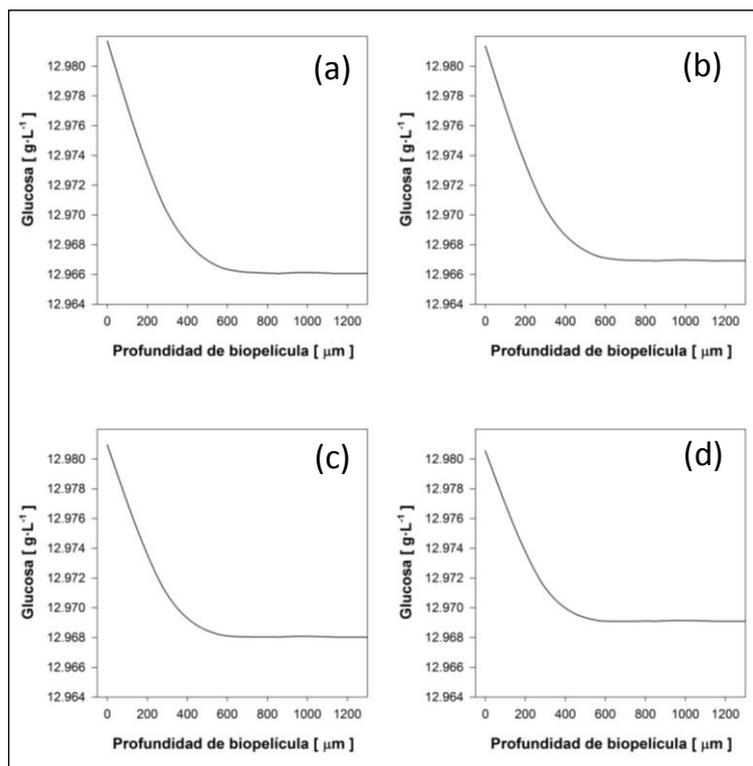


Figura 7.10. Concentración de glucosa en el interior de la biopelícula en las 6 secciones de reactor resultado de la discretización. Los perfiles corresponden a una sección de biopelícula a 2.5 cm (a), 7.5 cm (b), 12.5 cm (c) y 17.5 cm (d) de la entrada del reactor.

Los perfiles simulados de concentración de glucosa en la biopelícula a lo largo del reactor se presentan en la Figura 7.10. Los resultados muestran como la concentración de glucosa en la superficie de la biopelícula también disminuye desde la entrada hasta la

salida del reactor (desde $12.981 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $12.980 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Comparando los perfiles de la Figura 7.10 con la concentración de glucosa en la fase líquida (Figura 7.10) se observa como la resistencia a la transferencia de materia considerada en la simulación, provoca que la concentración disminuya desde la fase líquida hasta la superficie de la biopelícula.

Por otra parte, los perfiles muestran como sólo hay consumo de glucosa hasta la profundidad en la que el oxígeno se agota. A partir de esta profundidad se observa una concentración constante hasta la zona más profunda de la biopelícula. Estos resultados muestran que la glucosa no se agota, y que por lo tanto la actividad de los microorganismos sólo está limitada por la concentración de oxígeno en el interior de la biopelícula, tal y como se supuso en el desarrollo del modelo.

7.5. CONCLUSIONES

Las metodologías experimentales para la estimación de los coeficientes de transporte de materia (externo e interno) han demostrado ser una excelente herramienta para describir el transporte de materia en función de las condiciones experimentales. Su utilización en este capítulo ha permitido caracterizar la influencia de las condiciones hidrodinámicas y la estructura de la biopelícula sobre el transporte de materia externo e interno. El diseño de los experimentos y la estimación de los intervalos de confianza han asegurado la fiabilidad del resultado de los estudios.

Los resultados del coeficiente de transferencia de materia externo en función de las condiciones hidrodinámicas del reactor han permitido confirmar que debido a la rugosidad de la superficie de la biopelícula, el transporte de materia externo no puede describirse utilizando la aproximación clásica de Blasius (que asume una superficie plana de la biopelícula). Esta desviación respecto a la tendencia teórica se ha incluido en una nueva correlación desarrollada para estimar el coeficiente de transferencia de materia externo en una biopelícula heterótrofa cultivada en un BPP-CA.

Respecto al estudio del transporte de materia interno, los resultados del coeficiente de difusión en función de las condiciones hidrodinámicas del reactor demuestran que el transporte de materia está impulsado por la combinación de mecanismos de transporte difusivos y convectivos. Estos resultados también muestran la existencia de una velocidad de circulación en el BPP-CA por debajo de la cual el transporte de materia

está fuertemente limitado ($10 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) y una por encima de la cual la velocidad transporte de materia aumenta considerablemente ($20 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$). Por otro lado, se observó como el incremento de la densidad de la biopelícula acentúa la resistencia al transporte de materia interno, que está claramente limitado en biopelículas de densidades superiores a $50 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$.

Las diferencias observadas entre los coeficientes de difusión estimados experimentalmente y los calculados utilizando los diferentes modelos, ponen de manifiesto las limitaciones que presentan las correlaciones disponibles para describir el transporte de materia en sistemas experimentales diferentes a los utilizados en su desarrollo. Por este motivo, se ha aprovechado el potencial de los microsensores para caracterizar experimentalmente el transporte de materia en el interior de una biopelícula heterótrofa. Estos resultados han sido utilizados para avanzar en la descripción de la difusión en el interior de las biopelículas, desarrollando una correlación que aborda el efecto de la heterogeneidad estructural a través de la densidad de la biopelícula y de las condiciones hidrodinámicas.

Los resultados del modelo desarrollado utilizando las correlaciones propuestas y los datos cinéticos estimados a partir de perfiles de OD, han demostrado la mejora en la modelización de biopelículas utilizando estos parámetros. Además, el modelo ha demostrado ser capaz de predecir el comportamiento de la biopelícula en unas condiciones diferentes a las que se utilizaron para calibrar los parámetros biocinéticos y de transporte de materia. En este sentido, la incorporación en el desarrollo del modelo de las correlaciones propuestas en este capítulo ha dotado al modelo de la capacidad de incluir en sus predicciones el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre el comportamiento de la biopelícula.

Capítulo 8

**Estudio de biopelículas sulfuroxidantes utilizando
microsensores: caracterización cinética y
monitorización de lechos biológicos**

8. ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS SULFUROXIDANTES UTILIZANDO MICROSENSORES: CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y MONITORIZACIÓN DE LECHOS BIOLÓGICOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la monitorización de biopelícula sulfuroxidantes, divididos en dos apartados. En primer lugar, se presentan los resultados de la caracterización cinética de una biopelícula sulfuroxidante (adaptando la metodología presentada en el capítulo 6). En segundo lugar, se presentan los resultados de la monitorización de un biofiltro percolador utilizando el microsensar MEMS (capítulo 5).

Resumen

La cinética de una biopelícula sulfuroxidante se caracterizó a partir de la estimación de los parámetros de un modelo biocinético desarrollado para describir la actividad de los microorganismos. La biopelícula se cultivó en un bioreactor de placa plana reproduciendo las condiciones habituales de operación de un biofiltro percolador. Las predicciones del modelo se ajustaron a los perfiles de OD, H₂S y pH adquiridos experimentalmente, dando lugar a una distribución de los parámetros biocinéticos a lo largo de la biopelícula. En el estudio biocinético se estimaron los parámetros de consumo de oxígeno y el rendimiento entre el sulfuro degradado y el oxígeno consumido. La variabilidad en el valor de los parámetros estimados puso de manifiesto el efecto de la heterogeneidad de la biopelícula sobre la cinética de los microorganismos. Por otro lado, la monitorización de la biopelícula sulfuroxidante cultivada en el respirómetro heterogéneo demostró el elevado potencial del microsensar MEMS de OD para la monitorización en línea de biofiltros percoladores. El diseño del microsensar permitió conocer la concentración de OD en diferentes puntos del interior de la biopelícula delante de diferentes escenarios de operación. El microsensar presentó una sensibilidad capaz de detectar cambios en la concentración de oxígeno provocados por pequeñas variaciones en la concentración de H₂S en la fase gas, así como un tiempo de respuesta adecuado (<5 s) para seguir la dinámica de la biopelícula. Los resultados de la monitorización también permitieron identificar y avanzar escenarios por limitación de oxígeno en el interior de la biopelícula, e incluso detectar situaciones en las que se sobrepasaba la capacidad máxima de eliminación de H₂S de los microorganismos.

Parte del contenido de este capítulo ha sido presentado en:

6th IWA Odour and Air Emissions Conference (2016). *Enhancing the application of respirometric techniques as a tool for microbial activity monitoring in trickling beds.*

M. Mora, X. Guimerà, L. R. López, A. D. Dorado, X. Gamisans, J. Lafuente, D. Gabriel.

8.1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales aplicaciones de los biofiltros percoladores ha sido la eliminación de sulfuro de hidrógeno (H_2S). A pesar de que su construcción y operación es más compleja que la de otros sistemas de biofiltración, su elevado control sobre la operación ha permitido tratar emisiones con un amplio rango de concentraciones (entre 0 y $10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) y caudales (elevadas eficacias incluso en caudales superiores a $10\cdot 10^4 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$). Por este motivo, esta tecnología ha sido ampliamente utilizada para la eliminación del H_2S tanto en fuentes de emisión de olores (principalmente emisiones en estaciones depuradoras de aguas residuales) (Gabriel y Deshusses 2003; Santos et al. 2014), como en gases ricos energéticamente (biogás) (Fortuny et al. 2008; Rodriguez et al. 2014).

Esta tecnología ha sido aplicada con éxito para el tratamiento de corrientes con cargas de H_2S de hasta $100 \text{ g H}_2\text{S}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ (Gabriel y Deshusses 2003; Rodriguez et al. 2014; Fortuny et al. 2008). Sin embargo, el tratamiento de cargas superiores presenta algunos problemas de funcionamiento en los equipos. La biodegradación del H_2S es muy sensible a la concentración de OD en el interior de la biopelícula, y la limitación de la concentración de oxígeno acentúa la producción de azufre elemental (Montebello et al. 2012), que puede provocar la colmatación del lecho (Fortuny et al. 2010; Rodriguez et al. 2014).

Para optimizar la operación de los equipos y evitar estos escenarios de, diferentes parámetros pueden ser monitorizados durante la biofiltración del H_2S , principalmente la concentración de H_2S en la entrada y la salida y la concentración de OD en la fase líquida. A pesar de que la monitorización de estos parámetros ha permitido incrementar el control de los biofiltros, la ausencia de información sobre los procesos desarrollados en el interior de la biopelícula reduce la capacidad de prever y anticipar las situaciones de limitación por OD.

El microsensor de OD presentado en el capítulo 5, fue diseñado y desarrollado para la monitorización simultánea del OD a diferentes profundidades en el interior de una biopelícula. Este microsensor, validado para la monitorización de biopelículas heterótrofas en reactores de laboratorio, ha permitido simplificar el procedimiento necesario para monitorizar biopelículas. El desarrollo de este microsensor abre la posibilidad de monitorizar el OD en el interior de las biopelículas cultivadas sobre el

lecho de los biofiltros percoladores, para incrementar el control y el conocimiento de los procesos de biofiltración.

Por otro lado, el conocimiento y la operación de los biofiltros percoladores para la eliminación de H_2S pueden ser mejorados a partir del desarrollo de modelos matemáticos rigurosos, para la descripción del proceso de desulfuración. Los modelos desarrollados pueden ser utilizados para aplicar diferentes estrategias de control con el objetivo de mejorar el aporte de oxígeno en el sistema (modificando el caudal de aire para la oxigenación o la velocidad de percolación) para reducir la acumulación de sulfuro elemental en el lecho (López 2016). En este sentido, el desarrollo de modelos matemáticos que incorporan la descripción cinética de los microorganismos sulfuroxidantes que crecen en los biofiltros percoladores es de gran utilidad para completar los modelos de biofiltración.

Sin embargo, es difícil determinar por separado la cinética de biodegradación de los microorganismos que crecen sobre el material de relleno de los biofiltros y los parámetros de transporte de materia (Kim y Deshusses 2003). La respirometría es una herramienta típica para evaluar la actividad de degradación de microorganismos que crecen en cultivos en suspensión. La utilización de esta técnica para caracterizar biomasa inmovilizada conduce a la destrucción de la biopelícula, y la modificación de su fisiología original de los microorganismos, provocando generalmente la sobreestimación de la actividad biológica, ya que la estructura de la biopelícula y los fenómenos de transporte no son considerados (García-Peña et al. 2005).

En este capítulo se ha adaptado la metodología presentada en el capítulo 6 (en biopelículas heterótrofas) para la caracterización cinética de biopelículas sulfuroxidantes. Para ello se ha desarrollado un bioreactor de placa plana en fase gas (BPP-FG) que permite el cultivo de una biopelícula sulfuroxidante reproduciendo las condiciones de operación habituales de un biofiltro percolador. Los parámetros del modelo biocinético se estimaron ajustando los perfiles simulados a los perfiles experimentales adquiridos utilizando microsensores de OD, H_2S y pH. Por otro lado, se evaluó la viabilidad del microsensor MEMS de OD (desarrollado en el capítulo 5) para monitorizar el OD en el interior de una biopelícula sulfuroxidante cultivada sobre el relleno de un biofiltro percolador.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1. Bioreactor de placa plana en fase gas

Las biopelículas sulfuroxidantes utilizadas para el estudio y la caracterización biocinética se cultivaron en un BPP-FG. El diseño y la puesta en marcha del bioreactor se describen con detalle en la sección 4.1.2. La operación del reactor, durante el cultivo y el estudio de la biopelícula, se llevó a cabo alimentando el H₂S en paralelo a la fase líquida y reproduciendo las condiciones de operación de un biofiltro percolador para la eliminación de H₂S (Rodríguez et al. 2014). En la Tabla 8.1 se muestran los principales parámetros de operación.

Tabla 8.1. Variables de operación del bioreactor de placa plana en fase gas durante el cultivo y el estudio de la biopelícula sulfuroxidante.

Variable de operación	Valor de la variable
Tiempo de residencia de la fase gas (TRG) [s]	75
Tiempo de residencia hidráulico (TRL) [h]	6
Velocidad de recirculación (v _L) [m·h ⁻¹]	3.4
Carga alimentada [g H ₂ S·m ⁻³ ·h ⁻¹]	0.2-20

8.2.1.1. Preparación del inóculo

La biomasa (autótrofa) utilizada para la inoculación del BPP-FG se extrajo de un biofiltro percolador, a escala laboratorio, para la desulfuración aerobia (López et al. 2015). El lecho del biofiltro percolador estaba dividido en 3 secciones (3 L de volumen total), rellenas con anillos Pall (16 mm de diámetro). De cada una de las secciones se seleccionaron 10 anillos, recubiertos de biopelícula, que fueron lavados en una solución de medio mineral (la composición del medio se detalla en la sección 4.1.2.2) para extraer la biomasa. La concentración de biomasa resultante del muestreo no fue suficiente para realizar la inoculación del BPP-FG. Por este motivo, la biomasa extraída del biofiltro se cultivó en un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) (sección 4.1.1), alimentando sulfuro en fase líquida (solución de Na₂S), hasta disponer de un cultivo con una concentración adecuada (alrededor de 4 g SSV·L⁻¹).

El RCTA se operó alimentando por separado el medio mineral y la solución de sulfuro para evitar reacciones entre el sulfuro y las especies metálicas presentes en el medio mineral (elementos traza). La solución de sulfuro ($27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2S) se alimentó con un caudal de $7.2 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, equivalente a una carga de $44 \text{ g S}\cdot\text{m}^{-3}$ de reactor $\cdot\text{h}^{-1}$. El medio mineral se alimentó con un caudal de $27.6 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, obteniendo un tiempo de residencia total en el reactor de 52 horas. La fuente de carbono se suministró al reactor añadiendo NaHCO_3 ($3.5 \text{ g C}\cdot\text{L}^{-1}$) en el medio mineral. El reactor se aireó con un caudal de $60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, para asegurar que la actividad de los microorganismos no estaba limitada por déficit de oxígeno. Inicialmente la biomasa de la purga se recirculó al reactor para reducir la pérdida de inóculo. Pasadas las primeras 72 horas se pasó a operar el reactor sin recirculación de biomasa hasta llegar al estado estacionario.

Una vez alcanzado el estado estacionario, se extrajeron 250 mL del reactor para realizar la inoculación del BPP-FG, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.1.2.2.

8.2.1.2. Monitorización del reactor BPP-FG

La operación del bioreactor durante el cultivo de la biopelícula sulfuroxidante se controló monitorizando las principales variables del proceso. La monitorización de la fase gas consistió en el análisis en línea de la concentración de H_2S en la entrada y salida del BPP-FG, utilizando un sensor electroquímico (Surecell-H2S-L, Sixth Sense, Reino Unido). El caudal de gas en la entrada del reactor se monitorizó y ajustó utilizando un rotámetro (062-01 SA, Cole-Parmer, USA). La pérdida de carga de la fase gas (entre la entrada y la salida del reactor) se midió periódicamente utilizando un manómetro digital (Testo 512, Testo, Alemania) observando valores inferiores a 0.06 mbar. El pH de la fase líquida se monitorizó en línea en la recirculación del reactor utilizando una sonda de pH (SenTix 81, WTW, Alemania) y un equipo de adquisición (Inolab 740, WTW, Alemania). Esta medida se utilizó para controlar el pH en la entrada del reactor (consigna de pH 6.8) adicionando soluciones de NaOH y HCl 1M con una microbureta de 2 canales (Multi-burette 2S, Crison, España) utilizando un sistema control difuso programado en LabView (Prades et al. 2014). La monitorización de la fase líquida se completó tomando muestras diarias en la salida del reactor para monitorizar la concentración de sulfato y tiosulfato por cromatografía iónica. La biopelícula fue monitorizada mediante microsensores de OD, H_2S y pH, utilizando 6

puertos de muestreo situados a lo largo de la coordenada longitudinal de la placa plana del reactor. El primer puerto estaba situado a 2 cm del inicio de la placa plana, y el resto de puertos estaban separados entre ellos por 3 cm.

Los perfiles de OD, H₂S y pH utilizados en la caracterización cinética de la biopelícula sulfuroxidante se adquirieron utilizando un microsensar de OD tipo Clark (OXI-25, Unisense, Dinamarca), un microsensar de H₂S (H2S-25, Unisense, Dinamarca) y un microsensar de pH (membrana de de vidrio) (PH-25, Unisense, Dinamarca). Los microsensares utilizados presentan tamaños de punta de 25 µm. Los perfiles de las tres especies se adquirieron secuencialmente siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.2.1. El microsensar de H₂S se calibró analizando su respuesta en dos soluciones tampón (calibrado de 2 puntos): una libre de H₂S y la otra con una concentración conocida de dicho gas. El tampón (pH 4) se preparó a partir de una solución 0.849 M de ácido acético y 0.151 M de acetato de sodio. La solución de H₂S, de concentración conocida, se preparó disolviendo una cantidad conocida de Na₂S en el tampón. A pH 4 el equilibrio de especies del sulfuro se encuentra totalmente desplazado a H₂S, y su concentración puede calcularse a partir de la de Na₂S. La medida de H₂S en (el microsensar realiza la medida de la especie en forma de H₂S) debe transformarse a concentración de H₂S total. La concentración total de H₂S se determina a partir del equilibrio de especies del sulfuro (en la Ecuación 8.1 se muestra la ecuación para determinar el equilibrio por debajo de pH 9). De este modo, los perfiles de H₂S y pH se utilizaron para determinar el perfil de H₂S total, correspondiente a la suma de la concentración de las tres especies de sulfuro (H₂S, HS⁻ y S²⁻).

$$[H_2S]_{total} = [H_2S] \cdot \left(1 + \frac{K_{HS}}{[H^+]} \right) \quad \text{Ecuación 8.1}$$

Donde $[H_2S]_{total}$ es la suma de concentración de las tres especies del equilibrio de sulfuro (H₂S, HS⁻ y S²⁻) (mol·m⁻³), $[H_2S]$ es la concentración en fase gas medida con el microsensar de H₂S (mol·m⁻³), $[H^+]$ es la concentración de protones (mol·m⁻³) y K_{HS} es la constante de ionización H₂S/HS⁻ (mol·m⁻³), calculada a partir de la Ecuación 8.2 (Kühl et al. 1998).

$$pK_{HS} = -98.08 + \frac{5765.4}{T} + 15.04555 \cdot \ln(T) + (-0.157 \cdot (S^{0.5})) + 0.0135 \cdot S \quad \text{Ecuación 8.2}$$

Donde T es la temperatura del sistema (K) y S es la salinidad de la solución (%).

El microsensor de pH se calibró midiendo su respuesta en dos soluciones tampón, de pH 4.01 y 7.00 (pH buffer solutions, Crison, España).

La monitorización de la biopelícula se completó analizando la concentración de biomasa en los puntos de biopelícula monitorizados con los diferentes microsensores. La densidad de la biopelícula se analizó midiendo la concentración de SSV, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.2.1.3.

8.2.2. Respirómetro heterogéneo

La viabilidad del microsensor MEMS de OD para la monitorización de biofiltros percoladores fue analizada. Para ello el microsensor se utilizó para monitorizar una biopelícula sulfuroxidante cultivada sobre el lecho de un respirómetro heterogéneo (descrito en la sección 4.1.2.3). El respirómetro heterogéneo consiste en un biofiltro percolador de dimensiones reducidas, operado en modo discontinuo, que permite el control exhaustivo de la concentración de oxígeno en las fases líquido y gas. Con ello, el funcionamiento del microsensor MEMS se validó simulando las condiciones de operación de un biofiltro percolador convencional. En la Tabla 8.2 se muestran el valor de los parámetros de funcionamiento del respirómetro.

Tabla 8.2. Variables de operación del respirómetro heterogéneo durante el cultivo y el estudio de la biopelícula sulfuroxidante.

Variable de operación	Valor de la variable
Caudal de recirculación del líquido [L·h ⁻¹]	22.50
Caudal de recirculación del gas [L·h ⁻¹]	90
Volumen de líquido [L]	0.125
Volumen de gas [L]	1.49

El lecho del respirómetro heterogéneo (0.73 L) está formado por anillos Pall de 16 mm de diámetro. La inoculación del reactor se llevó a cabo rellenando el respirómetro con anillos ya colonizados con una biopelícula sulfuroxidante. Los anillos fueron extraídos del biofiltro percolador para la desulfuración aerobia utilizado anteriormente para la inoculación del BPP-FG. El lecho del respirómetro se rellenó con una muestra

representativa de los anillos Pall extraídos. A continuación se adicionaron 126 mL de medio mineral en el decantador del respirómetro, que fueron recirculados durante 24 horas, con el objetivo de estabilizar la biopelícula después de su inoculación y de agotar los sustratos acumulados en su interior (principalmente H₂S y azufre elemental). Durante todo este periodo la fase líquida fue aireada en continuo.

La respuesta del microsensor se evaluó monitorizando los cambios de la concentración de OD en el interior de la biopelícula, forzados por la inyección de pulsos de H₂S en la fase gas del respirómetro. La concentración de OD en la biopelícula se midió insertando el microsensor a través de un puerto de muestreo instalado en el respirómetro. El microsensor se introdujo en el interior de la biopelícula manualmente asegurando que los 8 electrodos monitorizados estaban en el interior de la biopelícula. A continuación, el puerto de muestreo se selló, utilizando una resina epoxi, para evitar fugas de líquido o gas. La monitorización del OD en los 8 electrodos se realizó utilizando el CE integrado en el microsensor (descrito en detalle en el capítulo 5) y un RE externo (REF321, Radiometer Analytical, Francia) introducido en el decantador a través de un puerto de muestreo. El microsensor MEMS fue caracterizado y calibrado antes y después de la monitorización del respirómetro heterogéneo. Los resultados de sensibilidad del microsensor antes y después de la monitorización (4 horas) de la biopelícula sulfuroxidante (en la Tabla 8.3) muestran una disminución de la sensibilidad inferior al 10 % en todos los electrodos, que permite despreciar los efectos de la dinámica del microsensor.

Tabla 8.3. Sensibilidad del microsensor MEMS antes y después de la monitorización de la biopelícula sulfuroxidante.

Electrodo (Posición)	Sensibilidad de los electrodos [nA·mg OD ⁻¹ ·L ⁻¹]		Pérdida de sensibilidad
	Inicial	Final	[%]
e1 (0 μm)	1.62	1.43	10
e2 (125 μm)	1.69	1.52	9
e3 (250 μm)	1.69	1.57	7
e4 (375 μm)	1.63	1.68	0
e5 (500 μm)	1.83	1.76	4
e6 (625 μm)	1.75	1.70	3
e7 (750 μm)	1.52	1.63	0
e8 (875 μm)	2.01	1.83	9

Los pulsos de H₂S en fase gas, se realizaron operando el respirómetro heterogéneo en discontinuo. La fase gas y la fase líquida se recircularon, con velocidades de 32 m·h⁻¹ y 8 m·h⁻¹ respectivamente, con las entradas de gas (aireación de la fase líquida) y de líquido (renovación de la fase líquida) cerradas. La finalización de los experimentos (después de la inyección de los pulsos de H₂S) se determinó a partir de la recuperación de la concentración de OD después del consumo del H₂S inyectado. El equilibrio del sistema se recuperó después de los pulsos abriendo el respirómetro heterogéneo y reactivando la aireación de la fase líquida. La sensibilidad del microsensar para detectar las variaciones de OD en el interior de la biopelícula se estudió analizando su respuesta respecto a la inyección de diferentes volúmenes de H₂S, 200 µL, 1 mL, 5 mL y 10 mL, que corresponden a una concentración de H₂S en la fase gas de 134 ppm_v, 627 ppm_v, 3360 ppm_v y 6720 ppm_v, respectivamente.

La respuesta del microsensar se validó comparando su respuesta con la medida en continuo de la concentración de oxígeno en la fase líquida y en la fase gas adquirida con los macrosensares de OD (fase líquida) y O₂ en fase gas, instalados en el respirómetro. El oxígeno en fase gas se monitorizó con un sensor electroquímico (SIDOR module OXOR-P, SICK, Alemania), mientras que el OD se monitorizó utilizando un sensor galvánico (CellOx 325, WTW, Alemania). El pH del medio mineral fue monitorizado en la recirculación de la fase líquida mediante una sonda específica (SenTix 81, WTW, Alemania). La señal del sensor de OD y pH se registró utilizando el mismo equipo de adquisición (Inolab Terminal level 3, WTW, Alemania). La medida de pH se utilizó para regular de forma precisa el pH en el decantador (consigna de 7.0±0.1) utilizando una microbureta de dos canales (Multi-burette 2S, Crison, España) para adicionar soluciones 1 M de NaOH y HCl.

8.3. MODELO MATEMÁTICO DE LA BIOPELÍCULA SULFUROXIDANTE

Con el objeto de mejorar el conocimiento acerca de la actividad de los microorganismos autótrofos que conforman la biopelícula sulfuroxidante cultivada en el BPP-FG, se desarrolló un modelo matemático utilizando la aproximación difusión-reacción. Los aspectos más importantes para la modelización de la biopelícula fueron la descripción de los fenómenos de transporte de materia (externo e interno) y de la cinética de degradación del H₂S. El transporte de materia externo e interno en la

biopelícula cultivada en el BPP-FG se describió utilizando las correlaciones desarrolladas en el capítulo 7 (Ecuación 7.15 y Ecuación 7.22). De este modo, la principal incertidumbre es la descripción de la cinética de degradación de H₂S. La cinética de degradación del H₂S se modelizó considerando que la eliminación del H₂S tiene lugar en dos etapas (Mannucci et al. 2012; Rodriguez 2013; Roosta et al. 2012): una primera en la que el sulfuro se oxida a azufre elemental (Ecuación 8.3) y una segunda en la que el azufre se oxida a sulfato (Ecuación 8.4).



Donde $R_{B,1}$ es la velocidad de consumo de oxígeno para la degradación del sulfuro y $R_{B,2}$ es la velocidad de consumo de oxígeno para la degradación del azufre elemental. Las suposiciones asumidas en el desarrollo y resolución del modelo de la biopelícula, basadas en modelos consolidados (Dorado et al. 2008; Kim y Deshusses 2003; Rodriguez 2013), se presentan a continuación.

- 1) El transporte de materia difusional de las diferentes especies en el interior de la biopelícula es unidimensional (perpendicular a la superficie de la biopelícula), y sigue las leyes de Fick. El transporte de materia interno se describe utilizando la correlación empírica desarrollada en el capítulo 7 (Ecuación 7.22).
- 2) La resistencia al transporte de materia externo se concentra en la interfase líquida, y se define utilizando un coeficiente de transferencia de materia. El coeficiente de transferencia de materia se estima utilizando la correlación empírica desarrollada en el capítulo 7 (Ecuación 7.15).
- 3) No existe acumulación de biomasa en la biopelícula. La densidad de la biopelícula y el coeficiente de difusión en el interior de la biopelícula se considera constante en una sección, y se representan a partir de su valor promedio en ésta.
- 4) La degradación del H₂S en el interior de la biopelícula se describe considerando que el crecimiento de los microorganismos sólo está limitado por la concentración de H₂S, oxígeno y azufre elemental.
- 5) Se considera que la concentración de H₂S en la biopelícula es inferior a la concentración inhibitoria (42,2 mg·L⁻¹) (Mora et al. 2016).

8.3.1. Balance de materia en la biopelícula

El modelo que describe la degradación del H₂S en el interior de la biopelícula sulfurooxidante se desarrolló a partir del balance de materia del sulfuro de hidrogeno, el oxígeno, el sulfato y el azufre elemental, planteados en su interior siguiendo la Ecuación 8.5 y la Ecuación 8.6.

$$\left. \frac{dC_{m,B}}{dt} \right|_{interfase} = k_{m,L} \cdot a \cdot [C_{m,L} - C_{m,B}] \quad \text{Ecuación 8.5}$$

$$\frac{dC_{m,b}}{dt} = D_{m,b} \cdot \frac{\partial^2 C_{m,b}}{\partial z^2} \quad \text{Ecuación 8.6}$$

Donde $C_{m,B}$ es la concentración de las especies m en la superficie de la biopelícula ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), t es el tiempo (s), $k_{m,L}$ es el coeficiente de transferencia de materia externa ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), a es el área específica de transferencia (m^{-1}), $C_{m,b}$ es la concentración de las diferentes especies en el interior de la biopelícula ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), $D_{m,b}$ es el coeficiente de difusión en la biopelícula para las diferentes especies ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) y z es la posición en la profundidad de la biopelícula (m).

8.3.2. Resolución numérica

La resolución de las ecuaciones de balance que describen el funcionamiento de la biopelícula se realizó siguiendo el procedimiento presentado en la sección 7.3.3. En este sentido, la profundidad de la biopelícula se dividió en nb capas, considerando que cada capa presentaba propiedades homogéneas. Teniendo en cuenta que la simulación del modelo se ajustó con los perfiles experimentales para caracterizar la biocinética de la biopelícula, el número de capas en las que se dividió la biopelícula se ajustó al número de puntos muestreados en la adquisición de los perfiles (18 puntos). Los balances de materia de las diferentes especies se plantearon en cada una de las secciones, obteniendo el conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias, que definen el modelo.

8.3.3. Ecuaciones del modelo

La biopelícula sulfurooxidante se modelizó considerando la concentración de sulfuro de hidrógeno, oxígeno, sulfato y azufre elemental. Las ecuaciones del modelo se presentan a continuación para las 4 especies estudiadas.

Las ecuaciones del modelo que describen la concentración de sulfuro de hidrógeno, el oxígeno y el sulfato en el interior de la biopelícula se presentan a continuación para las diferentes secciones de la biopelícula (diferenciadas con el subíndice j). La Ecuación 8.7 presenta el balance para la primera capa de biopelícula ($j=1$), la Ecuación 8.8 presenta el balance de materia desde la segunda ($j=2$) hasta la penúltima capa ($j=nb-1$) y la Ecuación 8.9 presenta el balance de materia en la última capa de biopelícula.

$$\left. \frac{dC_{m,b}(j)}{dt} \right|_{j=1} = k_{m,L} \cdot \frac{A_{trans}}{V_L} \cdot (C_{m,L} - C_{m,b}(j)) - \frac{D_{m,b}}{\left(\frac{z_b}{nb}\right)^2} \cdot (C_{m,b}(j) - C_{m,b}(j+1)) + R_{m,b}(j) \quad \text{Ecuación 8.7}$$

$$\left. \frac{dC_{m,b}(j)}{dt} \right|_{j=2}^{j=nb-1} = \frac{D_{m,b}}{\left(\frac{z_b}{nb}\right)^2} \cdot (C_{m,b}(j-1) - 2 \cdot C_{m,b}(j) + C_{m,b}(j+1)) + R_{m,b}(j) \quad \text{Ecuación 8.8}$$

$$\left. \frac{dC_{m,b}(j)}{dt} \right|_{j=nb} = \frac{D_{m,b}}{\left(\frac{z_b}{nb}\right)^2} \cdot (C_{m,b}(j-1) - C_{m,b}(j)) - R_{m,b}(j) \quad \text{Ecuación 8.9}$$

Donde $C_{m,b}$ es la concentración de las especies m (en este caso: sulfuro, oxígeno y sulfato) en la biopelícula ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), $k_{m,L}$ es el coeficiente de transferencia de materia para la especie m ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), A_{trans} es el área de transferencia de la biopelícula (m^2), V_L es el volumen de la fase líquida en el bioreactor (m^3), $C_{m,L}$ es la concentración de la especie m en la fase líquida ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), $D_{m,b}$ es el coeficiente de difusión de la especie m en el interior de la biopelícula ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), z_b es el espesor de la biopelícula (m), nb es el número de capas en las que se divide la biopelícula y $R_{m,b}$ es la velocidad de degradación o producción de las 3 especies ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$).

Las ecuaciones del modelo que describen la concentración de azufre elemental en el interior de la biopelícula se presentan a continuación para las diferentes secciones en las que se discretiza la biopelícula. La Ecuación 8.10 presenta el balance de materia para el azufre, desde la primera ($j=1$) hasta la última capa ($j=nb$) de biopelícula.

$$\left. \frac{dC_{S,b}(j)}{dt} \right|_{j=1}^{j=nb} = R_{S,b}(j) \quad \text{Ecuación 8.10}$$

Donde $C_{S,b}$ es la concentración de azufre elemental en la biopelícula y $R_{S,b}$ es la velocidad de degradación y/o producción del azufre (en función de la relación $\text{H}_2\text{S}/\text{OD}$).

8.3.4. Parámetros físico-químicos del modelo

El valor de los parámetros físico-químicos del modelo, utilizado en su resolución, se presenta a continuación en la Tabla 8.4.

Tabla 8.4. Valor de los parámetros físico-químicos del modelo.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
Volumen de la fase líquida en el reactor	V_L	0.014	L	Diseño del reactor
Área interfacial de la biopelícula	A_{trans}	$7 \cdot 10^{-3}$	m^2	Diseño del reactor
Espesor de la biopelícula	z_b	800-900	μm	Determinada experimentalmente
Coefficiente de difusión molecular del H_2S	$D_{H_2S,W}$	$1.6 \cdot 10^{-9}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	(Perry y Green 1997)
Coefficiente de difusión molecular del oxígeno	$D_{O_2,W}$	$1.8 \cdot 10^{-9}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	(Nguyen et al. 2014)
Coefficiente de difusión molecular del sulfato	$D_{SO_4,W}$	$1 \cdot 10^{-8}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	(Perry y Green 1997)
Coefficiente de transferencia de materia del H_2S	$k_{H_2S,L}$	$3.12 \cdot 10^{-6}$	$m \cdot s^{-1}$	Capítulo 7
Coefficiente de transferencia de materia del oxígeno	$k_{O_2,L}$	$3.63 \cdot 10^{-6}$	$m \cdot s^{-1}$	Capítulo 7
Coefficiente de transferencia de materia del sulfato	$k_{SO_4,L}$	$1.67 \cdot 10^{-5}$	$m \cdot s^{-1}$	Capítulo 7
Coefficiente de difusión del H_2S en la biopelícula	$D_{H_2S,b}$	$3.03 \cdot 10^{-10}$ - $7.97 \cdot 10^{-10}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Capítulo 7
Coefficiente de difusión del oxígeno en la biopelícula	$D_{O_2,b}$	$3.78 \cdot 10^{-10}$ - $9.96 \cdot 10^{-10}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Capítulo 7
Coefficiente de difusión del sulfato en la biopelícula	$D_{SO_4,b}$	$1.89 \cdot 10^{-9}$ - $4.98 \cdot 10^{-9}$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Capítulo 7

8.3.5. Cinética de degradación

La cinética de crecimiento de los microorganismos sulfuroxidantes, que forman la biopelícula, se modelizó utilizando un modelo cinético de Monod (Rodríguez 2013; Roosta et al. 2012), considerando que el H_2S se oxida en primer lugar a azufre elemental y posteriormente a sulfato. Las ecuaciones cinéticas para las dos reacciones (Ecuación 8.3 y Ecuación 8.4) se desarrollaron considerando que el crecimiento de los microorganismos sólo estaba limitado por la concentración de H_2S , oxígeno y azufre elemental. A partir del modelo de crecimiento de los microorganismos sulfuroxidantes, las velocidades de consumo del oxígeno disuelto en las dos reacciones se describen siguiendo la Ecuación 8.11 y la Ecuación 8.12.

$$R_{B,1} = q_{\max,B1} \cdot \frac{C_{OD,b}}{K_{S1,OD} + C_{OD,b}} \cdot \frac{C_{H_2S,b}}{K_{S,H_2S} + C_{H_2S,b}} \cdot X_b \quad \text{Ecuación 8.11}$$

$$R_{B,2} = q_{\max,B2} \cdot \frac{C_{OD,b}}{K_{S2,OD} + C_{OD,b}} \cdot \frac{C_{S,b}}{K_{S,S} + C_{S,b}} \cdot X_b \quad \text{Ecuación 8.12}$$

Donde $R_{B,1}$ es la velocidad de consumo de oxígeno en la reacción de oxidación del H_2S ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$), $R_{B,2}$ es la velocidad de consumo de oxígeno en la reacción de oxidación del azufre ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$), $q_{\max,B1}$ es la velocidad máxima de consumo de oxígeno para la oxidación del H_2S ($kg \text{ OD} \cdot kg \text{ SSV}^{-1} \cdot s^{-1}$), $q_{\max,B2}$ es la velocidad máxima de consumo de oxígeno para la oxidación del azufre ($kg \text{ OD} \cdot kg \text{ SSV}^{-1} \cdot s^{-1}$), $K_{S1,OD}$ es la constante de semi-saturación del oxígeno en la primera reacción ($kg \cdot m^{-3}$), $K_{S2,OD}$ es la constante de semi-saturación del oxígeno en la segunda reacción ($kg \cdot m^{-3}$), K_{S,H_2S} es la constante de semi-saturación del H_2S ($kg \cdot m^{-3}$), $K_{S,S}$ es la constante de semi-saturación del azufre elemental ($kg \cdot m^{-3}$), $C_{OD,b}$ es la concentración de oxígeno en la biopelícula ($kg \cdot m^{-3}$), $C_{H_2S,b}$ es la concentración de H_2S en la biopelícula ($kg \cdot m^{-3}$), $C_{S,b}$ es la concentración de azufre en la biopelícula ($kg \cdot m^{-3}$) y X_b es la concentración de biomasa en la biopelícula ($kg \text{ SSV} \cdot m^{-3}$).

Las ecuaciones de la velocidad de consumo del oxígeno (Ecuación 8.11 y Ecuación 8.12) se utilizaron para definir las velocidades de consumo/producción del resto de especies estudiadas, presentadas desde la Ecuación 8.13 hasta la Ecuación 8.16.

$$R_{OD,b} = -R_{B,1} - R_{B,2} - R_{b,end} \quad \text{Ecuación 8.13}$$

$$R_{H_2S,b} = -Y_{H_2S/O_2} \cdot R_{B,1} \quad \text{Ecuación 8.14}$$

$$R_{SO_4,b} = Y_{SO_4/O_2} \cdot R_{B,2} \quad \text{Ecuación 8.15}$$

$$R_{S,b} = Y_{S/O_2,1} \cdot R_{B,1} - Y_{S/O_2,2} \cdot R_{B,2} \quad \text{Ecuación 8.16}$$

Donde $R_{OD,b}$ es la velocidad global de consumo de OD ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$), $R_{b,end}$ es el consumo de oxígeno endógeno ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$), $R_{H_2S,b}$ es la velocidad de consumo de H_2S ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$), Y_{H_2S/O_2} es el rendimiento entre el oxígeno consumido y el H_2S degradado ($kg \text{ H}_2\text{S} \cdot kg \text{ OD}^{-1}$), $R_{SO_4,b}$ es la velocidad de producción de sulfato ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$), Y_{SO_4/O_2} es el rendimiento entre el oxígeno consumido y el sulfato producido ($kg \text{ SO}_4 \cdot kg \text{ OD}^{-1}$), $Y_{S/O_2,1}$ es el rendimiento entre el oxígeno consumido y el azufre producido en la primera

reacción ($\text{kg S} \cdot \text{kg OD}^{-1}$) y $Y_{S/O_2,2}$ es el rendimiento entre el oxígeno consumido y el azufre degradado en la segunda reacción ($\text{kg S} \cdot \text{kg OD}^{-1}$). La relación entre el consumo de oxígeno y el consumo y/o producción de H_2S , azufre elemental y sulfato se definieron a partir de las relaciones estequiométricas de las reacciones de degradación (Ecuación 8.3 y Ecuación 8.4).

Tal y como se ha comentado anteriormente, $R_{S,b}$ es la velocidad de consumo o producción de azufre elemental. Considerando las relaciones estequiométricas entre las diferentes especies (definidas en la Ecuación 8.3 y en la Ecuación 8.4) se observa como para relaciones $\text{O}_2/\text{H}_2\text{S}$ superiores a 2, $R_{S,b}$ representa la velocidad de consumo de azufre, mientras que para relaciones $\text{O}_2/\text{H}_2\text{S}$ inferiores a 2, $R_{S,b}$ representa la velocidad de producción de azufre.

La caracterización de la biocinética de los microorganismos sulfuroxidantes se basa en la estimación experimental de los parámetros que definen el modelo cinético. El elevado número de parámetros cinéticos limita su estimación a partir de los perfiles de H_2S y oxígeno adquiridos en el interior de la biopelícula. Por este motivo, sólo se estimaron los parámetros biocinéticos más relevantes, tomando valores bibliográficos para el resto. De acuerdo con Rodríguez (2013) se utilizaron valores bibliográficos para definir los coeficientes de semi-saturación (Roosta et al. 2011). Por lo tanto, la caracterización cinética se basó en la estimación de las velocidades máximas de consumo de oxígeno ($q_{max,B1}$ y $q_{max,B2}$) y la velocidad de consumo de oxígeno endógeno ($R_{b,end}$). Del mismo modo, teniendo en cuenta que la relación entre el consumo de oxígeno y la degradación del H_2S puede variar en función de la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Mora et al. 2016), el parámetro Y_{H_2S/O_2} se incluyó en el procedimiento de estimación (caracterización de la biocinética). El valor bibliográfico de los parámetros biocinéticos, utilizado en la simulación del modelo de biopelícula y en la caracterización de la cinética de los microorganismos sulfuroxidantes, se muestra en la Tabla 8.5.

Tabla 8.5. Valores bibliográficos de los parámetros biocinéticos utilizados en la simulación del modelo de biopelícula sulfuroxidante.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Referencia
Constante de semi-saturación del H ₂ S	K _{S,H₂S}	3.60	mg·L ⁻¹	(Roosta et al. 2011)
Constante de semi-saturación del oxígeno (reacción 1)	K _{S1,OD}	6.72·10 ⁻⁴	mg·L ⁻¹	(Roosta et al. 2011)
Constante de semi-saturación del azufre elemental	K _{S,S}	80.77	mg·L ⁻¹	(Roosta et al. 2011)
Constante de semi-saturación del oxígeno (reacción 2)	K _{S2,OD}	6.50	mg·L ⁻¹	(Roosta et al. 2011)

8.3.6. Estimación de parámetros

Los parámetros del modelo cinético se estimaron siguiendo un procedimiento de optimización sin restricciones. La concentración de H₂S y oxígeno simulada en el interior de la biopelícula se ajustó a los perfiles experimentales adquiridos con microsensores. El ajuste se llevó a cabo minimizando la función objetivo, obteniendo el valor de los parámetros biocinéticos que minimizan la diferencia entre los perfiles experimentales y simulados. La función objetivo del procedimiento de optimización se calculó dando el mismo peso a los perfiles de OD y H₂S, tal y como se muestra en la Ecuación 8.17.

$$F_{objetivo} = \sqrt{\sum_{i=1}^{n_m} [y_{exp,i} - y_{\theta,i}]^2}_{\text{oxígeno}} + \sqrt{\sum_{i=1}^{n_m} [y_{exp,i} - y_{\theta,i}]^2}_{\text{H}_2\text{S}} \quad \text{Ecuación 8.17}$$

Donde $F_{objetivo}$ es la función objetivo a minimizar, n_m es el número de medidas experimentales, $y_{\theta,i}$ es la concentración simulada de oxígeno y H₂S, y $y_{exp,i}$ es la concentración experimental de oxígeno y H₂S. Los procedimientos de simulación y minimización descritos para la estimación de los parámetros se llevaron a cabo mediante el software Matlab R2013a.

8.4. RESULTADOS

8.4.1. Caracterización cinética de la biopelícula sulfuroxidante

La caracterización cinética de la biopelícula sulfuroxidante, cultivada sobre el BPP-FG, se llevó a cabo a partir de la adquisición de perfiles de OD, H₂S y pH en su interior y del ajuste de los perfiles al modelo biocinético de la biopelícula.

8.4.1.1. Cultivo de la biopelícula sulfuroxidante

El cultivo de la biopelícula sulfuroxidante se inició en un reactor continuo de tanque agitado. La operación del RCTA se monitorizó con el objetivo de evaluar el crecimiento de los microorganismos y determinar el estado estacionario. La monitorización del reactor de tanque consistió en el seguimiento de la concentración de sulfato y de la concentración de biomasa en el RCTA. Los resultados del seguimiento se muestran en la Figura 8.1.

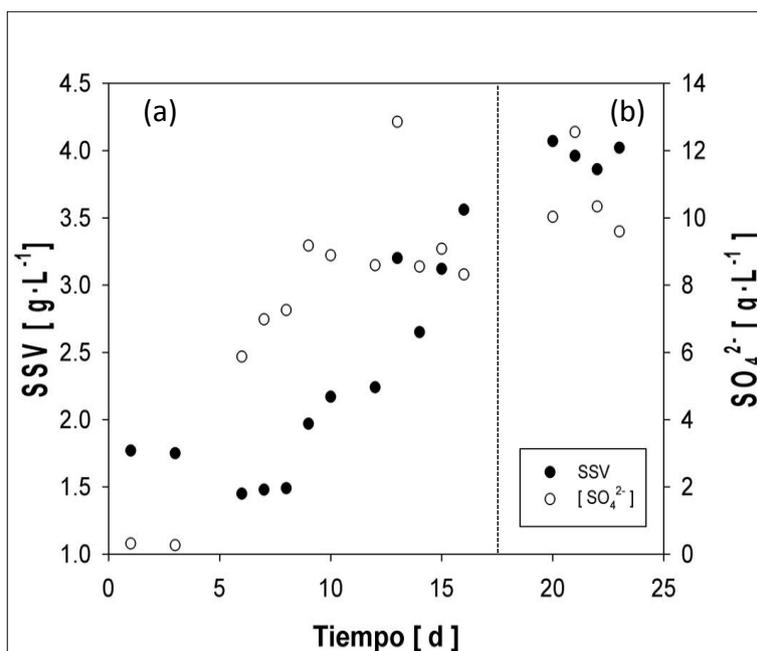


Figura 8.1. Seguimiento de la concentración de SSV y sulfato durante el cultivo de biomasa sulfuroxidante en el RCTA. La línea discontinua diferencia la operación en estado no estacionario (a) y la operación en estado estacionario (b).

Los resultados de la Figura 8.1 muestran la concentración de sulfato y de biomasa en el interior del reactor durante la operación del RCTA. El aumento de las dos concentraciones demuestra el aumento de la actividad y el crecimiento de la biomasa inoculada, respectivamente. A partir del análisis de estos resultados fue posible determinar que el estado estacionario se alcanzó pasados 17 días de la inoculación. El estado estacionario corresponde al instante en el que las concentraciones de sulfato y biomasa dejan de crecer y presentan un valor constante a lo largo de la monitorización. Una vez alcanzado el estado estacionario, la biomasa cultivada en el RCTA se utilizó para inocular el BPP-FG. De este modo, después de una semana de operación en estado estacionario se extrajeron 250 mL del RCTA para inocular el BPP-FG.

La biomasa en suspensión (con una concentración de aproximadamente $4 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$) se recirculó durante 24 horas después de la inoculación para asegurar la retención de los microorganismos sobre la placa plana (sección 4.1.2). A continuación, se pasó a operar el reactor alimentando en continuo la fase gas y la fase líquida, con un *TRL* y un *TRG* de 6 h y 75 s respectivamente. La velocidad de recirculación se ajustó para mantener un valor de v_L de $3.4 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. La concentración de H_2S alimentada en el reactor se seleccionó teniendo en cuenta que el modelo cinético, presentado en la sección 8.3, considera el crecimiento de los microorganismos en el rango de concentraciones de H_2S no inhibitorias (por debajo de $42.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Por este motivo, el reactor se alimentó con una concentración de H_2S máxima de $200 \pm 10 \text{ ppm}_v$ en la fase gas (equivalente a una concentración de equilibrio en la fase líquida de $16.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Después de observar problemas de inhibición alimentando directamente la concentración de 200 ppm_v , se decidió alimentar el H_2S en la fase gas de forma creciente hasta una concentración final cercana a las 200 ppm_v . La alimentación, aumentando secuencialmente la concentración de H_2S , evitó problemas de inhibición durante el crecimiento de la biopelícula sulfuroxidante. El estudio biocinético se llevó a cabo en condiciones estacionarias. El estado estacionario del reactor se determinó monitorizando la concentración de H_2S en la entrada y salida del reactor y la concentración de sulfato en la purga del reactor. Los resultados del seguimiento se muestran en la Figura 8.2.

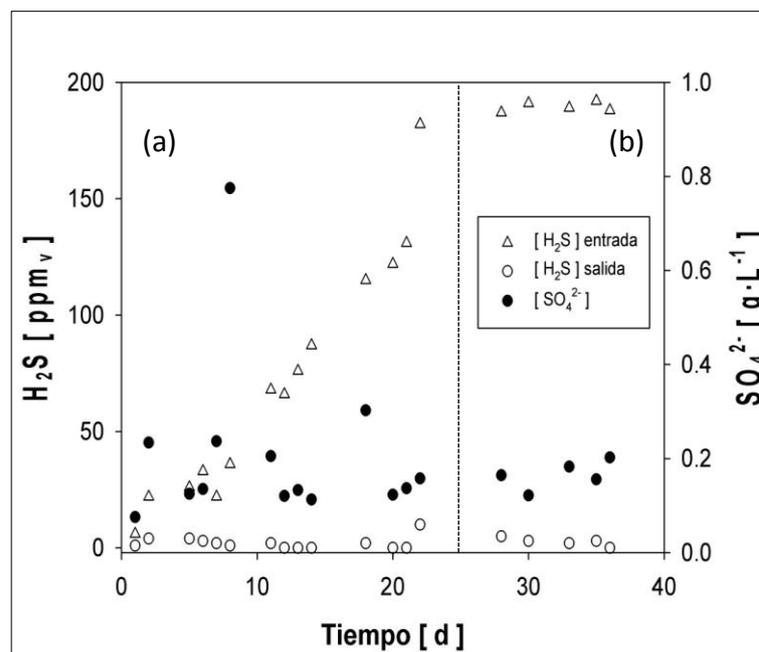


Figura 8.2. Seguimiento de la concentración de H_2S (entrada y salida del reactor) y sulfato durante la formación de la biopelícula sulfuroxidante en el BPP-FG. La línea discontinua diferencia la operación en estado no estacionario (a) y la operación en estado estacionario (b).

El seguimiento de la concentración de sulfato en la purga mostró una concentración prácticamente constante a lo largo de la operación. Esta tendencia se explica porque la concentración de sulfato producida por la oxidación del H₂S es inferior a la presente en el medio mineral. Por este motivo, la selección del estado estacionario se llevó a cabo a partir del análisis de la concentración de H₂S en la entrada y salida del reactor. En este sentido, se observó que después de 2 días alimentando el reactor con una concentración cercana a las 200 ppm_v (26 días), se observó una concentración a la salida constante y cercana a 0 ppm_v. El seguimiento de la operación del BPP-FG (Figura 8.2), durante la formación de la biopelícula permitió seleccionar el momento en el que iniciar el estudio biocinético.

8.4.1.2. Estimación de los parámetros del modelo biocinético

Los parámetros biocinéticos del modelo de biopelícula ($q_{max,B1}$ y $q_{max,B2}$, $R_{b,end}$ y Y_{H_2S/O_2}) se determinaron experimentalmente a partir de la adquisición de perfiles de OD, H₂S y pH en su interior. La adquisición de los perfiles se repitió en las diferentes secciones del reactor (definidas en la Figura 6.1) con el objetivo de evaluar el efecto de la heterogeneidad de la biopelícula sobre la actividad de los microorganismos. Las condiciones de operación en el reactor se mantuvieron constantes durante la adquisición de los perfiles.

La concentración de biomasa en la biopelícula (densidad de la biopelícula) se analizó en las diferentes secciones del reactor, obteniendo un resultado de 30.51 g SSV·L⁻¹, 41.20 g SSV·L⁻¹, 25.06 g SSV·L⁻¹ y 21.93 g SSV·L⁻¹ (desde la entrada hacia la salida del reactor). Esta tendencia difiere de la observada anteriormente en bioreactores de placa plana (capítulo 6). Esta diferencia se explica por el efecto de dos factores. En primer lugar, la v_L durante el cultivo de la biopelícula sulfurooxidante fue considerablemente inferior a la utilizada en los estudios previos, reduciendo el impacto de las condiciones hidrodinámicas sobre la formación de la biopelícula. En segundo lugar, el crecimiento de la biopelícula sulfurooxidante estuvo limitado por la concentración de sustrato, y la alimentación del H₂S en paralelo a la circulación de la fase líquida del reactor provocó que el mayor crecimiento de los microorganismos se concentrara en la entrada del reactor (mayores concentraciones de H₂S).

Las tres especies (OD, H₂S y pH) fueron monitorizadas desde la interfase gas-líquido hasta la zona más profunda de la biopelícula. Los perfiles de OD y H₂S se analizaron para determinar el inicio de la biopelícula (siguiendo el procedimiento presentado en la sección 6.3.2.1). El resultado de este análisis se muestra en la Figura 8.3.

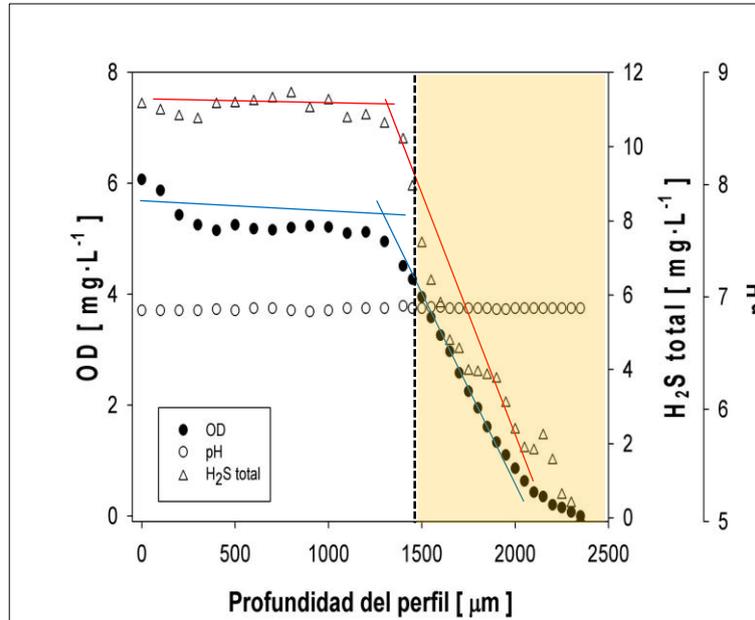


Figura 8.3. Perfiles de OD, H₂S y pH adquiridos en el BPP-FG, y análisis del pendiente de los perfiles de OD (azul) y H₂S (rojo) utilizado para determinar la interfase líquido-biopelícula (línea discontinua) y el tramo de perfil correspondiente al interior de la biopelícula (sombreado).

La zona de los perfiles con una tendencia prácticamente constante para la concentración de las dos especies, corresponde al interior de la fase líquida donde la resistencia al transporte de materia es pequeña y mitiga los gradientes de concentración en su interior. Por otro lado, el tramo del perfil en el que las concentraciones disminuyen hasta agotarse corresponde al interior de la biopelícula, donde la mayor resistencia al transporte de materia y la actividad de los microorganismos acentúan los gradientes de concentración. La profundidad en la que se sitúan la interfase del líquido y la superficie de la biopelícula se determinaron siguiendo el método descrito en la Figura 6.7. Este análisis se repitió para obtener los perfiles de OD y H₂S (en el interior de la biopelícula) a lo largo del reactor. Estos perfiles se presentan en la Figura 8.4.

Los perfiles de concentración (OD y H₂S) simulados (utilizados en el procedimiento de optimización) también se presentan en la Figura 8.4. El valor de los parámetros biocinéticos obtenidos en la calibración del modelo se presentan en la Tabla 8.6 y en la Tabla 8.7.

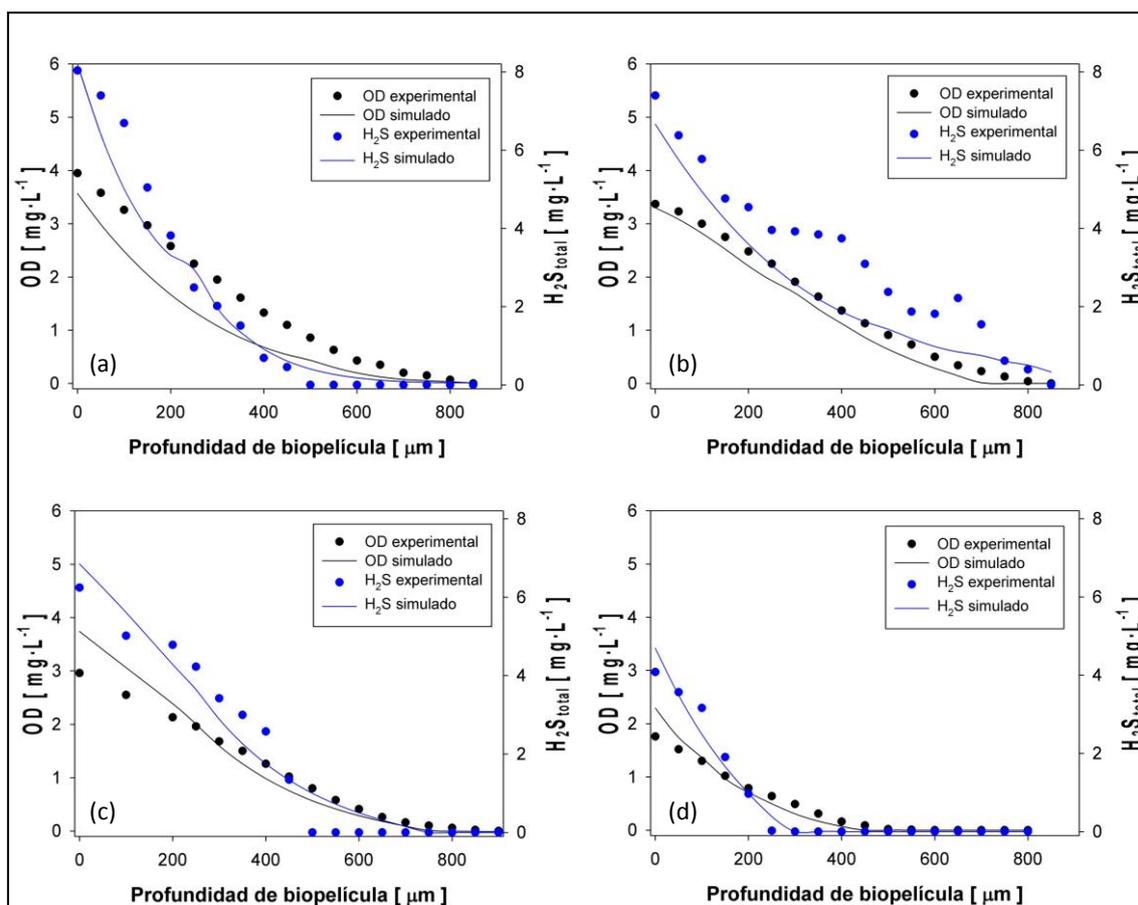


Figura 8.4. Perfiles de OD y H₂S adquiridos experimentalmente en el interior de la biopelícula sulfurooxidante y simulados para la estimación de los parámetros biocinéticos. Los perfiles corresponden a secciones de biopelícula de (a) 30.51 g SSV·L⁻¹, (b) 41.20 g SSV·L⁻¹, (c) 25.06 g SSV·L⁻¹ y (d) 21.93 g SSV·L⁻¹.

A partir del procedimiento de optimización utilizado para simular los perfiles de OD y H₂S se estimaron algunos de los parámetros biocinéticos del modelo. El valor obtenido para los parámetros $q_{max,B1}$, $q_{max,B2}$ y $R_{b,end}$ se muestran en la Tabla 8.6.

Tabla 8.6. Valores de $q_{max,B1}$, $q_{max,B2}$ y $R_{b,end}$ estimados a partir de perfiles de OD y H₂S adquiridos en la biopelícula sulfurooxidante cultivada en el BPP-FG. Los valores se estimaron a partir de los perfiles de la Figura 8.4a (sección 1), de la Figura 8.4b (sección 2), de la Figura 8.4c (sección 3) y de la Figura 8.4d (sección 4).

Sección reactor	$q_{max,B1}$ [mg OD·gSSV·L ⁻¹ ·s ⁻¹]	$q_{max,B2}$ [mg OD·gSSV·L ⁻¹ ·s ⁻¹]	$R_{b,end}$ [mg OD·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
1	0.017	0.0107	$8.28 \cdot 10^{-5}$
2	0.018	0.012	$1.16 \cdot 10^{-4}$
3	0.018	0.0114	$9.51 \cdot 10^{-5}$
4	0.022	0.0143	$1.06 \cdot 10^{-4}$

Los parámetros cinéticos (Tabla 8.6) presentan una variación en su valor a lo largo del reactor. Esta variabilidad en la actividad de los microorganismos está provocada por la heterogeneidad de la biopelícula. La variación observada para los 3 parámetros estimados es muy similar. En este sentido, el parámetro $q_{max,B1}$ presenta una variación

del 22% entre la entrada y la salida del reactor (entre $0.017 \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $0.022 \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), mientras que el parámetro $q_{max,B2}$ presenta una variación del 25% (entre $0.0107 \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $0.0143 \text{ mg OD}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). El crecimiento de estos parámetros a lo largo de la biopelícula describe la presencia de microorganismos más activos cuando se avanza hacia la salida del reactor. Esta distribución de microorganismos se debe a su selección durante la operación del reactor. De este modo, las concentraciones de H_2S (inferiores) en la salida del reactor, favorece el crecimiento de microorganismos con una velocidad específica de consumo de oxígeno ligeramente superior. Por otro lado, la variación observada en las estimaciones del consumo de oxígeno endógeno ($R_{b,end}$) es del 30% (entre $8.28\cdot 10^{-5} \text{ mg OD}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $1.16\cdot 10^{-4} \text{ mg OD}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

El estudio cinético también se utilizó para evaluar el rendimiento sulfuro-oxígeno (Y_{H_2S/O_2}) a lo largo del reactor. Tal y como sugieren diferentes autores (López et al. 2016; Mora et al. 2016) el crecimiento de los microorganismos puede variar la relación entre el sulfuro degradado y el oxígeno consumido. Mora et al. (2016) describe que la energía que necesitan las células para duplicarse se obtiene de una parte de los electrones presentes en la reacción. Este fenómeno reduce el requerimiento del aceptor de electrones (oxígeno), modificando la relación estequiométrica entre el sulfuro y el oxígeno (Ecuación 8.3) que puede descender hasta valores cercanos a $0.4 \text{ mol O}_2\cdot\text{mol H}_2\text{S}^{-1}$.

La heterogeneidad de la biopelícula (observada en su estructura y en su actividad) también tiene un impacto en el crecimiento de los microorganismos. Por lo tanto, el Y_{H_2S/O_2} puede utilizarse para evaluar posibles diferencias en el crecimiento de los microorganismos a lo largo de la biopelícula. Los resultados de Y_{H_2S/O_2} obtenidos en la caracterización cinética de la biopelícula sulfurooxidante se presentan en la Tabla 8.7.

Tabla 8.7. Valores de Y_{H_2S/O_2} estimados a partir de perfiles de OD y H_2S adquiridos en la biopelícula sulfurooxidante cultivada en el BPP-FG. Los valores se estimaron a partir de los perfiles de la Figura 8.4a (sección 1), de la Figura 8.4b (sección 2), de la Figura 8.4c (sección 3) y de la Figura 8.4d (sección 4).

Sección reactor	Densidad biopelícula [g SSV·L ⁻¹]	Y_{H_2S/O_2} [kg O ₂ ·kg H ₂ S]
1	30.51	0.41
2	41.20	0.50
3	25.06	0.53
4	21.95	0.52

Los resultados de la Tabla 8.7 muestran como efectivamente, el crecimiento de los microorganismos modifica la relación Y_{H_2S/O_2} . El crecimiento heterogéneo de los microorganismos provoca un perfil marcado del rendimiento sulfuro-oxígeno a lo largo del reactor. Los resultados muestran como la alimentación del reactor en paralelo (H_2S y O_2 en la entrada del reactor), provoca un mayor crecimiento en la sección inicial del reactor (Y_{H_2S/O_2} de 0,41 kg O_2 ·kg H_2S^{-1}) respecto al resto del reactor (Y_{H_2S/O_2} entre 0.51 kg O_2 ·kg H_2S^{-1} y 0.53 kg O_2 ·kg H_2S^{-1}).

Los perfiles de OD y H_2S adquiridos en el interior de la biopelícula sulfurooxidante (Figura 8.4) muestran como la actividad de los microorganismos (oxidación biológica del H_2S) provoca la disminución de la concentración de OD y H_2S a lo largo de la biopelícula. En este sentido, la concentración de OD en su superficie disminuye desde 3.95 mg·L⁻¹ (Figura 8.4a) en la primera sección del reactor hasta 1.75 mg·L⁻¹ (Figura 8.4b) en la última sección del reactor, mientras que la de H_2S lo hace desde 8.04 mg·L⁻¹ (Figura 8.4a) hasta 4.08 mg·L⁻¹ (Figura 8.4b). La disminución de la concentración en la superficie de la biopelícula influye en la penetración de ambas especies, que también decrece a lo largo del reactor (desde 850 μ m hasta 550 μ m para el OD, y desde 500 μ m hasta 250 μ m para el H_2S). Los valores de OD medidos a lo largo del reactor (entre 2 mg·L⁻¹ y 4 mg·L⁻¹ en la superficie de la biopelícula) muestra como la limitación de la concentración de oxígeno es un factor importante en los sistemas sulfurooxidantes. Por su parte, la concentración de H_2S medida en el interior de la biopelícula presenta valores no inhibitorios (concentraciones entre 4 mg·L⁻¹ y 8 mg·L⁻¹), tal y como se consideró en el desarrollo del modelo (sección 8.3). La comprobación de esta suposición permitió utilizar el modelo para caracterizar la biocinética de la biopelícula en el presente estudio.

Los perfiles simulados muestran como el modelo de biopelícula es capaz de predecir la concentración de OD y H₂S observada experimentalmente en el interior de la biopelícula. La calidad del ajuste se analizó calculando el error cuadrático medio normalizado (NRMSE) entre los perfiles experimentales y los perfiles simulados. Los valores de NRMSE (Tabla 8.8) muestran diferencias inferiores al 15% en todos los casos e inferiores al 10% en la mayoría de ellos. Sin embargo, los perfiles simulados presentan pequeñas diferencias con los perfiles experimentales. Las diferencias se concentran en la superficie de la biopelícula. En algunos casos estas diferencias se mantienen a lo largo de toda la biopelícula. Estas diferencias están provocadas probablemente por la descripción del transporte de materia externo en el modelo de la biopelícula sulfuroxidante, que se lleva a cabo utilizando una correlación desarrollada para biopelículas heterótrofas (Ecuación 7.15). Esta tendencia muestra las limitaciones de esta correlación para describir el transporte de materia externo en un sistema diferente al que se utilizó en su desarrollo.

Tabla 8.8. Error cuadrático medio normalizado (NRMSE) entre los perfiles de OD y H₂S experimentales y simulados de la Figura 8.4.

Sección	NRMSE [%]	
	Perfiles OD	Perfiles H ₂ S
1	14.68	13.18
2	6.36	13.69
3	9.24	8.42
4	9.14	6.02

El valor de los parámetros biocinéticos (Tabla 8.6) se comparó con el valor bibliográfico presentado en estudios de caracterización cinética de microorganismos sulfuroxidantes. La mayoría de los estudios cinéticos (Mora et al. 2016; Kim y Deshusses 2003; Bonilla-Blancas et al. 2015) expresan el consumo máximo de oxígeno a partir de un solo parámetro, sin diferenciar entre el consumo para la oxidación del sulfuro y para la oxidación del azufre elemental. Por este motivo, es difícil comparar los resultados presentados en estos trabajos con los obtenidos en el estudio actual. Sin embargo, en Roosta et al. (2012) diferencian entre el consumo de oxígeno máximo para la oxidación de las 2 especies (sulfuro y azufre elemental). El valore reportado en este trabajo (0.093 mg OD·g SSV⁻¹·s⁻¹ para la primera reacción y 0.14 mg OD·g SSV⁻¹·s⁻¹ para la segunda reacción) es un orden de magnitud mayor al presentado en el trabajo actual. Esta misma tendencia se observa comparando el consumo de oxígeno endógeno

estimado en este trabajo ($1.00 \cdot 10^{-4} \pm 1.40 \cdot 10^{-5}$ mg OD \cdot L $^{-1}$ \cdot s $^{-1}$) con el valor bibliográfico de diferentes estudios ($2,2 \cdot 10^{-3}$ mg OD \cdot L $^{-1}$ \cdot s $^{-1}$ en Mora et al. (2016) y $1.6 \cdot 10^{-3}$ mg OD \cdot L $^{-1}$ \cdot s $^{-1}$ en Bonilla-Blancas et al. (2015)).

La diferencia observada entre los parámetros bibliográficos y los parámetros experimentales se explica probablemente por las diferencias en las condiciones de operación de los sistemas experimentales. En este sentido, los parámetros estimados en cultivos en suspensión tienden a sobreestimar la actividad de los microorganismos con respecto a aquellas poblaciones que crecen de forma inmovilizada, tal y como sugirieron García-Peña et al. (2005) y Bonilla-Blancas et al. (2015).

8.4.2. Monitorización del respirómetro heterogéneo

El microsensar MEMS, presentado en el capítulo 5, se utilizó para monitorizar el OD en el interior de una biopelícula sulfuroxidante cultivada en el respirómetro heterogéneo. Los resultados de la monitorización se utilizaron para validar el funcionamiento de este microsensar para el análisis del OD en el interior de biofiltros percoladores. El respirómetro se operó reproduciendo las condiciones hidrodinámicas de un biofiltro percolador. La capacidad del microsensar para monitorizar la concentración de OD de forma precisa se evaluó analizando la respuesta del microsensar respecto a diferentes pulsos de H₂S en fase gas. El análisis del funcionamiento del sensor en la monitorización de la biopelícula sulfuroxidante se completó analizando la coherencia entre la concentración de OD medida en el interior de la biopelícula y los resultados de monitorización de las fases gas y líquido obtenidos con dos macrosensores comerciales.

8.4.2.1. Monitorización de las fases gas y líquida

La concentración de OD en la fase líquida y el porcentaje de O₂ en la fase gas se monitorizaron durante toda la operación del respirómetro heterogéneo. Los resultados del seguimiento durante las diferentes fases de la operación se muestran en la Figura 8.5.

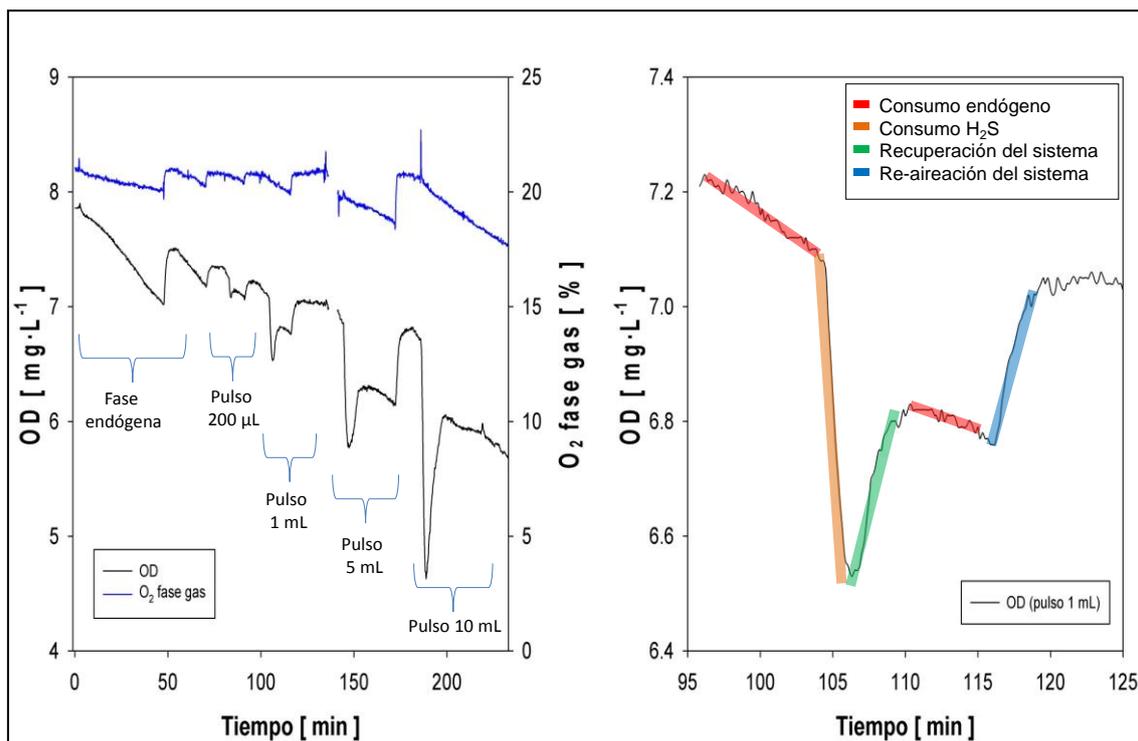


Figura 8.5. (a) Resultados de la monitorización de la concentración de OD en la fase líquida y O₂ en la fase gas durante la operación del respirómetro heterogéneo. Las diferentes fases de la operación (respiración endógena y pulsos de 200 μL, 1 mL, 5 mL y 10 mL) se especifican sobre los resultados del seguimiento. (b) Análisis de la concentración de OD en la fase líquida a lo largo de un pulso de H₂S en la fase gas.

Los resultados de la Figura 8.5a muestran las variaciones de la concentración de oxígeno (en el líquido y el gas) durante la operación del respirómetro. Los cambios observados en el porcentaje de O₂ en la fase gas están provocados por los fenómenos de transferencia de materia entre el gas y el líquido. En este sentido, la disminución observada en la concentración de oxígeno en la fase gas corresponde a periodos de operación discontinua, en los que el consumo de OD en el respirómetro dio lugar a un gradiente de concentración entre la fase gas y la fase líquida provocando la transferencia de oxígeno entre dichas fases. Del mismo modo, la recuperación del porcentaje de O₂ corresponde a los periodos de re-aireación en los que el sistema tiende a recuperar las condiciones iniciales.

El perfil de concentración de OD en la fase líquida muestra claramente las diferentes fases de la actividad de los microorganismos. En la Figura 8.5b se diferencian los cambios en la concentración de OD provocados por el consumo endógeno, por el consumo de H₂S, por la recuperación del sistema después del agotamiento del H₂S tras los pulsos y por la re-aireación de la fase líquida.

El análisis de la concentración de OD en el líquido, Figura 8.5a, muestra, como era de esperar, que cuando aumenta el volumen inyectado en los pulsos, la velocidad de consumo de oxígeno aumenta (pendientes de la curva de OD) y el valor final de OD en la fase líquida disminuye (mínimos de la curva de OD). Este comportamiento demuestra que estos resultados pueden ser utilizados para caracterizar la actividad de la biopelícula sulfuroxidante, ya que existe una respuesta monitorizable y sensible a los cambios en el sistema.

8.4.2.2. Monitorización de la biopelícula sulfuroxidante

El microsensor MEMS de OD fue utilizado para monitorizar la biopelícula sulfuroxidante durante la operación del respirómetro. La medida de la concentración de OD en diferentes profundidades de la biopelícula sulfuroxidante se utilizó para validar el funcionamiento del microsensor para la monitorización de biofiltros percoladores. Para ellos se evaluaron diferentes velocidades de consumo de oxígeno (inyectando diferentes volúmenes de H₂S). La concentración de OD medida en el interior de la biopelícula se comparó con la concentración de oxígeno medida en la fase líquida y la fase gas.

La concentración de oxígeno en la fase líquida y la fase gas durante la respiración endógena de los microorganismos y después de pulsos de H₂S de 200 µm, 1 mL, 5 mL y 10 mL, se presentan a continuación en la Figura 8.6a, c, e, g y i respectivamente. Por otro lado, la concentración de OD en el interior de la biopelícula durante la respiración endógena de los microorganismos y después de los pulsos de H₂S de 200 µm, 1 mL, 5 mL y 10 mL, se presentan a continuación en la Figura 8.7b, d, f, h y j respectivamente.

La monitorización de la biopelícula reveló que por debajo de 625 µm se encontraba bajo condiciones anaerobias. Por este motivo, en los resultados de la monitorización de la biopelícula, no se muestran las concentraciones de OD adquiridas con los electrodos correspondientes a las profundidades 750 µm y 875 µm.

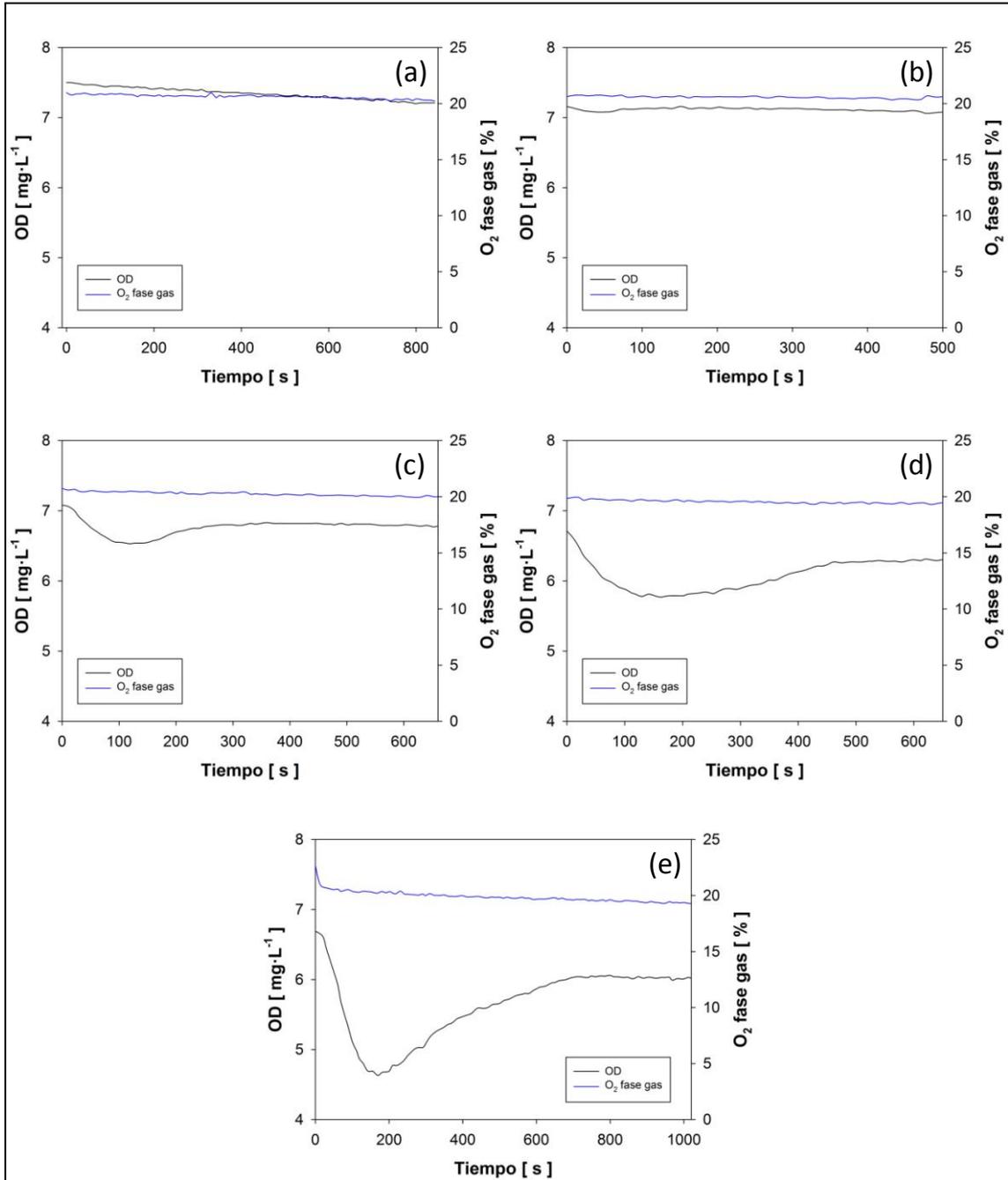


Figura 8.6. Concentración de oxígeno en la fase líquida y la fase gas del respirómetro heterogéneo durante la fase de respiración endógena (a) y después de pulsos de H₂S de: 200 μL (b), 1 mL (c), 5 mL (d) y 10 mL (e).

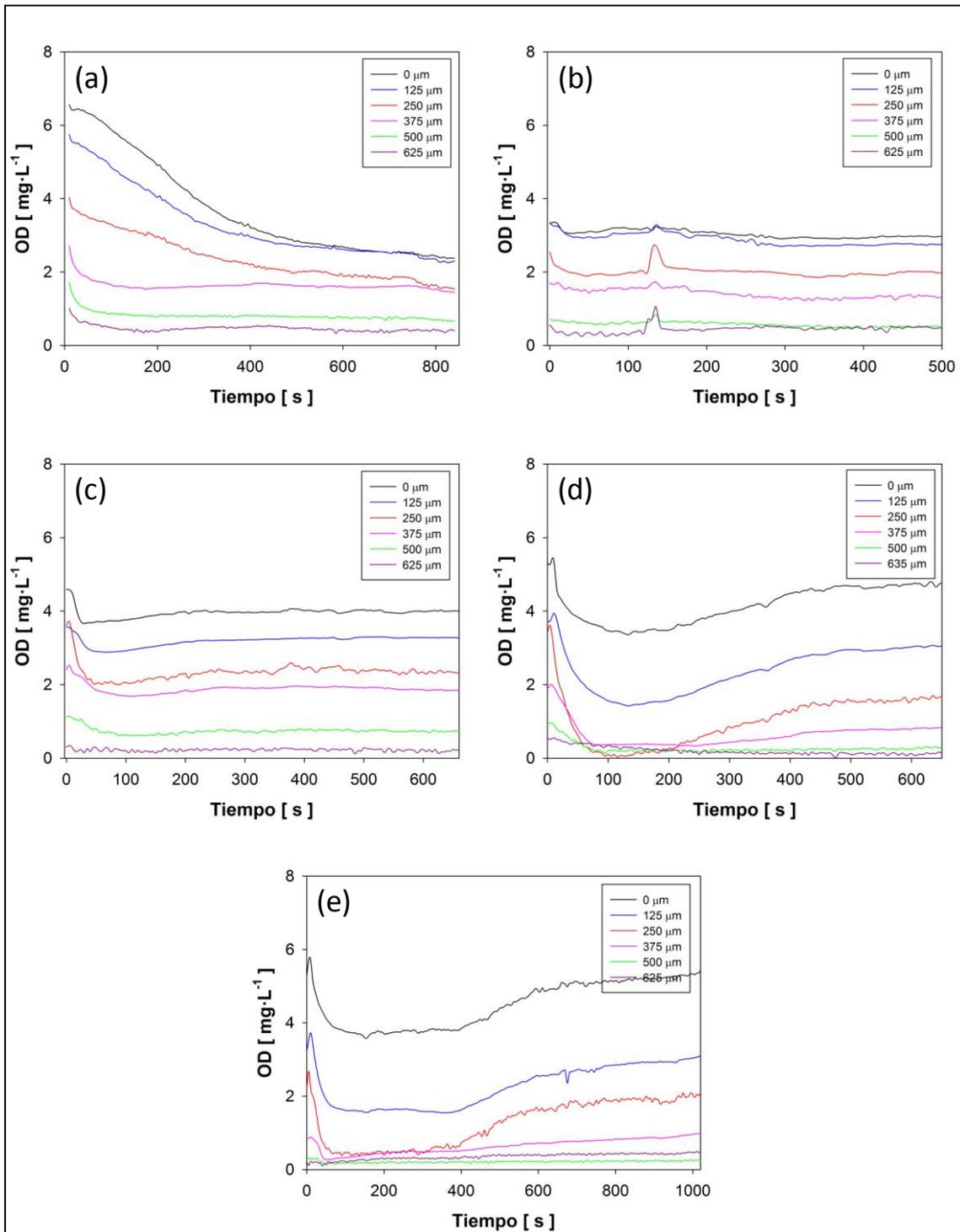


Figura 8.7. Concentración de OD en el interior de la biopelícula sulfuroxidante cultivada en el respirómetro heterogéneo durante la fase de respiración endógena (a) y después de pulsos de H_2S de: 200 μL (b), 1 mL (c), 5 mL (d) y 10 mL (e).

La monitorización de la respiración endógena de los microorganismos (Figura 8.7a) muestra un consumo de OD muy elevado (superior a $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante los 800 s de seguimiento. Comparando estos resultados con el consumo de OD en la fase líquida (Figura 8.6a) (inferior a $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), demuestra que la mayor actividad en el interior de la biopelícula sólo puede explicarse por la degradación de sustratos acumulados en la zona monitorizada y no por la respiración endógena de los microorganismos.

Los resultados de la Figura 8.6 y la Figura 8.7 también muestran el efecto de la inyección de los pulsos de H_2S sobre la concentración de OD en las diferentes fases del respirómetro heterogéneo. Analizando los datos obtenidos en el interior de la biopelícula se observa como la inyección de los diferentes volúmenes de H_2S provoca la disminución de la concentración de OD, consumido por los microorganismos en la degradación del H_2S . También se observa como la actividad de los microorganismos (consumo de OD) tiene lugar sobre todo en las primeras $400 \mu\text{m}$ de la biopelícula, ya que por debajo de $500 \mu\text{m}$ profundidad la concentración de OD está claramente limitada, con concentraciones al inicio de todos los pulsos inferiores a $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Además, se observa como la inyección de volúmenes crecientes de H_2S , incrementa el consumo de OD en el interior de la biopelícula. En este sentido se observa como después de la inyección de un volumen de H_2S de $200 \mu\text{L}$ (que corresponde a una concentración de 135 ppm_v en la fase gas), la concentración de OD sólo disminuye entre $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el interior de la biopelícula. Sin embargo, los posteriores pulsos de 1 mL , 5 mL y 10 mL (concentraciones de H_2S en la fase gas de 675 ppm_v , 3375 ppm_v y 6750 ppm_v) provocan consumos de OD en el interior de la biopelícula de $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Estos resultados demuestran que la resolución que ofrece en microsensor permite detectar con precisión cambios de diferente magnitud en la evolución del OD en el interior de la biopelícula sulfuroxidante.

La monitorización del OD en el interior de la biopelícula también permitió comprobar que la alimentación de concentraciones mayores de H_2S acentúa la limitación por oxígeno en su interior. En este sentido, en la Figura 8.7d y la Figura 8.7e se observa como el grosor de biopelícula aerobia disminuye por debajo de $300 \mu\text{m}$ para concentraciones de H_2S , en la fase gas, superiores a 3000 ppm_v . Además en la Figura 8.7e se observa como después de la bajada inicial de la concentración de OD en el

interior de la biopelícula, ésta se mantiene constante. Este fenómeno se explica porque los microorganismos están consumiendo el oxígeno a su velocidad máxima. Estos resultados demuestran la capacidad del microsensor para detectar posibles escenarios de limitación (en este caso por oxígeno) en el interior del lecho del reactor.

La comparación de los resultados obtenidos utilizando los dos sensores también puso de manifiesto que el microsensor es capaz de seguir en el interior de la biopelícula los cambios en la concentración de OD detectados en la fase líquida. Comparando las señales de los diferentes sensores (microsensor MEMS y macrosensor de OD) se observa como el microsensor MEMS es tan sensible como el macrosensor de OD al ruido electromagnético del ambiente. Esto descarta totalmente la necesidad de utilizar elementos, tales como una caja de Faraday, para eliminar el ruido de la señal del microsensor. Estos resultados demuestran que el microsensor MEMS es una herramienta excelente para la monitorización y el control de biofiltros percoladores. La elevada robustez de este dispositivo permite implementarlo en un biofiltro percolador para monitorizar la biopelícula, sin poner en compromiso la integridad del microsensor. Además, su diseño multi-electrodo permite adquirir en continuo información del proceso en diferentes profundidades de la biopelícula.

8.5. CONCLUSIONES

La utilización de microsensores para realizar medidas de OD, H₂S y pH ha permitido desarrollar una metodología para la caracterización de la actividad de biopelículas sulfuroxidantes. El método presentado en este trabajo permite caracterizar la actividad de una biopelícula sulfuroxidante *in situ*, considerando además la heterogeneidad de la biopelícula. La caracterización de la cinética de biopelículas a partir de medidas en su interior, utilizando microsensores, permite desarrollar y validar modelos cinéticos más precisos que mejoran la fiabilidad de los modelos de biofiltración. Por la tanto el desarrollo de esta metodología es muy interesante porque ha permitido caracterizar la actividad de los microorganismos, estimando los parámetros de consumo de oxígeno, y aportando información relevante acerca del mecanismo de degradación del H₂S, estableciendo la relación entre el H₂S degradado y el oxígeno consumido.

Asimismo, los resultados presentados en este capítulo han demostrado que el diseño del microsensor MEMS de OD, reduce el procedimiento y los equipos necesarios para monitorizar biopelículas y permite su utilización para la monitorización de biofiltros

percoladores. El microsensar ha demostrado una elevada sensibilidad para detectar cambios en la concentración de OD en el interior de la biopelícula provocados por variaciones en las condiciones de operación. La utilización del microsensar para monitorizar en línea el interior de biopelículas permite incrementar el conocimiento del proceso de degradación en los biofiltros percoladores. La capacidad de estas medidas para detectar escenarios de limitación abre la posibilidad de utilizarlas para optimizar la operación de los biofiltros percoladores, e incluso para caracterizar directamente la actividad de los microorganismos que crecen sobre lechos inmovilizados.

Capítulo 9

**Desarrollo de un microsensor multi-analito basado
en tecnología MEMS para el estudio y monitorización
de biopelículas**

9. DESARROLLO DE UN MICROSENSOR MULTI-ANALITO BASADO EN TECNOLOGIA MEMS PARA EL ESTUDIO Y MONITORIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

En este capítulo se presenta un nuevo microsensor multi-analito, diseñado y fabricado utilizando tecnología MEMS, que soluciona las principales limitaciones del microsensor de OD, presentado en el capítulo 5, y que permite la monitorización simultánea del OD y el pH a lo largo de la profundidad de una biopelícula.

Resumen

Un nuevo microsensor de OD y pH integrado, basado en tecnología MEMS, ha sido desarrollado específicamente para la monitorización de biopelículas. Para ello, se incorporó una segunda matriz de electrodos de platino en el diseño del microsensor MEMS de OD (presentado en el capítulo 5). Sobre los electrodos de platino se electrodepositó una película de óxido de iridio para detectar potenciométricamente el pH. El nuevo microsensor se fabricó utilizando como sustrato una película de Kapton, de 125 μm de grosor, que permitió minimizar el daño causado en la estructura de la biopelícula durante su inserción. Además los electrodos se protegieron con una membrana de Nafion de 300 nm para prevenir su desactivación, con el objeto de proporcionar una respuesta estable a lo largo del tiempo. Los resultados de la caracterización del nuevo microsensor revelaron una elevada sensibilidad para la detección del OD ($1.73 \pm 0.12 \text{ nA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$) y del pH ($-60.5 \pm 0.6 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$), y unos bajos límites de detección ($0.05 \pm 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el OD y 0.05 unidades de pH para el pH) y cuantificación ($0.17 \pm 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el OD y 0.08 unidades de pH para el pH), que muestran su idoneidad para la monitorización del OD y el pH. La mejora en el funcionamiento del microsensor para la adquisición de perfiles en el interior de biopelículas se confirmó utilizando la respuesta de dos microsensores convencionales (de OD y pH) como patrón. El microsensor fue utilizado para la monitorización de una biopelícula sulfuroxidante, cultivada en condiciones aerobias y con control de pH.

Parte del contenido de este capítulo ha sido presentado en:

6th International Conference on Biotechniques for Air Pollution Control (2015). *Simultaneous oxygen and pH profiling within biofilms using a minimally invasive multi-electrode array.* X. Guimerà, A. Moya, D. Gabriel, R. Villa, A. D. Dorado, G. Gabriel, X. Gamisans.

9.1. INTRODUCCIÓN

Las limitaciones técnicas para el estudio de biopelículas a partir de medidas *in situ* (provocadas por sus reducidas dimensiones entre centenas de micras y pocos milímetros), han sido solventadas mediante el desarrollo de diversos microsensors (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998; Revsbech 2005). Estos instrumentos permiten monitorizar el interior de las biopelículas con una elevada resolución espacial. Sin embargo, la adquisición de perfiles de concentración, normalmente utilizando microsensors electroquímicos (fabricados artesanalmente), sigue siendo un proceso complejo. La adquisición de perfiles requiere la utilización de dispositivos de precisión para posicionar los microsensors mecánicamente a través de la biopelícula (de la Rosa y Yu 2006), pudiéndose monitorizar simultáneamente sólo una especie (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998). Además este tipo de microsensors son frágiles y el coste por sensor es elevado (Wu et al. 2005).

La tecnología MEMS ha mostrado un elevado potencial para el desarrollo de microsensors (Lee et al. 2011). Por este motivo, se utilizó tecnología MEMS (en el capítulo 5) para desarrollar un microsensor diseñado específicamente para la monitorización de OD en el interior de biopelículas. Los resultados de su caracterización mostraron que el sensor fue capaz de reducir algunas de las limitaciones presentadas por los microsensors de OD convencionales, tanto electroquímicos (Revsbech y Jørgensen 1986) como ópticos (Klimant, Meyer y Kuhl 1995). El diseño del microsensor MEMS y la fabricación en masa de estos dispositivos ha permitido simplificar el procedimiento experimental necesario para la adquisición de perfiles de concentración, así como reducir su coste y aumentar su robustez.

El microsensor de OD desarrollado utilizando tecnología MEMS (capítulo 5), ha permitido aumentar el conocimiento disponible de los procesos que tienen lugar en el interior de la biopelícula. En este sentido, los fenómenos de transporte de materia y biocinéticos han sido caracterizados (capítulo 6), aumentando la precisión de los modelos de biopelícula. Sin embargo, el potencial de esta tecnología todavía puede seguir explotándose, desarrollando nuevos diseños que avancen en la mejora y la simplificación del estudio de las biopelículas.

La tecnología MEMS puede utilizarse para fabricar dispositivos para la monitorización simultánea de diferentes analitos. En este sentido, esta tecnología ha

sido utilizada con éxito para desarrollar microsensores electroquímicos para la detección de diferentes analitos, principalmente oxígeno (Lee, Lim, et al. 2007; Liu et al. 2007; del Campo et al. 2007), pH (Lee et al. 2011, 2012 ; Prats-Alfonso et al. 2013) y potencial redox (Lee, Seo, et al. 2007). La posibilidad de diseñar y fabricar matrices de microelectrodos (MEA) utilizando tecnología MEMS permite desarrollar dispositivos para la detección simultánea de algunos de estos analitos, conocidos como sistemas de microanálisis total (μ TAS) (Suzuki 2000; Johnson et al. 2008). Los dispositivos de μ TAS han sido utilizados principalmente para la monitorización celdas de microfluídica (Lete et al. 2015; Palmisano et al. 2000; Akin et al. 2011; Johnson et al. 2008). El desarrollo específico de este tipo de dispositivos para la monitorización de biopelículas permitirá mejorar el estudio de ciertos tipos de biopelículas (por ejemplo biopelículas nitrificantes y sulfuroxidantes), en las que es necesario monitorizar diferentes analitos (principalmente OD y pH) en el mismo punto en el interior de la biopelícula (Kocincova et al. 2007; Zhang et al. 2006).

Por otro lado, el desarrollo del microsensor MEMS de OD reveló problemas en su funcionamiento, provocados por la poca estabilidad de su respuesta (debido a la desactivación de los electrodos) y por el carácter invasivo de sus medidas (por las dimensiones del dispositivo). De este modo, el desarrollo de estos microsensores también debe introducir mejoras tecnológicas que permitan solventar estas limitaciones.

El objetivo perseguido en este capítulo fue el desarrollo de un nuevo microsensor (basado en tecnología MEMS) para la medida simultánea del OD y el pH, diseñado específicamente para la monitorización de biopelículas. El desarrollo del microsensor se inició modificando el diseño del prototipo previo (presentado en el capítulo 5) para permitir la monitorización simultánea de los dos analitos y para incluir las mejoras tecnológicas que permiten solventar las principales limitaciones de funcionamiento de estos microsensores, y se completó caracterizando su respuesta y validando su funcionamiento para la monitorización de biopelículas.

9.2. MATERIALES Y MÉTODOS

9.2.1. Diseño y fabricación del microsensor MEMS multi-analito

El diseño y la fabricación del nuevo microsensor MEMS, para la monitorización del OD y pH, se presentan a continuación.

9.2.1.1. Diseño del microsensor MEMS multi-analito

El nuevo microsensor MEMS (Figura 9.1) se diseñó incluyendo, en la misma aguja, dos matrices de microelectrodos (MEA) de 7 electrodos circulares, una para la monitorización del OD y la otra para la monitorización del pH. Los electrodos circulares (50 μm de diámetro) se dispusieron de manera equidistante, separados por 50 μm , a lo largo de dos líneas paralelas, separadas por 50 μm . Esta configuración permite la adquisición instantánea de un perfil de OD y un perfil de pH, monitorizando simultáneamente los electrodos de las dos MEA. La MEA para la detección del OD se diseñó siguiendo el principio de monitorización amperométrica del OD. De este modo, los electrodos se fabricaron en oro. Por el otro lado, la implementación de películas de óxido de iridio (IrOx) sobre electrodos ha demostrado ser una buena opción para la detección potenciométrica del pH (Prats-Alfonso et al. 2013; Cruz et al. 2012). Estos electrodos, utilizados para el desarrollo de microsensores (Lee et al. 2011), se implementaron en la segunda MEA. Por este motivo, la MEA se fabricó utilizando platino, que ofrece una mejor adhesión para la película de IrOx a electrodepositar (Prats-Alfonso et al. 2013).

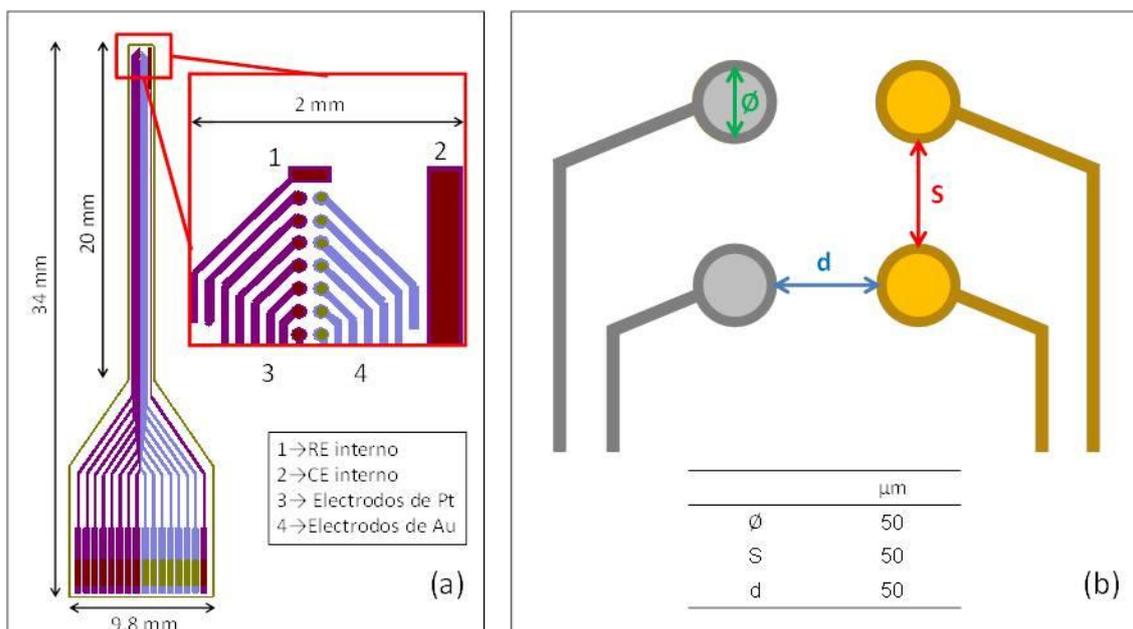


Figura 9.1. (a) Diagrama del diseño del microsensor, formado por dos MEA de 7 electrodos circulares (50 μm de diámetros) fabricados en oro y platino, un RE interno y un CE interno. (b) Detalle de la disposición de las dos matrices de electrodos en la que se especifican el diámetro de los electrodos, la distancia entre electrodos y la distancia entre las dos MEA.

Las reducidas dimensiones de las biopelículas (entre centenares de micras y pocos milímetros) y de los sistemas experimentales en los que crecen, impide generalmente la

utilización de electrodos de referencia y electrodos auxiliares externos. Por este motivo, el diseño del nuevo microsensor, específico para la monitorización de biopelículas, integró un sistema de referencia. Para ello se incluyó un electrodo de platino rectangular (150 μm x 50 μm) junto a las dos MEA, diseñado como electrodo de pseudo-referencia, y un electrodo de platino rectangular (2400 μm x 114 μm) en paralelo a las MEA, diseñado como electrodo auxiliar (CE).

Tal y como se observa en la Figura 9.1a, el diseño de las agujas se modificó para sustituir el encapsulado convencional (unión por hilo de oro a una PCB) por un sistema de conexión rápida (*zero insertion force* (ZIF)), que redujo el tiempo y el coste de la fabricación. Para ello, las dimensiones de la aguja (Figura 9.1a) se modificaron incrementando su longitud para facilitar su inserción en los sistemas a monitorizar, y aumentando el tamaño de los conectores para el sistema ZIF. Estas modificaciones en el diseño del microsensor aumentan sus dimensiones y, por lo tanto, reducen el número de dispositivos incluidos en una oblea hasta 22.

9.2.1.2. Fabricación del microsensor MEMS multi-analito

El microsensor multi-analito diseñado se fabricó en las instalaciones de sala blanca del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, España), siguiendo procedimientos fotolitográficos estándar, descritos en detalle en la sección 4.3.

El microsensor se fabricó utilizando como sustrato una fina capa (125 μm) de Kapton (500 HN, Dupont, Luxemburgo), un polímero flexible que minimiza el daño causado sobre los sistemas biológicos durante su monitorización. Los electrodos de platino y de oro se definieron utilizando procedimientos de grabado indirecto (*lift-off*). Para ello, se depositó una fotoresina positiva sobre el sustrato de la oblea (etapa 2 de la Figura 9.2a), y utilizando técnicas fotolitográficas se definieron las geometrías necesarias para la fabricación de los dispositivos (etapa 3 de la Figura 9.2a). A continuación, utilizando un procedimiento de evaporación metálica (*e-beam metal evaporation*), se depositaron sobre toda la superficie de la oblea una capa de 20 nm del metal deseado (Pt o Au), utilizando una capa intermedia de 200 nm de Ti para mejorar su adhesión (etapa 4 de la Figura 9.2a). Después de esto, la oblea se sumergió en un baño de acetona para eliminar la resina, y los metales depositados sobre ella, de las zonas no deseadas. Este procedimiento se repitió dos veces para depositar, en primer lugar la capa de Pt que define los sensores de pH y a continuación la capa de Au que define los sensores de

OD. Por último, se depositó una capa de una resina fotocurable (SU-8) ($1.9 \mu\text{m}$) utilizando un procedimiento de centrifugación (etapa 5 de la Figura 9.2a). La superficie activa de los electrodos y los conectores se definieron sobre el SU-8 utilizando un último procedimiento fotolitográfico (etapa 6 de la Figura 9.2a).

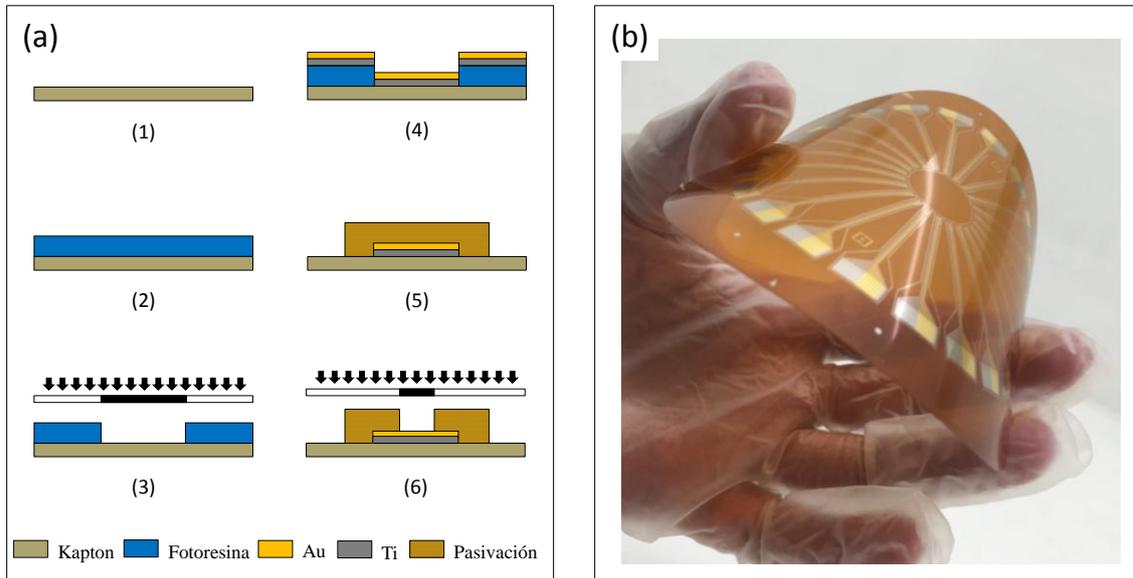


Figura 9.2. (a)Etapas del proceso de microfabricación del microsensor multi-analito: (1) preparación del sustrato, (2) y (3) preparación de la resina positiva, (4) deposición de las capas de metales, (5) deposición del material pasivante y (6) delimitación de las superficies activas con el material pasivante. (b) Imagen de una oblea preparada siguiendo el proceso de microfabricación, donde es posible observar su flexibilidad.

Después de la microfabricación de los sensores sobre la oblea, el proceso de fabricación se finalizó cortando la oblea (Figura 9.3a) para obtener los sensores individuales. Los sensores individuales se limpiaron y activaron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.2.2. A continuación, se conectaron a un dispositivo formado por una tira de PCB y un conector rápido ZIF (Figura 9.3b).

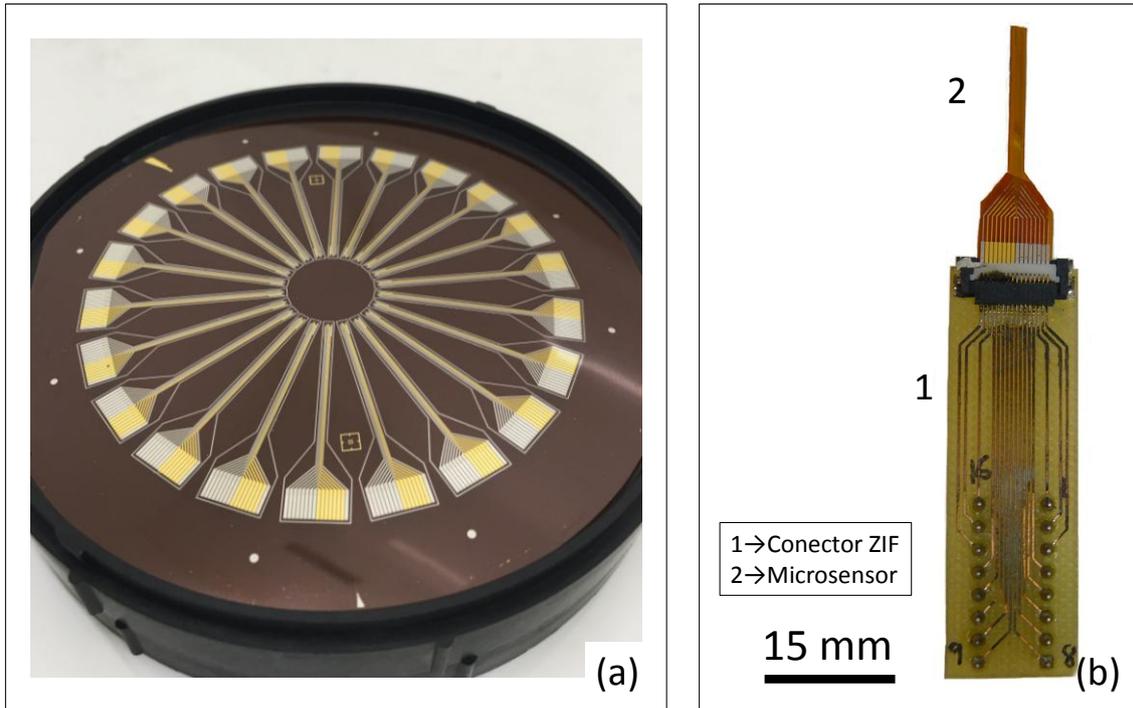


Figura 9.3. (a) Oblea microfabricada donde se observan los 22 sensores individuales obtenidos en cada una. (b) Sensor individualizado instalado en el conector ZIF (2).

9.2.1.3. Preparación de los electrodos de platino para la detección de pH

Los microsensores fabricados fueron modificados para realizar medidas de pH. Para ello los electrodos de platino se revistieron después de su activación con una capa de IrOx ($K_{1.7} Ir_{1.1} (OH)_{2.7} \cdot 0.5 H_2O$). El método electroquímico utilizado para depositar el IrOx, basado en un barrido de potencial dinámico (Cruz et al. 2012), permite obtener películas delgadas (300 nm) de IrOx sobre electrodos de platino. La solución utilizada para la electrodeposición del IrOx se preparó a partir de 1 mM de $IrCl_3 \cdot H_2O$, 1mM de $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ y 5mM de K_2CO_3 . La solución final, se mantuvo a una temperatura de 37°C durante 4 días y se almacenó posteriormente a una temperatura de 4°C. La electrodeposición del IrOx se realizó en una celda de 3 electrodos, utilizando un CE de platino (MC3051Pt, Radiometer analytical, Francia), un RE de Ag/AgCl (REF321, Radiometer analytical, Francia), y los 7 electrodos circulares de Pt como WE. El procedimiento fue controlado con un potenciostato de 8 canales (1010C, CH-Instruments, USA). Las películas de IrOx se obtuvieron aplicando un protocolo potenciométrico (Prats-Alfonso et al. 2013), que consiste en 50 barridos lineales de potencial, con una velocidad de $10 mV \cdot s^{-1}$, entre el potencial de circuito abierto (0.00 V) y 0.65 V (vs. Ag/AgCl). Los WE y el CE se dispusieron en paralelo manteniendo la misma distancia entre el CE y todos los electrodos de platino, asegurando la

reproducibilidad en el recubrimiento de todos los electrodos. Las agujas modificadas se almacenaron en una solución de KCl (3 M) para evitar problemas de electromigración de los cationes de potasio del recubrimiento, que puede modificar la respuesta del microsensor.

9.2.1.4. Protección de los electrodos

La fabricación de los microsensors incluyó una membrana de intercambio protónico (Nafion) para proteger los electrodos de su desactivación (pasivación de la superficie y deposición de impurezas sobre los electrodos), e incrementar la estabilidad de su respuesta. La protección de la aguja se llevó a cabo depositando una fina membrana de Nafion (ácido perfluorosulfónico) sobre los electrodos. El recubrimiento se realizó sumergiendo las agujas en una solución de Nafion en etanol (Nafion 117 solution, Sigma Aldrich, Alemania) durante 30 segundos. La posición de la aguja se controló con la ayuda de un micromanipulador (MM3-2, Unisense, Dinamarca), para evitar la deposición de la membrana en la zona de la aguja correspondiente a los conectores. La película protectora se consolidó manteniendo la aguja en posición horizontal durante 24 horas para asegurar la evaporación del etanol. El grosor de la membrana resultante se estudió sumergiendo la aguja repetidas veces (hasta 4 veces) en la solución Nafion y caracterizando su superficie en un perfilómetro (KLA-Tencor profilemeter, KLA-Tencor, USA). Finalmente, las membranas se hidrataron sumergiendo las agujas en agua destilada durante 1 hora. Después de la hidratación, las agujas protegidas se almacenaron en una solución salina (KCl 3 M), para evitar la deshidratación de las membranas que podría ocasionar su agrietamiento y deterioro.

9.2.2. Monitorización del OD y pH utilizando el microsensor MEMS multi-analito

La monitorización del OD sobre los electrodos de oro del microsensor MEMS se realizó siguiendo el procedimiento descrito en detalle en la sección 5.2.3. En este sentido, el OD se midió simultáneamente sobre los 7 electrodos de oro utilizando el potenciostato de 8 canales (1010C, CH-Instruments, USA) y una celda convencional de 3 electrodos (Figura 9.4a).

La detección del oxígeno se llevó a cabo utilizando indistintamente el sistema de referencia (RE y CE) integrado en el microsensor (sección 9.2.1.1), y un sistema de

referencia formado por un RE y un CE externos. La calibración del microsensor se realizó siguiendo el procedimiento presentado en la sección 5.2.4. El pH fue monitorizado sobre los electrodos de platino recubiertos con una película de IrOx, midiendo la desviación del potencial de circuito abierto de estos electrodos en función del pH en el medio. La medida potenciométrica del pH se realizó utilizando el potencióstato y una celda de electroquímica de dos electrodos (Figura 9.4b) para adquirir el potencial de circuito abierto entre los electrodos de IrOx y un RE externo (REF321, Radiometer analytical, Francia) sumergidos en una solución acuosa.

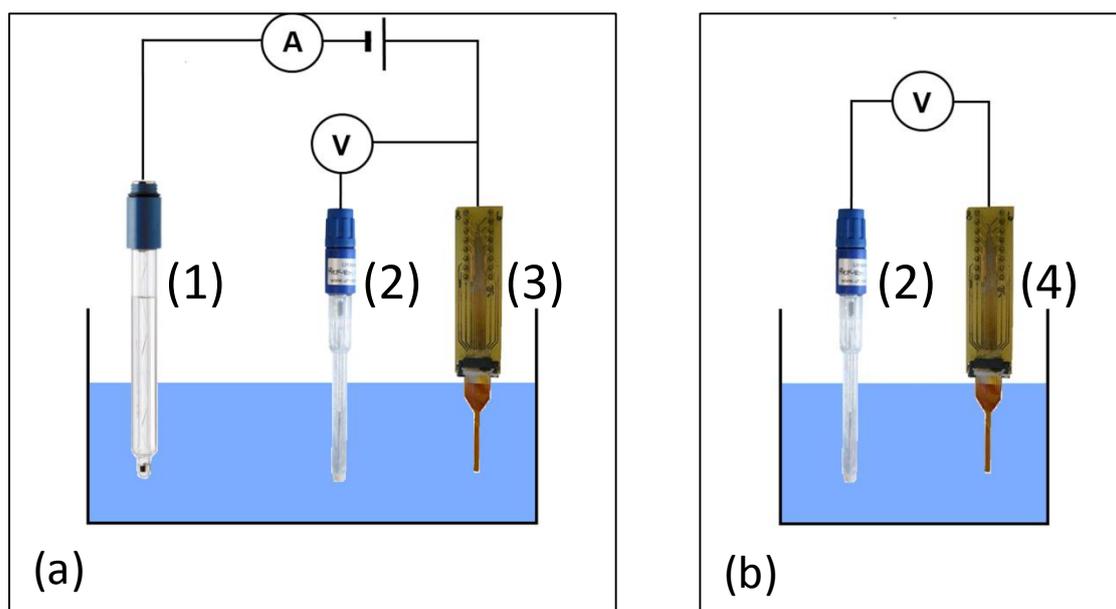


Figura 9.4. Detalle de la celda electroquímica para la detección del OD utilizando el microsensor MEMS, formada por un CE (1), un RE (2) y los electrodos de oro del microsensor (3). (b) Detalle de la celda electroquímica para la detección del pH utilizando el microsensor MEMS, formada por un RE (2) y los electrodos recubiertos de IrOx del microsensor MEMS (4).

A diferencia de la medida de OD, el pH se monitorizó secuencialmente ya que el potencióstato no permite realizar simultáneamente diferentes medidas potenciométricas. Sin embargo, los perfiles de pH se adquirieron asegurando que el tiempo entre la medida de pH (con los diferentes electrodos) era inferior a 5 s. La calibración de los electrodos de IrOx para la detección del pH se llevó a cabo correlacionando la respuesta de los electrodos, en términos de potencial de circuito abierto, con el pH de diferentes soluciones tampón de pH 4.01, 7.00 y 9.21 (pH buffers, Crison, España).

9.2.3. Caracterización y validación del microsensor MEMS multi-analito

La caracterización del microsensor MEMS multi-analito consistió en el estudio de su funcionamiento como sensor para la medida simultánea de OD y pH. Para ello, se comprobó la respuesta amperométrica de los WE circulares de oro en el rango típico de

concentración de oxígeno en fase acuosa (entre 0 y 8 mg·L⁻¹), y la respuesta potenciométrica de los electrodos recubiertos de IrOx en soluciones con diferentes valores de pH (4.01, 7.00 y 9.21).

La calibración de los electrodos de oro para la detección del OD se realizó en una solución de KNO₃ (0.1 M), utilizando un sistema de referencia externo formado por electrodos comerciales. Los electrodos recubiertos de IrOx se calibraron para la detección del pH sumergiendo el microsensor y el RE externo en diferentes soluciones tampón y midiendo el potencial de circuito abierto entre los electrodos de IrOx y el RE en cada caso. A partir del análisis de los diagramas de calibrado se determinó la linealidad y la sensibilidad de la respuesta del microsensor para la detección del OD y del pH. El procedimiento de calibración también se utilizó para evaluar el efecto de la protección sobre la respuesta del microsensor. La caracterización del microsensor se completó determinando los límites de detección y cuantificación para el OD y el pH, a partir de la Ecuación 5.2 y la Ecuación 5.3.

La validación del microsensor para la monitorización de biopelículas se dividió en dos etapas. En primer lugar se analizó su funcionamiento para la obtención de perfiles de OD y pH en el interior de una biopelícula sulfuroxidante, utilizando como patrón los perfiles adquiridos con un microsensor comercial de OD (OXI-25, Unisense, Dinamarca) y pH (PH-25, Unisense, Dinamarca). Los perfiles se adquirieron, utilizando los diferentes microsensores, directamente sobre la biopelícula cultivada en el BPP-FG a través del tercer puerto de muestreo (descrito en la sección 4.1.2.2). La idéntica posición sobre la biopelícula de los diferentes perfiles se aseguró utilizando el micromanipulador para posicionar los microsensores. La medida obtenida con el microsensor MEMS da lugar a un perfil de 7 puntos, separados por 50 μm, en el interior de la biopelícula, dando lugar a un perfil de 350 μm de profundidad. Los perfiles de OD y pH completos se obtuvieron en dos pasos consecutivos moviendo el sensor a lo largo de la biopelícula con la ayuda del micromanipulador.

En una segunda etapa, la validación se completó evaluando las mejoras en el diseño y la microfabricación del microsensor (protección de los electrodos y reducción del grosor del sensor) para la monitorización de la biopelícula sulfuroxidante a lo largo del tiempo. La respuesta del microsensor se evaluó monitorizando el efecto en el interior de la biopelícula de cambios en la carga de H₂S alimentada en el reactor. La concentración

de OD y el pH en la biopelícula se midió insertando el microsensor en el BPP-FG a través del tercer puerto de muestreo (a 8 cm de la entrada del reactor).

9.2.4. Bioreactor de placa plana en fase gas

La biopelícula sulfuroxidante utilizada en la validación del microsensor MEMS multi-analito se cultivó en un BPP-FG. El diseño y puesta en marcha del bioreactor se detallan en la sección 4.1.2.2. El sistema experimental utilizado en la monitorización del reactor se describe en detalle en la sección 8.2.1.2.

La operación del reactor, durante la obtención de los perfiles de OD y pH utilizando los sensores comerciales y el microsensor MEMS, se llevó a cabo reproduciendo las condiciones de operación de un biofiltro percolador, detalladas en la Tabla 9.1.

Tabla 9.1. Variables de operación del bioreactor de placa plana en fase gas.

Variable de operación	Valor de la variable
<i>Tiempo de residencia de la fase gas (TRG) [s]</i>	6 - 56
<i>Tiempo de residencia hidráulico (TRL) [h]</i>	6
<i>Velocidad de recirculación (v_L) [$m \cdot h^{-1}$]</i>	3.4
<i>Carga alimentada [$g H_2S \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$]</i>	6 - 60

Los experimentos para la validación del microsensor se llevaron a cabo operando el reactor con un TRL y una v_L constantes. La carga de H_2S alimentada en el reactor se aumentó (desde $6 g \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$ hasta $60 g \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$), reduciendo el tiempo de residencia de la fase gas, desde 56 s a 6 s, y manteniendo una concentración de H_2S alimentada de 130 ± 20 ppm_v. Los cambios en la concentración de OD y el pH en el interior de la biopelícula, provocados por el aumento de la carga alimentada, se monitorizaron utilizando el CE integrado en el microsensor y un RE externo (Ag/AgCl), sumergido en la fase líquida a través del segundo puerto de muestreo.

9.3. RESULTADOS

9.3.1. Caracterización del microsensar MEMS multi-analito

La viabilidad del microsensar MEMS multi-analito para la monitorización del OD y el pH se comprobó caracterizando el funcionamiento del microsensar después de las modificaciones introducidas en su diseño y microfabricación.

9.3.1.1. Crecimiento de la capa de IrOx para la detección de pH

Los electrodos de Pt del microsensar MEMS se recubrieron con una película de IrOx para realizar medidas potenciométricas de pH. Los resultados de la síntesis electroquímica de la película de IrOx sobre los electrodos de Pt, en la Figura 9.5, muestran como el corriente medido sobre un electrodo de Pt aumenta después de cada ciclo de potencial. Este comportamiento se debe a un incremento en la superficie útil de los electrodos provocado por la deposición de una capa de IrOx.

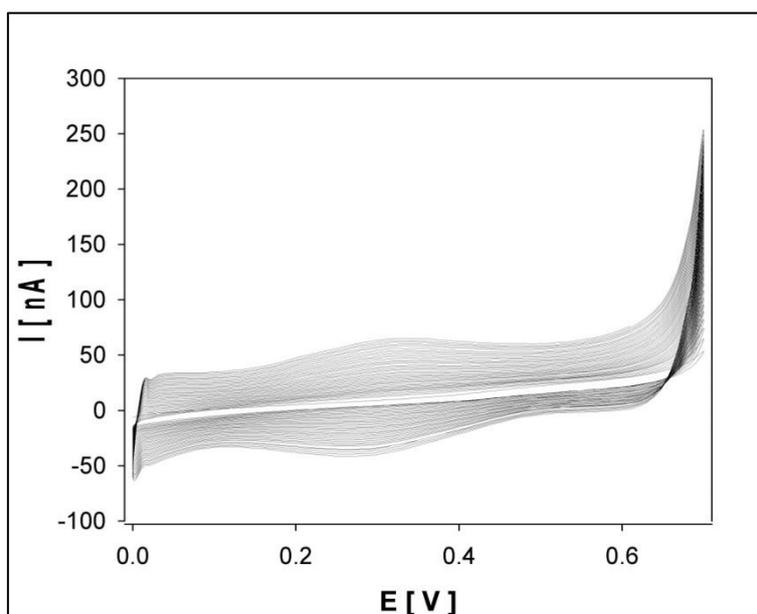


Figura 9.5. Síntesis electroquímica del IrOx sobre un electrodo circular de Pt (50 μm de diámetro) mediante voltametría cíclica (0V a 0.7 V, 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ y 75 ciclos).

El valor de densidad de corriente (medido en el pico de oxidación) después del último barrido ($25.46 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$) es comparable al observado en los electrodos de IrOx preparados siguiendo el mismo procedimiento de electrodeposición (Cruz et al. 2012). Esta similitud demuestra que las características morfológicas (área superficial de la película de IrOx) de los electrodos preparados en este trabajo son comparables a los presentados en Cruz et al. (2012).

Las características morfológicas de las películas de IrOx electrodepositadas se analizaron, con la ayuda de un microscopio óptico, para confirmar que la película formada presentaba las características necesarias para la monitorización del pH. Los resultados obtenidos en la inspección óptica de los electrodos de IrOx se presentan en la Figura 9.6.

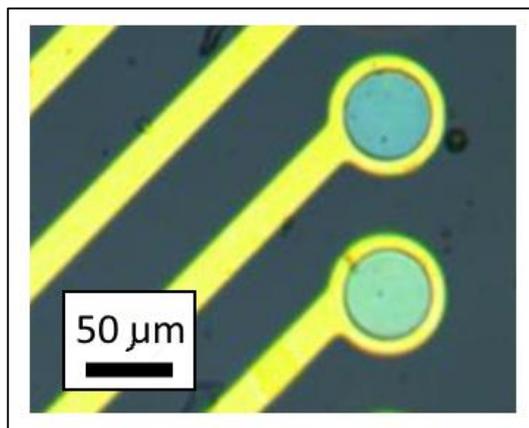


Figura 9.6. Imagen, obtenida en un microscopio óptico, de dos electrodos de Pt (50 µm de diámetro) recubiertos con una película de IrOx, utilizados para la detección potenciométrica del pH.

Los resultados de la inspección óptica (Figura 9.6) muestran como los electrodos recubiertos de la película de IrOx presentan una tonalidad azulada. Este cambio en la tonalidad de los electrodos (inicialmente plateada) indica el recubrimiento del platino con una película de IrOx (Cruz et al. 2012). Se observa como el IrOx recubre la totalidad de la superficie de los electrodos, demostrando la homogeneidad de la electrodeposición. El análisis de la película de IrOx electrodepositada se finalizó analizando la morfología de los electrodos de IrOx (rugosidad de la superficie), midiendo el cambio en la capacidad de carga de los electrodos antes y después de la electrodeposición. Las películas de IrOx electrodepositadas presentan una estructura rugosa que incrementa la superficie útil de los electrodos. Este cambio en las características superficiales puede evaluarse fácilmente a partir de la medida de su capacidad de carga. De este modo, el análisis de la capacidad de carga de los electrodos permite evaluar la estructura de la superficie de los electrodos de IrOx. La capacidad de carga de los electrodos se analizó a partir de una voltamperometría cíclica de los electrodos en una solución de fosfato tamponada (PBS) (PBS tablets, Sigma Aldrich, Alemania). En la Figura 9.7 se muestran los resultados de la voltametría cíclica de los electrodos de Pt y IrOx, entre -0.5 V y 0.5 V y con una velocidad de barrido de $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

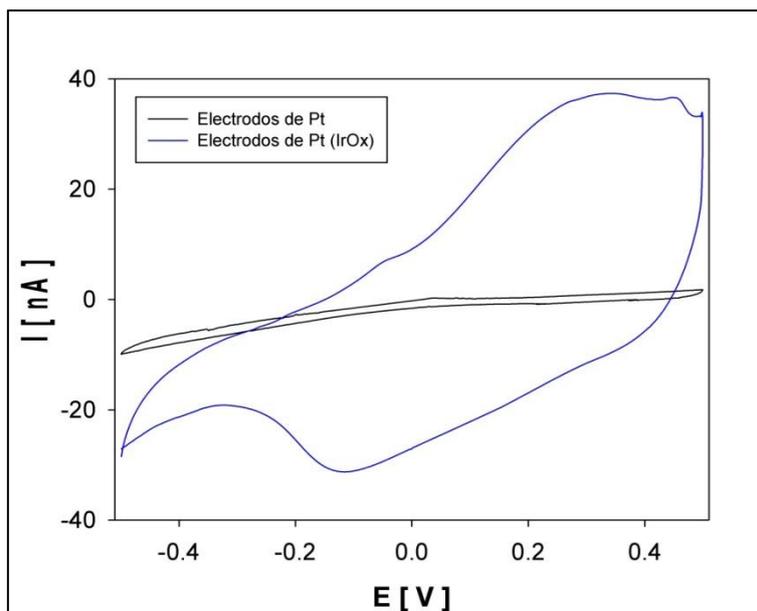


Figura 9.7. Voltametría cíclica en una solución de PBS de un electrodo de Pt y un electrodo de Pt recubierto con una película de IrOx. La superficie de las curvas define la capacidad de los electrodos.

La capacidad de carga de los electrodos se determinó evaluando la superficie de los voltamperogramas. Los resultados de la Figura 9.7 muestran como la deposición de la película de IrOx incrementa la capacidad de los electrodos (desde 1.43 nA·V hasta 30.96 nA·V). Este incremento demuestra que la estructura de la superficie de los electrodos de IrOx obtenidos es altamente rugosa. Teniendo en cuenta que el efecto del pH sobre el potencial de los electrodos está provocado por los cationes H^+ en los intersticios de la estructura de IrOx, una rugosidad elevada provoca el incremento de la sensibilidad de estos electrodos para la detección del pH. Por lo tanto, estos resultados indican que las características de los electrodos preparados son adecuadas para la monitorización potenciométrica del pH.

9.3.1.2. Calibración del microsensor MEMS para la detección del OD y pH

El funcionamiento del microsensor MEMS multi-analito para la monitorización del OD y el pH fue caracterizado mediante la calibración de los electrodos de Au y de IrOx.

La respuesta amperométrica de los electrodos de Au se calibró siguiendo el procedimiento presentado en la sección 5.3.2.2. En este sentido, la MEA de oro se calibró en una solución de KNO_3 (0.1 M) utilizando un RE y un CE externos. El potencial utilizado para la polarización de los electrodos se seleccionó de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio del potencial óptimo para la monitorización del OD (realizado en el capítulo 5), presentados en la Tabla 5.3. La reducción del oxígeno

sobre la superficie de los electrodos se forzó aplicando un potencial de -0.85 V (vs Ag/AgCl) entre los WE y el RE. La respuesta del microsensor en el rango entre 0 y 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se presenta en la Figura 9.8a.

Los electrodos de Pt recubiertos con IrOx también fueron calibrados para caracterizar su respuesta potenciométrica respecto al pH. Para ello, se midió el potencial de circuito abierto entre los 7 electrodos de la MEA y un RE de Ag/AgCl en tres soluciones tampón de pH 4.01, 7.00 y 9.21. La respuesta de los electrodos de IrOx en el rango de pH estudiado se muestra en la Figura 9.8b.

Las rectas de calibrado presentadas en la Figura 9.8 muestran una respuesta lineal del microsensor MEMS multi-analito para la detección del OD, entre 0 y 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y para la detección del pH, en el rango de pH entre 4.01 y 9.21. La excelente linealidad observada de la respuesta de las dos MEA se confirmó por los coeficientes de correlación (r^2), 0.998 para el OD y 0.997 para el pH.

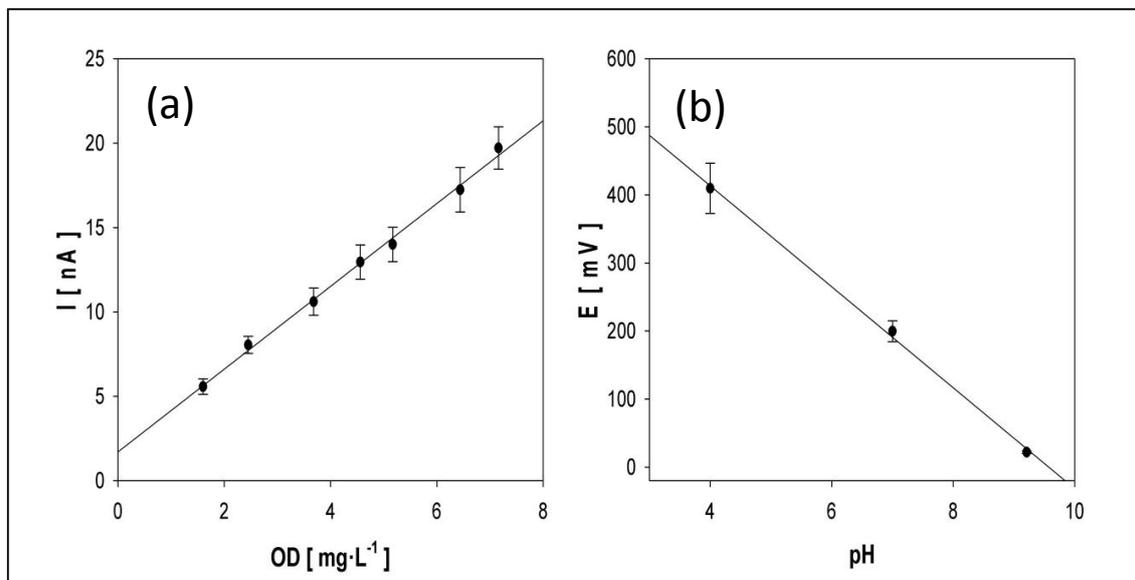


Figura 9.8. (a) Calibración de los 7 electrodos de Au (50 μm de diámetro) para la detección de OD. (b) Calibración de los 7 electrodos de Pt (IrOx) (50 μm de diámetro) para la detección del pH. Los puntos y las barras de error corresponden a la media y la desviación estándar de las medidas.

A partir del análisis de las rectas de calibrado se determinó la sensibilidad del microsensor MEMS para la detección del OD y el pH. La MEA de oro presentó una sensibilidad para la detección del OD de 2.06 ± 0.08 $\text{nA}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$. Este valor es ligeramente inferior al presentado por el microsensor MEMS de OD en el capítulo 5 (2.41 ± 0.08 $\text{nA}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$). Sin embargo, se observa como la diferencia de corriente entre dos concentraciones consecutivas es superior al error de la medida (barras de error).

Esta tendencia demuestra que la sensibilidad es adecuada para monitorizar el OD en el rango estudiado.

La sensibilidad de los electrodos de IrOx para la detección del pH (-74.2 ± 0.7 mV·pH⁻¹) mostró un comportamiento sobre-Nernstiano. Este comportamiento está provocado por el efecto de otros cationes (diferentes al catión H⁺) sobre la respuesta potenciométrica de los electrodos de IrOx (Prats-Alfonso et al. 2013). El análisis de la sensibilidad, siguiendo el criterio descrito anteriormente para los electrodos de Au, revela que la sensibilidad que presenta el microsenssor es adecuada para la detección del pH. Además, el valor de sensibilidad observado es comparable al reportado en otros sensores de IrOx para la detección del pH (entre -63.5 mV·pH⁻¹ y -77.6 mV·pH⁻¹) (Prats-Alfonso et al. 2013; Ges et al. 2005; Marzouk et al. 1998).

9.3.1.3. Protección de los electrodos en la respuesta del microsenssor MEMS

El microsenssor MEMS multi-analito se protegió con el objetivo de evitar la deposición de impurezas y la pasivación de los electrodos, aumentando así la estabilidad de su respuesta. Para ello, la aguja microfabricada se recubrió con una fina película de Nafion. Las membranas de Nafion (membrana de intercambio protónico) han sido utilizadas satisfactoriamente para evitar la desactivación de electrodos en contacto directo con biopelículas (Del Campo et al. 2007).

La deposición de membranas de Nafion sobre electrodos se ha realizado típicamente utilizando un procedimiento de centrifugación. Sin embargo, este procedimiento no permite realizar una protección selectiva de los dispositivos. Por este motivo, en este trabajo se estudió un procedimiento alternativo (sección 9.2.1.4). Teniendo en cuenta que, hasta donde llega nuestro conocimiento, es la primera vez que este procedimiento es utilizado para proteger electrodos, las características de la membrana fueron analizadas midiendo su espesor en función de las capas de Nafion depositadas. La topología de las agujas con 1, 2, 3 y 4 capas de se caracterizó a partir de su estudio perfilométrico. Los perfiles de la superficie de los electrodos se iniciaron desde la zona no protegida, avanzando hasta llegar a la zona protegida por la membrana de Nafion. Los resultados de los análisis perfilométricos se presentan en la Figura 9.9.

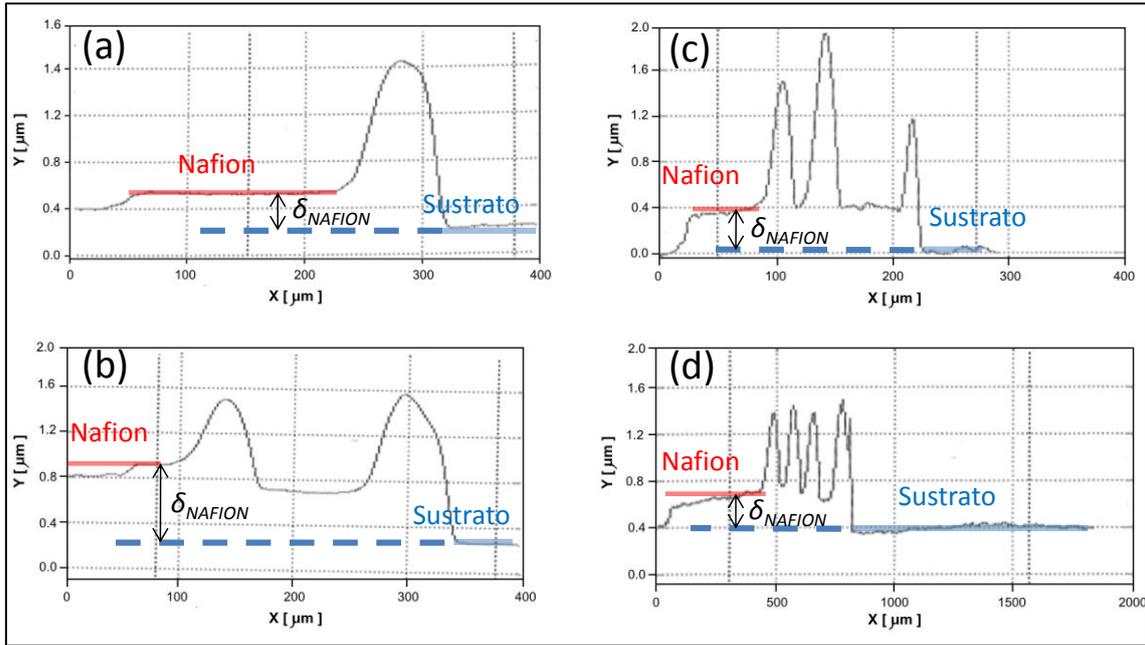


Figura 9.9. Resultados del análisis perfilométrico de la aguja recubierta con 1 (a), 2 (b), 3 (c) y 4 (d) capas de Nafion. En azul se muestra la profundidad correspondiente a superficie del sustrato y en rojo se muestra la profundidad correspondiente a la superficie de la membrana de Nafion resultante.

El análisis de los resultados obtenidos en estos análisis, en la Figura 9.9, se utilizó para definir el número óptimo de capas de Nafion necesarias para proteger los electrodos. Para interpretar estos resultados es necesario definir los elementos que se observan en los perfiles. Por un lado, la profundidad de la membrana de Nafion sobre la aguja se destaca en rojo sobre los diferentes perfiles. Por el otro lado, la profundidad del sustrato (aguja no protegida) se muestra en azul. Las irregularidades observadas en todos los perfiles entre estas dos profundidades están provocadas por una rebaba formada por el menisco entre la solución y la aguja durante su inmersión. De este modo, el número de irregularidades observadas en cada perfil corresponde al número de capas de Nafion depositadas. A partir del análisis de estos resultados se cuantificó el espesor de la membrana de Nafion depositada en cada caso, en la Tabla 9.2.

Tabla 9.2. Espesor de la membrana de Nafion depositada, en función del número de capas de Nafion depositadas, determinada a partir del análisis de los resultados del estudio perfilométrico.

Nº de capas de Nafion depositadas	Espesor de la membrana de Nafion [nm]
1	275
2	665
3	170
4	225

Los resultados de la Tabla 9.2 no presentan una relación clara entre el espesor de la membrana y el número de capas de Nafion depositadas, observando un espesor

similar en las membranas formadas depositando 1, 3 y 4 capas de Nafion. El valor, considerablemente más elevado, de la membrana obtenida a partir de 2 capas de Nafion se debe con toda probabilidad a un error en el análisis perfilométrico. Por lo tanto, la deposición de varias capas de Nafion no mejora las características de la membrana protectora. De este modo, teniendo en cuenta que la deposición de diferentes capas no aumenta el grosor de la membrana, se puede concluir que el método óptimo para proteger los electrodos del microsensor MEMS consiste en la deposición de una capa de Nafion.

Una vez depositadas, las membranas de Nafion fueron hidratadas sumergiéndolas durante 60 minutos en una solución acuosa (KCl 3 M). El espesor de la membrana de Nafion presentados en la Tabla 9.2 corresponde a membranas deshidratadas. En este sentido, el espesor final de la membrana de Nafion (después de su hidratación) es superior al observado en los análisis. El espesor final de las membranas no fue cuantificado debido a la necesidad de mantener las membranas hidratadas en condiciones de humedad. Sin embargo, en Del Campo et al. (2007) definen un incremento del 50 % en volumen del Nafion después de su hidratación. De este modo, el espesor de las membranas de Nafion obtenidas en este estudio es comparable al presentado por sensores similares (Del Campo et al. 2007), donde los autores cuantificaron el espesor final de la membrana en 450 nm.

9.3.1.4. Efecto de la protección de los electrodos en la respuesta del microsensor MEMS

La deposición de la membrana de Nafion protege los electrodos de su desactivación. Sin embargo, introduce una resistencia al transporte de materia de los analitos hacia la superficie de los electrodos (barrera difusional) (Del Campo et al. 2007), que modifica la respuesta del microsensor para la detección del OD y pH. El efecto de la membrana protectora sobre la respuesta del microsensor se cuantificó caracterizando de nuevo el funcionamiento del microsensor después de su protección. Los sensores fueron calibrados siguiendo el procedimiento utilizado para su calibración inicial. En la Figura 9.10 se presentan los resultados de la calibración del microsensor, para la detección del OD y el pH, antes y después de su protección.

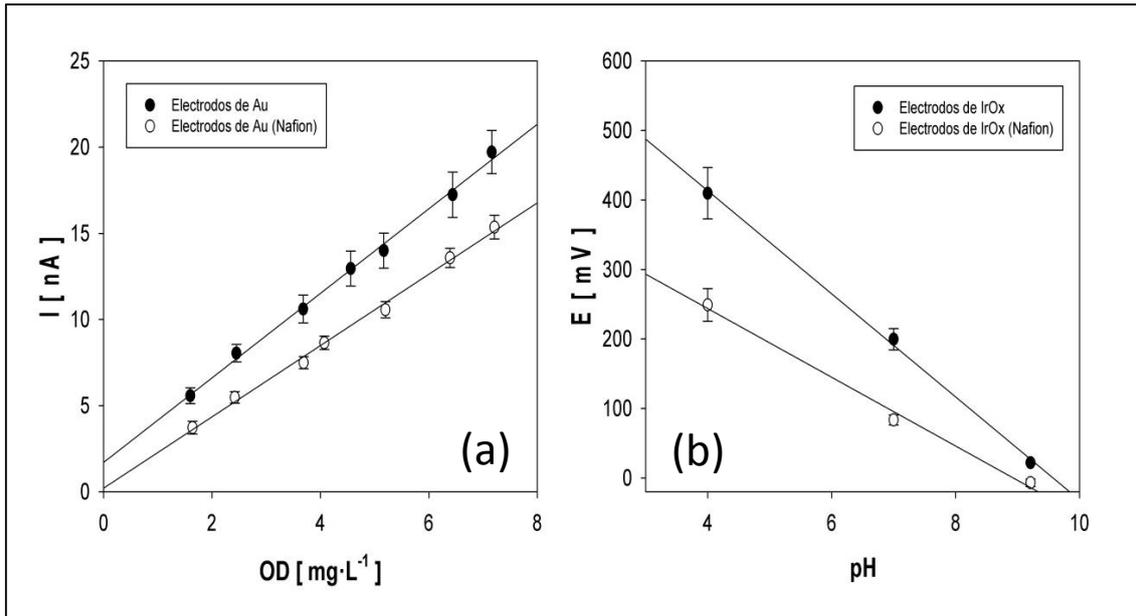


Figura 9.10. Calibración del microsensor MEMS multi-analito para la detección del OD (a) y el pH (b), antes y después de la protección de los electrodos utilizando una membrana de Nafion.

Los resultados presentados en la Figura 9.10 revelan que la presencia de la membrana de Nafion no modifica la linealidad de la respuesta del microsensor para la detección del OD y el pH. Sin embargo, la protección de los electrodos provoca una pérdida de sensibilidad en la detección de los dos analitos, tal y como se observa en la disminución del pendiente de las dos rectas de calibrado (en la Figura 9.10). Los electrodos de Au protegidos con la membrana de Nafion presentan una sensibilidad para la detección del OD de $1.73 \pm 0.12 \text{ nA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$, que corresponde a una disminución del 16% respecto a la sensibilidad inicial. Esta pérdida de sensibilidad es comparable a la observada en sensores de OD similares protegidos con una membrana de Nafion. En del Campo et al. (2007) estiman la pérdida de sensibilidad para la detección del OD, provocada por la presencia de una membrana de Nafion (300 nm de espesor), en el 26% de su sensibilidad inicial. Los electrodos de IrOx protegidos presentaron una sensibilidad para la detección del pH de $-60.5 \pm 0.6 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$. Este valor corresponde a una disminución del 18% de su sensibilidad inicial, comparable a la pérdida de sensibilidad observada en los electrodos de Au.

La pérdida de sensibilidad observada para la detección de las dos especies confirma que la presencia de una membrana protectora introduce una barrera difusional para los dos analitos que disminuye sensiblemente las sensibilidades del microsensor. Sin embargo, los valores de sensibilidad que presenta el microsensor después de su

protección es suficiente elevada para una correcta monitorización de las dos especies, y la protección de los electrodos aumenta además la estabilidad de su respuesta.

La caracterización de la respuesta del microsensor MEMS después de su protección se completó determinando los límites de detección (L_D) y cuantificación (L_Q) para la monitorización del OD y pH. Los resultados del estudio se presentan en la Tabla 9.3.

Tabla 9.3. Límites de detección (L_D) y cuantificación (L_Q) del microsensor MEMS multi-analito para la detección del OD y el pH.

	L_D	L_Q
Detección del OD [mg·L⁻¹]	0.05±0.01	0.17±0.02
Detección del pH [unidades de pH]	0.05	0.08

El valor de los límites de detección y cuantificación para la detección del OD y el pH (en la Tabla 9.3) son comparables a los presentados por electrodos descubiertos. En el capítulo 5, los electrodos de oro circulares (50 μm de diámetro) descubiertos presentaron unos límites de detección y cuantificación de $0.04\pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.015\pm 0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Comparando estos valores con los presentados en la Tabla 9.3 se observa como la protección de los electrodos no modifica la capacidad del microsensor para detectar y cuantificar el OD. Respecto a los límites de detección y cuantificación para la monitorización del pH, en Prats-Alfonso et al. (2013) presentan unos electrodos de IrOx descubiertos, con unas dimensiones similares a los del trabajo actual, en los que determinan unos límites de detección y cuantificación de 0.01 y 0.03 unidades de pH respectivamente. Tal y como se observó para el oxígeno, la protección de los electrodos de IrOx no altera la capacidad del microsensor para detectar y cuantificar el pH. Estos resultados confirman el correcto funcionamiento del microsensor para la monitorización de las dos especies después de su protección.

9.3.1.5. Estabilidad de la respuesta del microsensor a largo plazo

La capacidad de la membrana de Nafion depositada sobre los electrodos para evitar su desactivación fue evaluada. Para ello la sensibilidad de las dos MEA para la detección del OD y el pH fue monitorizada a lo largo de 1000 h (Tabla 9.4). La sensibilidad se estimó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 9.2.3. Durante este tiempo el microsensor se almacenó a temperatura ambiente (entre 20 y 25°C) y se sumergió en una solución acuosa (KCl 3M) para prevenir la deshidratación del Nafion y la electromigración de cationes de potasio hacia la solución en la que se almacenan. Los

valores de sensibilidad se compararon con la sensibilidad inicial (0 h) para estimar la estabilidad a largo plazo de la respuesta del microsensor.

Tabla 9.4. Evolución de las sensibilidades para la detección del OD y del pH de una aguja protegida con una membrana de Nafion. Los valores de sensibilidad de esta aguja descubierta también se incluyen. El tiempo corresponde a las horas a partir de la calibración de la aguja descubierta, inmediatamente anterior a su protección.

	Sensibilidad para la detección del OD [nA·mg ⁻¹ ·L]	Sensibilidad para la detección del pH [mV·pH ⁻¹]
Aguja desprotegida	2.06 ± 0.08	-74.2 ± 0.7
0 h	1.73 ± 0.12	-60.5 ± 0.6
150 h	1.78 ± 0.14	-67.7 ± 0.6
Aguja protegida		
300 h	1.62 ± 0.08	-62.6 ± 0.6
850 h	1.64 ± 0.16	-63.5 ± 0.6
1000 h	1.67 ± 0.17	-62.9 ± 0.6

Los resultados de la Tabla 9.4 muestran una pequeña diferencia entre el comportamiento de las dos MEA. En este sentido, los electrodos de oro presentan una ligera disminución de su sensibilidad a lo largo de la monitorización (alrededor del 3% después de 6 semanas) mientras que los electrodos de IrOx presentan una sensibilidad constante durante el mismo periodo. Esta ligera diferencia se explica por la naturaleza de la membrana y del material de las dos MEA. La membrana de Nafion, de intercambio protónico, permite el contacto de sustancias oxidantes (principalmente protones del medio) sobre la superficie de los electrodos, provocando una ligera pasivación de éstos a lo largo del tiempo (del Campo et al. 2007). Este fenómeno provoca una disminución de la sensibilidad de los electrodos de oro, mientras que no afecta a la sensibilidad de los electrodos de IrOx. Por lo tanto, a partir de estos resultados podemos concluir que la membrana de Nafion es ligeramente más eficiente para combatir la desactivación de los electrodos provocada por la deposición de impurezas sobre la superficie de los electrodos que la provocada por la pasivación de los electrodos.

Los resultados de la monitorización de las dos MEA muestran que tras la pérdida inicial provocada por la protección de los electrodos, las sensibilidades para la detección de los dos analitos se mantienen prácticamente constantes durante toda la monitorización. Estos resultados confirman la idoneidad de la membrana de Nafion para proteger los electrodos de su desactivación e incrementar la estabilidad de su respuesta a lo largo del tiempo. De este modo la protección de los electrodos permite utilizar el microsensor para realizar medidas a lo largo del tiempo.

9.3.2. Análisis del funcionamiento del microsensor MEMS para el estudio y monitorización de biopelículas

La validación del microsensor MEMS multi-analito se llevó a cabo evaluando la repercusión de las mejoras en su diseño y fabricación (protección de los electrodos y reducción de su grosor) en el estudio y la monitorización de biopelículas. Para ello se analizó su funcionamiento para la obtención de perfiles de OD y pH puntuales en el interior de una biopelícula sulfuroxidante y para la monitorización de una biopelícula sulfuroxidante a lo largo del tiempo.

9.3.2.1. Adquisición de perfiles de OD y pH

El funcionamiento del microsensor MEMS multi-analito para la adquisición de perfiles de OD y pH en el interior de una biopelícula sulfuroxidante se validó utilizando la respuesta de microsensors convencionales de OD y pH como patrón. Los diferentes microsensors se utilizaron para adquirir los perfiles de OD y pH en el mismo punto de la biopelícula (a 8 cm de la entrada del reactor).

Los perfiles adquiridos utilizando los microsensors convencionales se adquirieron desde la interfase gas-líquido hasta la zona más profunda de la biopelícula. Utilizando el micromanipulador, los perfiles se adquirieron en intervalos de 100 μm dentro de la fase líquida y de 50 μm en el interior de la biopelícula. A continuación los dos perfiles fueron adquiridos de nuevo utilizando el microsensor MEMS. A pesar de que el microsensor MEMS permite adquirir un perfil de concentración sin la ayuda de un micromanipulador (diseño multi-electrodo), éste fue utilizado para mantener la misma posición respecto a la biopelícula. El microsensor MEMS se insertó directamente en el interior de la biopelícula, y los perfiles de OD y pH fueron adquiridos en 2 medidas consecutivas (perfiles de 7 puntos) desplazando el microsensor en el interior de la biopelícula. Los perfiles de OD y pH obtenidos utilizando los tres microsensors se muestran en la Figura 9.11.

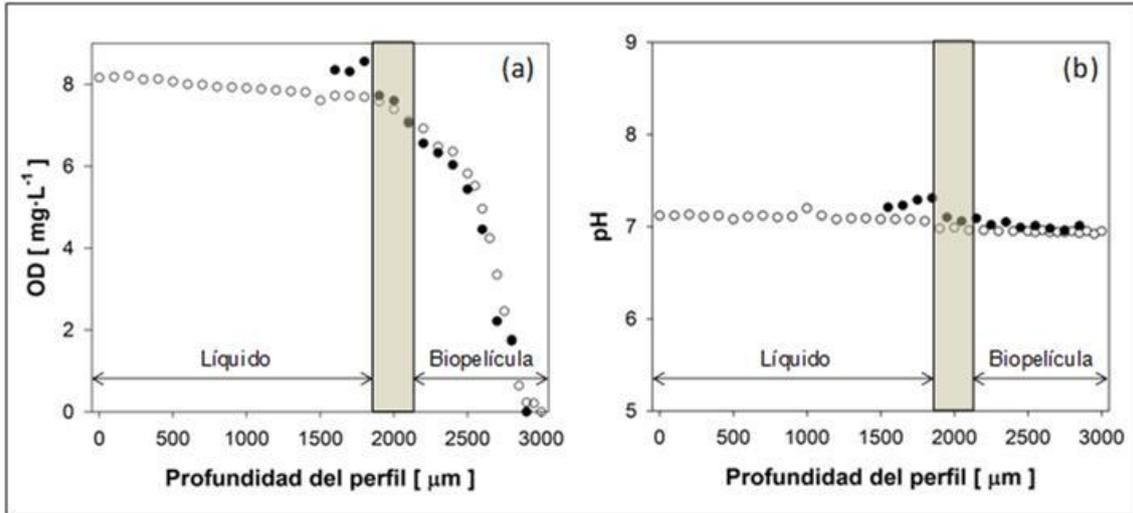


Figura 9.11. Perfiles de OD (a) y pH (b) adquiridos con microsensors convencionales (○) y el microsensor MEMS multi-analito (●) en el interior de una biopelícula sulfuroxidante. Los perfiles fueron analizados siguiendo el procedimiento presentado en la sección 6.3.2.1. En este sentido, el tramo del perfil correspondiente a la fase líquida y la biopelícula se indica entre las flechas, mientras que la interfase líquido-biopelícula se remarca en gris.

Los perfiles de OD adquiridos con los diferentes microsensors en el interior de la biopelícula sulfuroxidante se presentan en la Figura 9.11a. Comparando los dos perfiles se observa como ambos presentan la misma tendencia a lo largo de todo el perfil. Sin embargo, la concentración de OD medida en la fase líquida, alrededor de la interfase líquido-biopelícula, con el microsensor Clark ($7.72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y con el microsensor MEMS ($8.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) presenta algunas diferencias. Esta diferencia puede explicarse por el efecto de la dinámica del reactor sobre la concentración de OD en el líquido, ya que los dos perfiles no fueron adquiridos simultáneamente. Respecto a la concentración de OD medida en el resto del perfil, los dos sensores presentan prácticamente la misma medida de OD desde la superficie de la biopelícula, donde los dos microsensors midieron una concentración de $7.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, hasta la zona más profunda de la biopelícula. Del mismo modo, los dos perfiles muestran el agotamiento del OD en la misma profundidad de la biopelícula ($800 \mu\text{m}$ desde la superficie). Considerando la respuesta del microsensor Clark como patrón, las pequeñas diferencias que presenta la concentración de OD medida con el nuevo microsensor MEMS, respecto a las observadas cuando se utilizó el prototipo anterior (en la Figura 5.20), demuestra que el nuevo sensor solventa las principales limitaciones de los microsensors MEMS para la adquisición de perfiles de OD en el interior de biopelículas. En este sentido, la reducción del grosor del sustrato utilizado en la fabricación del microsensor permite reducir el daño en la estructura de la biopelícula durante su inserción, mejorando su funcionamiento para la adquisición de perfiles.

Los perfiles de pH adquiridos utilizando el microsensor convencional y el microsensor MEMS se muestran en la Figura 9.11b. Estos resultados muestran algunas diferencias en el pH medido por los dos microsensors, sobretodo en la fase líquida. En el caso del pH el efecto de la dinámica del reactor sobre el pH de la fase líquida genera una diferencia de 0.25 unidades en el pH medido con los dos microsensors alrededor de la interfase líquido-biopelícula. El perfil de pH medido en el interior de la biopelícula con el microsensor MEMS presenta una buena concordancia con el perfil adquirido utilizando el microsensor convencional, con diferencias menores al 0.1 unidad de pH. El principio de funcionamiento de los microsensors convencionales de pH (de membrana de vidrio) (Santegoeds, Schramm y De Beer 1998) provoca que la resolución espacial de estos dispositivos corresponda a la totalidad de la membrana de vidrio (generalmente con tamaños superiores a 200 μm). El nuevo microsensor MEMS permite incrementar la resolución espacial en la medida de pH hasta 50 μm . Por lo tanto, este dispositivo permite mejorar las prestaciones de los microsensors para la monitorización del pH en el interior de las biopelículas.

Por otro lado, analizando el perfil de pH se observa un gradiente prácticamente constante. Las pequeñas diferencias entre el pH medido en la fase líquida y el interior de la biopelícula (7.05 y 6.95 respectivamente) están provocadas por la velocidad de difusión de los protones, que es suficientemente grande para suavizar el gradiente de pH entre las dos fases.

9.3.2.2. Monitorización de biopelículas sulfuroxidantes

El nuevo microsensor MEMS se utilizó para monitorizar el OD y el pH en el interior de la biopelícula sulfuroxidante, cultivada en el BPP-FG. El reactor se operó ajustando el TRL , la v_L y la concentración de H_2S en la entrada del reactor en 6 h, 3.4 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ y 130 \pm 20 ppm_v, respectivamente. Al mismo tiempo, el TRG se redujo desde 56 s hasta 6 s, aumentando la carga alimentada desde 6 $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ hasta 60 $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$. Los electrodos de oro se utilizaron para monitorizar la evolución de la concentración de OD en el interior de la biopelícula. Las limitaciones técnicas del sistema de medida (la posibilidad de realizar sólo una medida potenciométrica simultánea) sólo permitieron medir puntualmente el pH en el interior de la biopelícula.

La concentración de OD y pH durante el seguimiento de la biopelícula se muestran en la Figura 9.12 y en la Figura 9.13 respectivamente. Los resultados de la

monitorización revelaron que a partir de 500 μm el OD se encontraba agotado. Por este motivo, los resultados de la monitorización del OD sólo muestran los resultados adquiridos hasta una profundidad de 400 μm . Las condiciones de operación durante los diferentes periodos en los que se divide la monitorización se detallan en la Tabla 9.5.

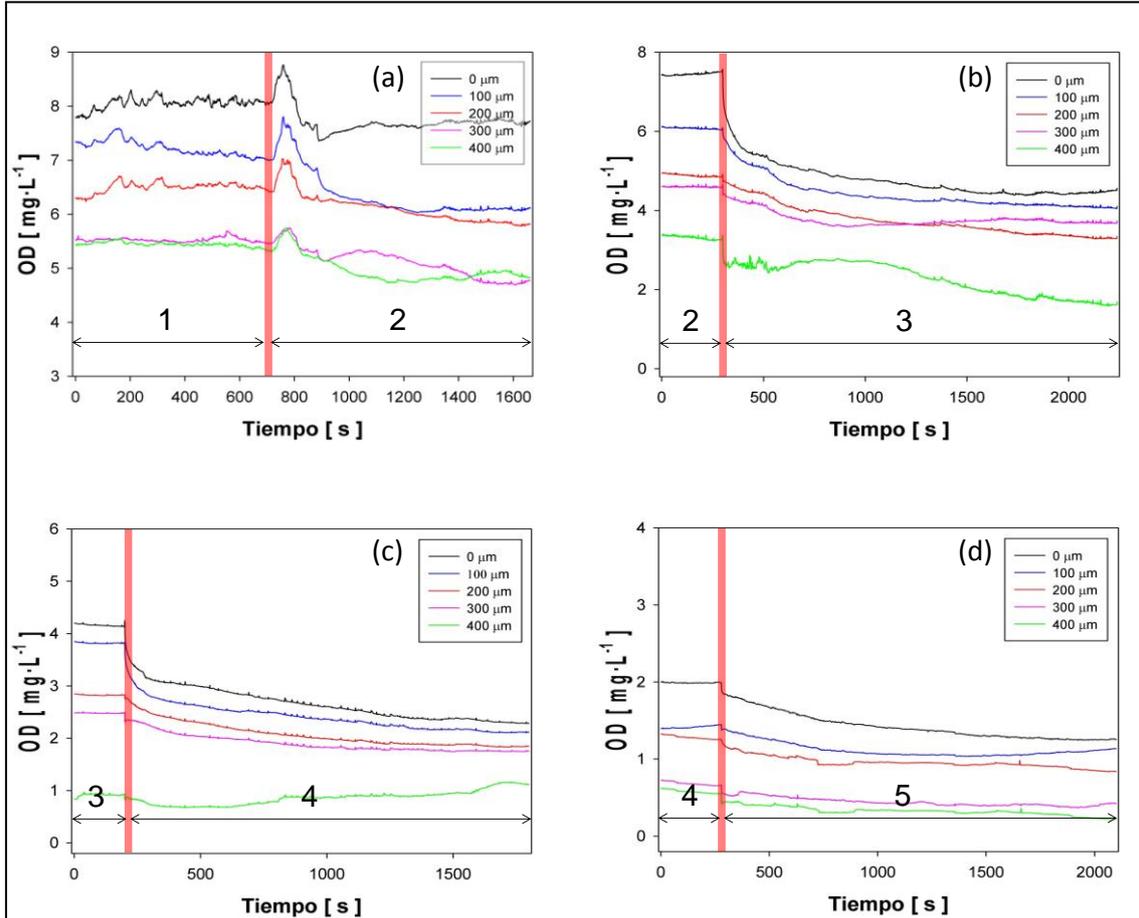


Figura 9.12. OD en el interior de la biopelícula durante la reducción del TRG desde: 56 s hasta 42 s (a), 42 s hasta 12 s (b), 12 s hasta 8 s (c) y 8 s hasta 6 s (d). Los números sobre las flechas indican el periodo en los que se divide la monitorización.

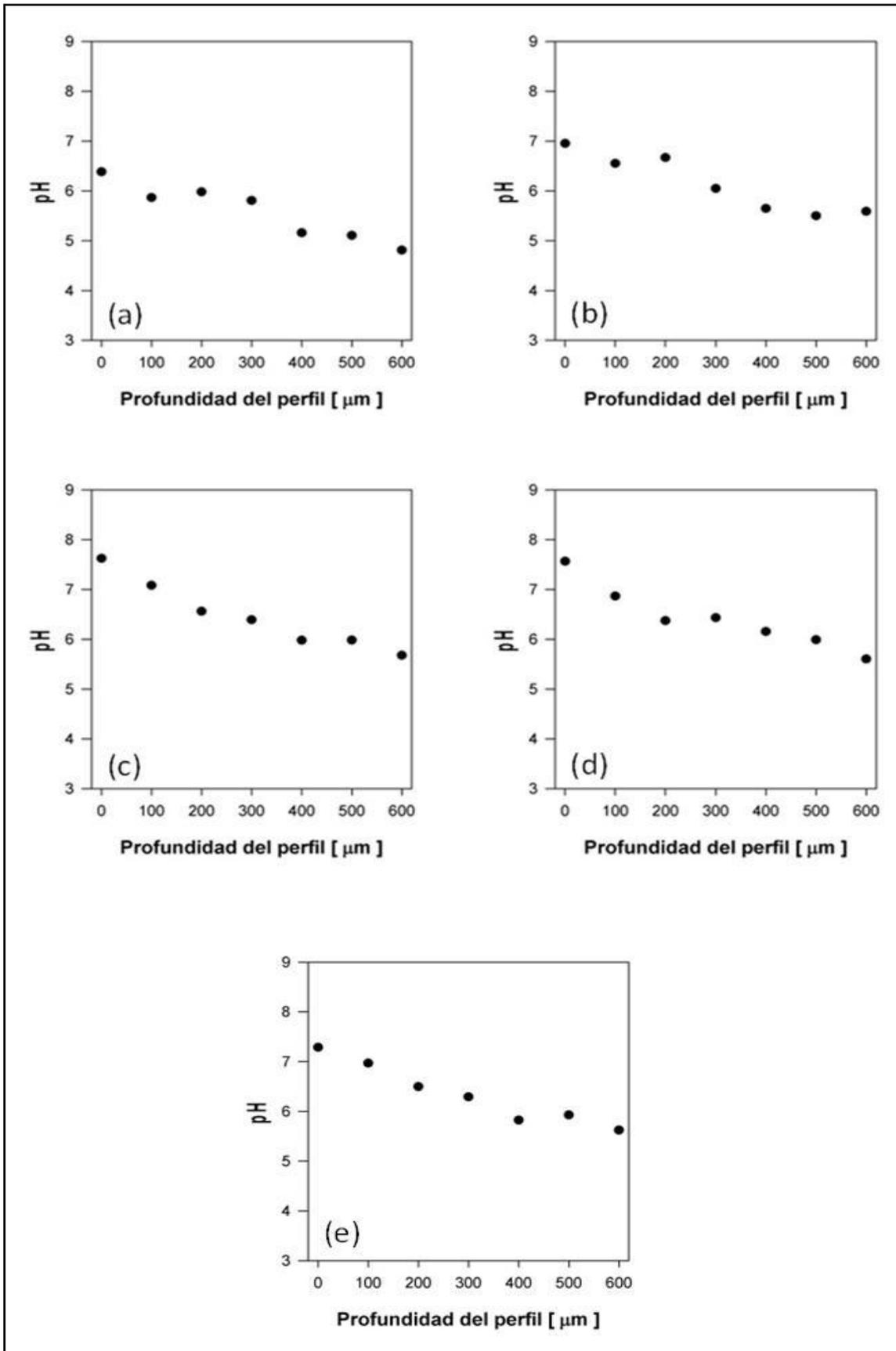


Figura 9.13. pH en el interior de la biopelícula cultivada bajo un TRG de: 56 s (a), 42 s (b), 12 s (c), 8 s (d) y 6 s (e).

Tabla 9.5. Condiciones de operación del BPP-FG durante la monitorización de la biopelícula utilizando el microsensar MEMS multi-analito.

Periodo	TRG [s]	Concentración H ₂ S (alimentada) [ppm _v]
1	56	127±5
2	42	130±7
3	12	120±8
4	8	150±2
5	6	145±5

Los resultados de monitorización del pH no muestran una correlación clara entre el valor de pH medido y la carga alimentada en el reactor. Este comportamiento se explica por la acción del control de pH, que mitiga en efecto de la actividad de los microorganismos sobre el pH del sistema. Estos resultados muestran una ligera acidificación de la biopelícula por la oxidación biológica del H₂S por parte de los microorganismos. Tal y como se observa en la Figura 9.13, el pH disminuye desde valores superiores a 7 en la zona superficial de la biopelícula, hasta valores inferiores a 6 en la zona más profunda de ésta.

Los resultados de OD a lo largo de la monitorización (Figura 9.12), revelan un consumo desigual a lo largo de la biopelícula. Como se observa en estas figuras, el consumo en la zona superficial de la biopelícula (profundidades de 0 µm, 100 µm y 200 µm) es el doble que en la zona más interna de la biopelícula (profundidades de 300 µm y 400 µm). La distribución de consumo de OD en el interior de la biopelícula se explica por la mayor concentración de H₂S en la superficie de la biopelícula que acentúa el consumo de OD. En esta dirección, también se observa como cuando aumenta la carga de H₂S alimentada aparecen limitaciones en la concentración de OD, como se empieza a observar por debajo de 400 µm cuando se alimenta una carga superior a 48 g·m⁻³·h⁻¹ (en la Figura 9.12c).

La evolución de la concentración de OD cuando aumenta la carga alimentada en el reactor revela que no hay diferencias importantes en la velocidad de consumo de OD (pendiente similares en después de los diferentes aumentos de carga (Figura 9.12a, Figura 9.12b y Figura 9.12c)). Sin embargo, se observan variaciones importantes en la concentración de OD, que disminuye (en la superficie de la biopelícula) desde 8.2 mg·L⁻¹ hasta 2 mg·L⁻¹, cuando la carga aumenta desde 6 g·m⁻³·h⁻¹ hasta 60 g·m⁻³·h⁻¹.

Esta disminución en la concentración de OD indica un aumento en la actividad oxidativa de los microorganismos.

Por otro lado, los resultados obtenidos cuando se aumentó la carga alimentada hasta $60 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ (Figura 9.12d) muestran que el consumo de OD es inferior al observado anteriormente (Figura 9.12b y Figura 9.12c). Este comportamiento tiene relación con la limitación de OD observada por debajo de las $400 \mu\text{m}$ cuando se alimentaba una carga de $48 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$. La disminución del consumo de OD, indica que para este valor de carga, los microorganismos han alcanzado su capacidad máxima de consumo de H_2S .

Otro aspecto importante en el funcionamiento del microsensor es la susceptibilidad de su respuesta al ruido electromagnético ambiental. Los resultados de la monitorización del OD revelan que el ruido electromagnético sólo se aprecia cuando los cambios en la concentración medida son pequeños (Figura 9.12a). A pesar del ruido que puede presentar la señal del microsensor, éste no impide detectar los cambios en la concentración de OD provocados por el aumento de la carga de H_2S . Estos resultados descartan la necesidad de utilizar elementos, tales como una caja de Faraday, para eliminar el ruido de la señal del microsensor. Sin embargo, la perturbación en la señal registrada que se observa en la Figura 9.12a, entre el segundo 700 y 900, (provocada por la manipulación del reactor durante la monitorización de la biopelícula) indica la necesidad de utilizar sistemas experimentales robustos que eviten la transmisión de vibraciones hasta el microsensor.

Estos resultados demuestran que utilizando este microsensor es posible monitorizar la evolución de dos variables claves del proceso biológico (OD y pH) en diferentes escenarios operacionales. La monitorización del interior de las biopelícula durante la operación del reactor permite detectar diferentes comportamientos a lo largo de la operación (diferentes velocidades de consumo o limitaciones por la concentración de OD). De este modo, las posibilidades de monitorización del microsensor MEMS mejoran las prestaciones de los sensores convencionales para monitorización de biopelículas.

9.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el proceso de caracterización del microsensor MEMS multi-analito han demostrado que las diferentes modificaciones realizadas en el diseño y la fabricación del microsensor de OD previo (presentado en el capítulo 5) han permitido mejorar su funcionamiento para la monitorización de biopelículas. En este capítulo se ha demostrado que sustituyendo el sustrato utilizado convencionalmente en la tecnología de microfabricación por una lámina fina de Kapton (125 μm), se ha mejorado el funcionamiento del microsensor reduciendo la perturbación en la medida provocada por el daño en la estructura de la biopelícula durante la monitorización. También se ha demostrado que la capa de IrOx depositada sobre los electrodos de platino presenta un excelente funcionamiento para la detección del pH, permitiendo integrar en un mismo dispositivo un microsensor de OD y un microsensor de pH. Finalmente, se ha observado que la protección de los electrodos con una membrana de Nafion, previene la desactivación de los electrodos, proporcionando una elevada estabilidad a largo plazo de su respuesta y permitiendo la utilización del microsensor para monitorizar biopelículas a lo largo del tiempo.

La comparación de los perfiles de OD y pH adquiridos con el microsensor MEMS y microsensors convencionales no revelaron diferencias en su funcionamiento. Estos resultados validaron el funcionamiento del microsensor multi-analito desarrollado en este capítulo para la obtención de perfiles de OD y pH en el interior de biopelículas. Los resultados obtenidos en el análisis del funcionamiento del microsensor para la monitorización de biopelículas mostraron que la medida del microsensor presenta algo de ruido. Sin embargo, el ruido sólo se aprecia cuando los cambios de OD son pequeños. Además, el ruido apreciado en la respuesta del microsensor no impide detectar los cambios en la concentración de OD provocados por la dinámica del sistema. Los resultados de la monitorización de la biopelícula sulfuroxidante durante los experimentos de aumento de carga validó la utilización del microsensor MEMS multi-analito para detectar con precisión cambios en la concentración de OD y en el pH, provocados por la dinámica de la biopelícula.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, éste es el primer dispositivo que integra en una misma aguja, un microsensor de OD y pH, especialmente diseñado para la monitorización de biopelículas. La utilización de un sistema de adquisición adecuado

permite utilizar este microsensor para adquirir simultáneamente un perfil de OD y pH (instantáneos). Este microsensor ha permitido simplificar el sistema y el procedimiento experimental necesario para la monitorización de biopelículas. Su excelente funcionamiento y robustez mejora las prestaciones de los microsensors convencionales, acercando la posibilidad de monitorizar equipos industriales utilizando este tipo de equipos.

Capítulo 10

Conclusiones y trabajo futuro

10. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

10.1. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de esta tesis pueden agruparse en 4 temas principales: desarrollo de microsensores basados en tecnología MEMS, caracterización del transporte de materia en el interior de biopelículas, caracterización cinética de biopelículas y monitorización de biofiltros percoladores utilizando microsensores.

10.1.1. Desarrollo de microsensores basados en tecnología MEMS

Las conclusiones relacionadas con el desarrollo de microsensores basados en tecnología MEMS derivadas de los capítulos 5 y 9 son:

- Los microelectrodos de oro han mostrado un excelente funcionamiento como sensores amperométricos de OD, presentando una respuesta lineal, una elevada sensibilidad y unos límites de detección y cuantificación bajos.
- La utilización de películas de óxido iridio depositadas sobre electrodos de platino ha demostrado ser una excelente opción para la monitorización potenciométrica del pH.
- El diseño multi-electrodo del microsensor (específico para la monitorización de biopelículas) ha permitido simplificar el procedimiento experimental necesario para la obtención de perfiles de concentración utilizando microsensores convencionales, permitiendo obtener un perfil de OD y pH de 7 puntos en una sola medida.
- La utilización de membranas de Nafion para proteger los electrodos del microsensor ha demostrado ser un método efectivo para prevenir la desactivación de los electrodos e incrementar la estabilidad de su respuesta.
- La utilización de una lámina de Kapton (125 μm) como sustrato ha permitido minimizar el daño causado sobre las estructuras biológicas durante su monitorización.

10.1.2. Caracterización del transporte de materia en el interior de biopelículas

Las conclusiones relacionadas con la caracterización del transporte de materia en el interior de biopelículas derivadas de los capítulos 6 y 7 son:

- El transporte de materia externo (a través de la interfase líquido-biopelícula) presenta una clara dependencia con las condiciones hidrodinámicas del sistema.
- La morfología de la superficie de las biopelículas impide describir el mecanismo de transporte de materia externo utilizando la aproximación clásica de Blasius (que asume una interfase plana). Esta desviación ha sido corregida desarrollando una nueva correlación que considera un exponente turbulento (0.8) para el Re .
- El transporte de materia en el interior de las biopelículas está impulsado por mecanismos difusivos a través de los agregados de microorganismos, y mecanismos convectivos a través de los canales de agua.
- El transporte de materia interno presenta una clara dependencia con las condiciones hidrodinámicas del sistema. En Re inferiores a 2.8 el transporte de materia está dominado por los mecanismos difusivos, mientras que en Re superiores a 5.6 está impulsado por mecanismos convectivos.
- La velocidad de transporte de materia interno presenta una relación lineal con la densidad de la biopelícula. El coeficiente de difusión en el interior de las biopelículas decrece cuando aumenta su densidad, hasta biopelículas de $50 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$, en las que está fuertemente limitado.
- La descripción del transporte de materia interno se ha mejorado a partir del desarrollo de un modelo para estimar el coeficiente de difusión a partir de la densidad de la biopelícula y las condiciones hidrodinámicas del sistema.

10.1.3. Caracterización cinética de biopelículas heterótrofas y sulfuroxidantes

Las conclusiones relacionadas con la caracterización del transporte de materia en el interior de biopelículas derivadas de los capítulos 6 y 8 son:

- La utilización de perfiles de OD ha permitido cuantificar los parámetros de un modelo biocinético desarrollado para describir la actividad en una biopelícula heterótrofa.
- Los resultados de la caracterización cinética han demostrado que los estudios respirométricos (caracterización cinética en cultivos en suspensión) tienden a sobreestimar la actividad en el interior de la biopelícula.
- La utilización de microsensores de OD, H₂S y pH ha permitido caracterizar in situ la biocinética de una biopelícula sulfuroxidante.
- La caracterización cinética ha revelado un elevado impacto de la heterogeneidad de la biopelícula sobre su actividad, obteniendo una distribución de los parámetros biocinéticos a lo largo de las biopelículas heterótrofas y sulfuroxidantes caracterizadas.
- La modelización de las biopelículas utilizando la información del transporte de materia y la biocinética obtenida con los microsensores en el interior de las biopelículas ha mejorado la precisión de los modelos, que han incorporado la capacidad de predecir el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre el comportamiento de la biopelícula.

10.1.4. Monitorización de biofiltros percoladores utilizando microsensores

Las conclusiones relacionadas con la caracterización del transporte de materia en el interior de biopelículas derivadas del capítulo 8 son:

- El diseño de los microsensores desarrollados ha permitido monitorizar simultáneamente diferentes puntos en el interior de biopelículas que crecen en biofiltros percoladores.
- La monitorización de biopelículas en sistemas reales permite detectar posibles escenarios que limiten la actividad de los microorganismos.

10.2. TRABAJO FUTURO

En esta tesis se ha desarrollado un nuevo microsensor que solventa la mayor parte de las limitaciones que presentan los microsensores convencionales, y se ha adquirido un amplio conocimiento sobre los procesos que tienen lugar en el interior de las biopelículas. Sin embargo, al tratarse de herramientas novedosas es necesario continuar avanzando en las diferentes líneas de investigación iniciadas.

Respecto al microsensor desarrollado, a pesar de que ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad, existen ciertos aspectos que podrían mejorar su funcionamiento e incrementar la información de los procesos biológicos que puede ofrecer. Estos aspectos se recogen a continuación.

- La utilización del electrodo diseñado como electrodo de referencia permitiría simplificar aún más el sistema experimental necesario para la monitorización de biopelículas. Para ello, se deben mejorar los procedimientos disponibles para depositar una película de Ag/AgCl sobre el electrodo con el fin de incrementar la estabilidad de la referencia interna.
- El estudio de biopelículas sulfuroxidantes utilizando el microsensor desarrollado debería incorporar la medida de H₂S. Para ello, se debería adaptar el diseño actual del microsensor y se debería incorporar el conocimiento disponible sobre la monitorización amperométrica del H₂S en el desarrollo de los dispositivos.
- La utilización del nuevo microsensor multi-analito debería permitir monitorizar simultáneamente el OD y el pH en todos los electrodos. Para ello, es necesario desarrollar un equipo de medida (potenciostato) que permita realizar simultáneamente como mínimo 7 medidas amperométricas y 7 medidas potenciométricas.

Respecto a los estudios de caracterización de biopelículas, las futuras investigaciones deberían abordar diferentes aspectos con el objetivo de incrementar la información disponible sobre el funcionamiento de los sistemas de biofiltración. Estos aspectos se presentan a continuación.

- La caracterización del transporte de materia en los sistemas de biofiltración debería completarse utilizando los microsensores para estudiar el transporte de materia entre la fase gas y la fase líquida.
- El estudio biocinético de las biopelículas sulfuroxidantes debería contemplar otros escenarios operacionales y otros modelos biocinéticos que permitan evaluar el efecto de posibles inhibiciones así como de diferentes escenarios de limitación en la actividad de los microorganismos.

Capítulo 11

Abreviaturas y símbolos

11. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

11.1. ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica (del inglés <i>Atomic Force Microscopy</i>)
BPP-CA	Bioreactor de Placa Plana de Canal Abierto
BPP-FG	Bioreactor de Placa Plana en Fase Gas
CE	Contra-Electrodo
CLSM	Microscopía Confocal (del inglés <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
COV	Compuestos Orgánicos Volátiles
DEO	Diseño de Experimentos Óptimos
DGGE	Electroforesis fluorescente con gradiente de desnaturalización (del inglés <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
EPS	Substancias Poliméricas Extracelulares (del inglés <i>Extracellular Polymeric Substances</i>)
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ (del inglés <i>Fluorescence In Situ Hybridation</i>)
GFP	Proteína Verde Fluorescente (del inglés <i>Green Fluorescence Protein</i>)
IrOx	Óxido de Iridio
MEA	Matriz de Microelectrodos (del inglés <i>Microelectrode Array</i>)
MEMS	Sistemas Micro-Electromecánicos (del inglés <i>Micro-Electromechanical Systems</i>)
NMR	Resonancia Nuclear Magnética (del inglés <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NRMSE	Error Cuadrático Medio Normalizado (del inglés <i>Normalized Root Mean Square Error</i>)
OD	Oxígeno Disuelto
OMS	Organización Mundial de la Salud

Abreviatura	Nombre
PFGE	Electroforesis de Gel en Campo Pulsado (del inglés <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
PCB	Placa de Circuito Impreso (del inglés <i>Printed Circuit Board</i>)
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa (del inglés <i>Protein Chain Reaction</i>)
RCTA	Reactor Continuo de Tanque Agitado
RE	Electrodo de Referencia (del inglés <i>Reference Electrode</i>)
SSV	Sólidos en Suspensión Volátiles
SEM	Microscopía de Barrido Electrónico (del inglés <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TRG	Tiempo de Residencia del Gas
TRL	Tiempo de Residencia del Líquido
WE	Electrodo de Trabajo (del inglés <i>Working Electrode</i>)
ZIF	Sistema de conexión rápida (del inglés <i>Zero Insertion Force</i>)

11.2. SÍMBOLOS

Símbolo	Nombre	Unidades
a	Área de transferencia específica	m^{-1}
a_i	Actividad de los iones en la muestra	-
a_e	Actividad de los iones en la solución electrolítica	-
A	Área	m^2
C	Concentración	$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$
d	Distancia entre dos electrodos de dos MEA distintas	μm
dC/dz	Gradiente de concentración en una el interior de una biopelícula	$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$
D	Coefficiente de difusión	$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
E	Potencial sobre un electrodo	mV
F	Constante de Faraday ($96.49\cdot 10^3$)	$\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$

Símbolo	Nombre	Unidades
$F_{objetivo}$	Función objetivo en un procedimiento de minimización	-
I	Corriente de polarización	A
J	Flujo de especies hacia un electrodo	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
k	Coefficiente de transferencia de materia	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
k_d	Consumo endógeno del oxígeno en una biopelícula heterótrofa	$\text{g O}_2\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
K_I	Constante de inhibición del modelo Haldane	$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$
K_{HS}	Constante de ionización $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$	-
K_S	Constante de semi-saturación	$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$
l	Posición en la coordenada longitudinal del reactor	m
L	Altura de la pasivación de un electrodo	m
L_C	Espesor de la capa límite	m
L_D	Límite de detección de un sensor	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
L_Q	Límite de cuantificación de un sensor	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
n	Número de electrones transferidos en una reacción electroquímica	-
nb	Capas en las que se divide la biopelícula	-
n_L	Secciones en las que se divide la plana	-
n_m	Número de medidas experimentales	-
p	Punto de muestreo	-
$q_{max,OD}$	Consumo específico máximo del oxígeno para la degradación de la glucosa	$\text{g O}_2\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
$q_{max,B1}$	Consumo específico máximo del oxígeno para la oxidación del H_2S	$\text{g O}_2\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
$q_{max,B2}$	Consumo específico máximo del oxígeno para la oxidación del S^0	$\text{g O}_2\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
Q_{alim}	Caudal de alimentación del reactor	$\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$
Q_p	Error de las medidas experimentales en el punto de muestreo p	-

Símbolo	Nombre	Unidades
Q_{rec}	Caudal de recirculación del reactor	$m^3 \cdot s^{-1}$
r	Radio de un electrodo	m
R	Constante de los gases ideales (8.31)	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
R_b	Velocidad de consumo/producción biológica	$kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$
Re	Número adimensional de Reynolds	-
S	Distancia entre electrodos	μm
Sal	Salinidad de la solución	% masa
s_B	Desviación estándar de la intensidad de un blanco	A
Sc	Número adimensional de Schmidt	-
Sh	Número adimensional de Sherwood	-
S_{OD}	Sensibilidad para la detección del OD	$nA \cdot L \cdot mg^{-1}$
t	Tiempo	s
T	Temperatura	K
v	Velocidad de circulación	$m \cdot s^{-1}$
V	Volumen	m^3
x	Espesor de la película de líquido sobre la biopelícula	m
x_L	Longitud hidrodinámica característica	m
X	Concentración de microorganismos	$g \text{ SSV} \cdot L^{-1}$
y_{exp}	Variable procedimiento de minimización	-
Y	Rendimiento de una reacción biológica	-
Y_ψ	Sensibilidad del parámetro ψ en un modelo matemático	-
z	Posición en la profundidad de la biopelícula	m
z_b	Espesor de la biopelícula	m
z_e	Carga de los iones	-
z_{perfil}	Profundidad de un perfil	cm
α	Parámetro de la correlación Sh-Re	-
β	Parámetro de la correlación Sh-Re	-

Símbolo	Nombre	Unidades
γ	Parámetro de la correlación Sh-Re	-
δ_{NAFION}	Espesor de la membrana de Nafion	nm
ΔE	Diferencia de potencial a través de la membrana	mV
Δz_{perfil}	Distancia entre los puntos monitorizados en el interior de una biopelícula	μm
ε_w	Fracción volumétrica	-
μ	Velocidad de crecimiento específica de los microorganismos	s^{-1}
μ_i	Viscosidad del fluido en la capa límite	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento de los microorganismos	s^{-1}
ρ_i	Densidad del fluido en la capa límite	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
ρ_o	Densidad de los microorganismos	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$\nu_{muestreo}$	Frecuencia de muestreo	s^{-1}
ψ	Parámetro estimado en un procedimiento de minimización	-
\emptyset	Diámetro de un electrodo	μm

11.3.SUBÍNDICES

Subíndice	Nombre
A	Analito
(alim)	Alimentación del reactor
b	Interior de la biopelícula
B	Superficie de la biopelícula
CN	Ferricianuro
e	Electrodos
end	Endógeno
exp	experimento
G	Glucosa

Subíndice	Nombre
i	Interior de la capa límite
(inlet)	Entrada del reactor
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
L	Interior de la fase líquida
m	Especie m
o	microorganismos
OD	Oxígeno disuelto
p	EPS
pico	Pico de una reacción electroquímica
r	relativa
red	Reacción de electroquímica de reducción
S	Azufre elemental
SO ₄	Sulfato
(t=0)	Inicio del experimento
trans	Transferencia de materia
W	Agua
0	Solución electrolítica
1	Primera reacción
2	Segunda reacción

Capítulo 12

Referencias

12. REFERENCIAS

- A**KIN, M., PREDIGER, A., YUKSEL, M., HÖPFNER, T., DEMIRKOL, D.O., BEUTEL, S., TIMUR, S. y SCHEPER, T., 2011. A new set up for multi-analyte sensing: At-line bio-process monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 11, pp. 4532-4537.
- ALLEN, E.E. y BANFIELD, J.F., 2005. Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nature reviews. Microbiology*, vol. 3, no. 6, pp. 489-98.
- AOI, Y., 2002. In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 94, no. 6, pp. 552-556.
- APHA, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Edition 20. Washington DC: APHA/AWWA/WPCF.
- B**EULING, E.E., VAN DEN HEUVEL, J.C. y OTTENGRAF, S.P., 2000. Diffusion coefficients of metabolites in active biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 67, no. 1, pp. 53-60.
- BEYENAL, H. y LEWANDOWSKI, Z., 2000. Combined effect of substrate concentration and flow velocity on effective diffusivity in biofilms. *Water Research*, vol. 34, no. 2, pp. 528-538.
- BEYENAL, H. y LEWANDOWSKI, Z., 2002. Internal and External Mass Transfer in Biofilms Grown at Various flow velocities. *Biotechnology progress*, vol. 18, pp. 55-61.
- BEYENAL, H. y LEWANDOWSKI, Z., 2004. Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. *Water research*, vol. 38, no. 11, pp. 2726-36.
- BEYENAL, H. y LEWANDOWSKI, Z., 2005. Modeling mass transport and microbial activity in stratified biofilms. *Chemical Engineering Science*, vol. 60, no. 15, pp. 4337-4348.
- BEYENAL, H., LEWANDOWSKI, Z., YAKYMYSHYN, C., LEMLEY, B. y WEHRI, J., 2000. Fiber-optic microsensors to measure backscattered light intensity in biofilms. *Applied optics*, vol. 39, no. 19, pp. 3408-12.
- BEYENAL, H., SEKER, S. y TANYOLAÇ, A., 1997. Diffusion Coefficients of Phenol and Oxygen in a Biofilm of *Pseudomonas putida*. *AIChE Journal*, vol. 43, no. 1, pp. 243-250.
- BEYENAL, H., TANYOLAÇ, A. y LEWANDOWSKI, Z., 1998. Measurement of local effective diffusivity in heterogeneous biofilm. *Water Science and Technology*, vol. 38, no. 8-9, pp. 171-178.

- BISHOP, P.L., ZHANG, T.C. y FU, Y.-C., 1995. Effects of biofilm structure, microbial distributions and mass transport on biodegradation processes. *Water Science & Technology*, vol. 31, no. 1, pp. 143-152.
- BOND, A.M., LUSCOMBE, D., OLDHAM, K.B. y ZOSKI, C.G., 1988. A comparison of the chronoamperometric response at inlaid and recessed disc microelectrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 249, no. 1-2, pp. 1-14.
- BONILLA, D., MALLÉN, M., DE LA RICA, R., FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. y BALDI, A., 2011. Electrical readout of protein microarrays on regular glass slides. *Analytical chemistry*, vol. 83, no. 5, pp. 1726-31.
- BONILLA-BLANCAS, W., MORA, M., REVAH, S., BAEZA, J.A., LAFUENTE, J., GAMISANS, X., GABRIEL, D. y GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A., 2015. Application of a novel respirometric methodology to characterize mass transfer and activity of H₂S-oxidizing biofilms in biotrickling filter beds. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 99, pp. 24-34.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254.
- BROUWER, H., KLAPWIJK, A. y KEESMAN, K.J., 1998. Identification of activated sludge and wastewater characteristics using respirometric batch-experiments. *Water Research*, vol. 32, no. 4, pp. 1240-1254.
- BURR, M.D., CLARK, S.J., SPEAR, C.R. y CAMPER, A.K., 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microbial Ecology*, vol. 51, no. 4, pp. 479-486.
- C**alidad del aire (exterior) y salud. Nota descriptiva no 313 [en línea], 2014. [Consulta: 31 mayo 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/es/>.
- CASEY, E., GLENNON, B. y HAMER, G., 2000. Biofilm development in a membrane-aerated biofilm reactor: effect of intra-membrane oxygen pressure on performance. *Bioprocess Engineering*, vol. 23, no. 5, pp. 457-465.
- CHIU, Z.C., CHEN, M.Y., LEE, D.J., TAY, S.T.-L., TAY, J.H. y SHOW, K.Y., 2006. Diffusivity of oxygen in aerobic granules. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 94, no. 3, pp. 505-13.
- CHIU, Z.C., CHEN, M.Y., LEE, D.J., WANG, C.H. y LAI, J.Y., 2007. Oxygen diffusion and consumption in active aerobic granules of heterogeneous structure. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 75, no. 3, pp. 685-91.
- COHEN, Y., 2001. Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms

- immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*, vol. 77, pp. 257-274.
- CORTIZO, M.C. y DE MELE, M.F.L., 2003. Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, pp. 805-810.
- COX, H. y DESHUSSES, M., 1998. Biological waste air treatment in biotrickling filters. *Environmental biotechnology*, vol. 9, no. 3, pp. 256-62.
- CRUZ, A.M., ABAD, L., CARRETERO, N.M., MORAL-VICO, J., FRAXEDAS, J., LOZANO, P., SUBÍAS, G., PADIAL, V., CARBALLO, M., COLLAZOS-CASTRO, J.E. y CASAN-PASTOR, N., 2012. Iridium oxohydroxide, a significant member in the family of iridium oxides. Stoichiometry, characterization, and implications in bioelectrodes. *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 116, no. 8, pp. 5155-5168.
- CURRIE, L.A., 1968. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. *Analytical Chemistry*, vol. 40, no. 3, pp. 586-593.
- D**AIMS, H., LÜCKER, S. y WAGNER, M., 2006. Daime, a Novel Image Analysis Program for Microbial Ecology and Biofilm Research. *Environmental Microbiology*, vol. 8, no. 2, pp. 200-213.
- DAWSON, D.A. y TRASS, O., 1972. Mass transfer at rough surfaces. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, vol. 15, no. 7, pp. 1317-1336.
- DE BEER, D., SCHRAMM, A., SANTEGOEDS, C.M. y KUHL, M., 1997. A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms. *Applied and environmental microbiology*, vol. 63, no. 3, pp. 973-7.
- DE BEER, D., SRINIVASAN, R. y STEWART, P.S., 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 12, pp. 4339-4344.
- DE BEER, D., STOODLEY, P. y LEWANDOWSKI, Z., 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 44, pp. 636-641.
- DE BEER, D., STOODLEY, P. y LEWANDOWSKI, Z., 1996. Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Research*, vol. 30, no. 11, pp. 2761-2765.
- DE BEER, D., STOODLEY, P., ROE, F. y LEWANDOWSKI, Z., 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 43, no. 11, pp. 1131-1138.
- DE BEER, D. y SWEERTS, J.-P., 1989. Measurements of nitrate gradients with an ion selective microelectrode. *Analytica Chimica Acta*, vol. 219, pp. 351-356.

- DE BEER, D. y VAN DEN HEUVEL, J.C., 1988. Response of ammonium-selective microelectrodes based on the neutral carrier nonactin. *Talanta*, vol. 35, no. 9, pp. 728-730.
- DE BRAUWERE, A., DE RIDDER, F., GOURGUE, O., LAMBRECHTS, J., COMBLÉN, R., PINTELON, R., PASSERAT, J., SERVAIS, P., ELSKENS, M., BAEYENS, W., KÄRNÄ, T., DE BRYE, B. y DELEERSNIJDER, E., 2009. Design of a sampling strategy to optimally calibrate a reactive transport model: exploring the potential for *Escherichia coli* in the Scheldt Estuary. *Environmental Modelling and Software*, vol. 24, no. 8, pp. 969-981.
- DE LA ROSA, C. y YU, T., 2005. Three-dimensional mapping of oxygen distribution in wastewater biofilms using an automation system and microelectrodes. *Environmental science & technology*, vol. 39, no. 14, pp. 5196-202.
- DE LA ROSA, C. y YU, T., 2006. Development of an automation system to evaluate the three-dimensional oxygen distribution in wastewater biofilms using microsensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 113, no. 1, pp. 47-54.
- DEL CAMPO, F.J., ABAD, L., ILLA, X., PRATS-ALFONSO, E., BORRISÉ, X., CIRERA, J.M., BAI, H.-Y. y TSAI, Y.-C., 2014. Determination of heterogeneous electron transfer rate constants at interdigitated nanoband electrodes fabricated by an optical mix-and-match process. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 194, pp. 86-95.
- DEL CAMPO, F.J., ORDEIG, O., VIGUÉS, N., GODINO, N., MAS, J. y MUÑOZ, F.X., 2007. Continuous measurement of acute toxicity in water using a solid state microrespirometer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 126, no. 2, pp. 515-521.
- DEL CAMPO, F.J., ORDEIG, O., VIGUÉS, N., GODINO, N., MAS, J. y MUÑOZ, F.X., 2007. Continuous measurement of acute toxicity in water using a solid state microrespirometer. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 126, no. 2, pp. 515-521.
- DELHOMÉNIÉ, M.-C. y HEITZ, M., 2005. Biofiltration of air: a review. *Critical reviews in biotechnology*, vol. 25, no. 1-2, pp. 53-72.
- DENKHAUS, E., MEISEN, S., TELGHEDER, U. y WINGENDER, J., 2007. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchimica Acta*, vol. 158, no. 1-2, pp. 1-27.
- DEVINNY, J.S., DESHUSSES, M.A. y WEBSTER, T.S., 1999. Biofiltration for air pollution control. Boca Raton, FL: s.n.
- DEVINNY, J.S. y RAMESH, J., 2005. A phenomenological review of biofilter models. *Chemical Engineering Journal*, vol. 113, no. 2-3, pp. 187-196.

- DOCHAIN, D. y VANROLLEGHEM, P.A., 2001. Dynamical Modelling and Estimation in Wastewater Treatment Processes. London: IWA Publishing. ISBN 1 900222 50 7.
- DORADO, A.D., 2009. Biofiltració de contaminants gasosos en aire: caracterització de paràmetres clau per l'estudi i modelització del creixement de biomassa. S.l.: Universitat Politècnica de Catalunya.
- DORADO, A.D., BAEZA, J.A., LAFUENTE, J., GABRIEL, D. y GAMISANS, X., 2012. Biomass accumulation in a biofilter treating toluene at high loads – Part 1: Experimental performance from inoculation to clogging. *Chemical Engineering Journal*, vol. 209, pp. 661-669.
- DORADO, A.D., BAQUERIZO, G., MAESTRE, J.P., GAMISANS, X., GABRIEL, D. y LAFUENTE, J., 2008. Modeling of a bacterial and fungal biofilter applied to toluene abatement: Kinetic parameters estimation and model validation. *Chemical Engineering Journal*, vol. 140, no. 1-3, pp. 52-61.
- DORADO, A.D., RODRÍ-GUEZ, G., RIBERA, G., BONSFILLS, A., GABRIEL, D., LAFUENTE, J. y GAMISANS, X., 2009. Evaluation of Mass Transfer Coefficients in Biotrickling Filters: Experimental Determination and Comparison to Correlations. *Chemical Engineering & Technology*, vol. 32, no. 12, pp. 1941-1950.
- DRURY, W.J., STEWART, P.S. y CHARACKLIS, W.G., 1993. Transport of 1-microm latex particles in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 42, no. 1, pp. 111-7.
- E**BERT, A. y BRUNE, A., 1997. Hydrogen concentration profiles at the oxic-anoxic interface: A microsensor study of the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 10, pp. 4039-4046.
- ESTRADA, J.M., KRAAKMAN, N.J.R.B., MUÑOZ, R. y LEBRERO, R., 2011. A comparative analysis of odour treatment technologies in wastewater treatment plants. *Environmental science & technology*, vol. 45, no. 3, pp. 1100-6.
- F**AN, L.-S., LEYVA-RAMOS, R., WISECARVER, K.D. y ZEHNER, B.J., 1990. Diffusion of Phenol through a Biofilm Grown on Activated Carbon Particles in a Bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 35, pp. 279-286.
- FISCHER, L.M., TENJE, M., HEISKANEN, A.R., MASUDA, N., CASTILLO, J., BENTIEN, A., ÉMNEUS, J., JAKOBSEN, M.H. y BOISEN, A., 2009. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectronic Engineering*, vol. 86, no. 4-6, pp. 1282-1285.

- FORTUNY, M., BAEZA, J.A., GAMISANS, X., CASAS, C., LAFUENTE, J., DESHUSSES, M.A. y GABRIEL, D., 2008. Biological sweetening of energy gases mimics in biotrickling filters. *Chemosphere*, vol. 71, no. 1, pp. 10-7.
- FORTUNY, M., GUIASOLA, A., CASAS, C., GAMISANS, X., LAFUENTE, J. y GABRIEL, D., 2010. Oxidation of biologically produced elemental sulfur under neutrophilic conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 85, no. 3, pp. 378-386.
- FU, Y.C., ZHANG, T.C. y BISHOP, P.L., 1994. Determination of effective oxygen diffusivity in biofilms grown in a completely mixed biodrum reactor. *Water Science and Technology*, vol. 29, no. 10-11, pp. 455-462.
- G**ABRIEL, D., COX, H.H.J. y DESHUSSES, M.A., 2004. Conversion of Full-Scale Wet Scrubbers to Biotrickling Filters for H₂S Control at Publicly Owned Treatment Works. *Journal of Environmental Engineering*, vol. 130, no. October, pp. 1110-1117.
- GABRIEL, D. y DESHUSSES, M.A., 2003. Performance of a full-scale biotrickling filter treating H₂S at a gas contact time of 1.6 to 2.2 seconds. *Environmental Progress*, vol. 22, no. July, pp. 111-118.
- GABRIEL, G., ERILL, I., CARO, J., GÓMEZ, R., RIERA, D., VILLA, R. y GODIGNON, P., 2007. Manufacturing and full characterization of silicon carbide-based multi-sensor micro-probes for biomedical applications. *Microelectronics Journal*, vol. 38, no. 3, pp. 406-415.
- GAO, H., 2010. Novel Process of Simultaneous Removal of SO₂ and NO₂ by Sodium Humate Solution. *Environmental Science & Technology*, vol. 44, no. 2, pp. 6712-6717.
- GAO, H., SCHREIBER, F., COLLINS, G., JENSEN, M.M., SVITLICA, O., KOSTKA, J.E., LAVIK, G., DE BEER, D., ZHOU, H. y KUYPERS, M.M.M., 2010. Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. *The ISME journal*, vol. 4, no. 3, pp. 417-26.
- GAO, X., LEE, J. y WHITE, H.S., 1995. Natural Convection at Microelectrodes. *Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 9, pp. 1541-1545.
- GARCÍA-PEÑA, I., HERNÁNDEZ, S., AURIA, R. y REVAH, S., 2005. Correlation of biological activity and reactor performance in biofiltration of toluene with the fungus *Paecilomyces variotii* CBS115145. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 8, pp. 4280-4285.
- GES, I.A., IVANOV, B.L., SCHAFFER, D.K., LIMA, E.A., WERDICH, A.A. y BAUDENBACHER, F.J., 2005. Thin-film IrO_x pH microelectrode for microfluidic-based microsystems. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 2,

pp. 248-256.

- GIESEKE, A. y DE BEER, D., 1999. Use of microelectrodes to measure in situ microbial activities in biofilms, sediments, and microbial mats. *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol. 8.1.3., no. i, pp. 1-23.
- GODINO, N., BORRISÉ, X., MUÑOZ, F.X., DEL CAMPO, F.J. y COMPTON, R.G., 2009. Mass Transport to Nanoelectrode Arrays and Limitations of the Diffusion Domain Approach: Theory and Experiment. *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, no. 25, pp. 11119-11125.
- GRIST, S.M., CHROSTOWSKI, L. y CHEUNG, K.C., 2010. Optical oxygen sensors for applications in microfluidic cell culture. *Sensors*, vol. 10, no. 10, pp. 9286-316.
- GRONDIN-PEREZ, B., BENNE, M. y CHABRIAT, J.P., 2006. Supervision of C crystallisation in Bois Rouge sugar mill using on-line crystal content estimation using synchronous microwave and refractometric brix measurements. *Journal of Food Engineering*, vol. 76, no. 4, pp. 639-645.
- GUERRERO, J., GUIASOLA, A. y BAEZA, J.A., 2011. The nature of the carbon source rules the competition between PAO and denitrifiers in systems for simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal. *Water Research*, vol. 45, no. 16, pp. 4793-4802.
- GUIEYSSE, B., HORT, C., PLATEL, V., MUNOZ, R., ONDARTS, M. y REVAH, S., 2008. Biological treatment of indoor air for VOC removal: potential and challenges. *Biotechnology advances*, vol. 26, no. 5, pp. 398-410.
- GUIMERA, A., GABRIEL, G., PLATA-CORDERO, M., MONTERO, L., MALDONADO, M.J. y VILLA, R., 2012. A non-invasive method for an in vivo assessment of corneal epithelium permeability through tetrapolar impedance measurements. *Biosensors & bioelectronics*, vol. 31, no. 1, pp. 55-61.
- GUIMERÀ, A., ILLA, X., TRAVER, E., PLATA-CORDERO, M., YESTE, J., HERRERO, C., LAGUNAS, C., MALDONADO, M.J. y VILLA, R., 2013. Flexible probe for in vivo quantification of corneal epithelium permeability through non-invasive tetrapolar impedance measurements. *Biomedical microdevices*, vol. 15, no. 5, pp. 849-58.
- GUIASOLA, A., BAEZA, J.A., CARRERA, J., SIN, G., VANROLLEGHEM, P.A. y LAFUENTE, J., 2006. The influence of experimental data quality and quantity on parameter estimation accuracy Andrews Inhibition Model as a Case Study. *Education for Chemical Engineers*, vol. 1, pp. 139-145.
- GUO, J., MA, F., CHANG, C.C., CUI, D., WANG, L., YANG, J. y WANG, L., 2009. Start-up of a two-stage bioaugmented anoxic-oxic (A/O) biofilm process treating petrochemical wastewater under different DO concentrations. *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 14, pp. 3483-3488.

- H**ANSMA, H.G., PIETRASANTA, L.I., AUERBACH, I.D., SORENSON, C., GOLAN, R. y HOLDEN, P.A., 2000. Probing biopolymers with the atomic force microscope: A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 11, no. 7, pp. 675-683.
- HENZE, M., GUJER, W., MINO, T. y LOOSDRECHT, M. Van, 2000. *Iwa Task Group on Mathematical Modelling for Design and*. London: IWA Publishing.
- HIBIYA, K., NAGAI, J., TSUNEDA, S. y HIRATA, A., 2004. Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 19, no. 1, pp. 61-68.
- HILLE, A., NEU, T.R., HEMPEL, D.C. y HORN, H., 2009. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 103, no. 6, pp. 1202-13.
- HINSON, R.K. y KOCHER, W.M., 1996. Model for effective diffusivities in aerobic biofilms. *Journal of Environmental Engineering*, vol. 122, no. November, pp. 1023-1030.
- HOEHLER, T.M., ALPERIN, M.J., ALBERT, D.B. y MARTENS, C.S., 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles*, vol. 8, no. 4, pp. 451-463.
- HOOIJMANS, C.M., GERAATS, S.G.M. y LUYBEN, K., 1990. Use of an microsensor for the determination of intrinsic kinetic parameters of an immobilized oxygen reducing enzyme. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 35, pp. 1078-1087.
- HORN, H. y HEMPEL, D.C., 1995. Mass transfer coefficients for an autotrophic and a heterotrophic biofilm system. *Water Science and Technology*, vol. 32, no. 8, pp. 199-204.
- HORN, H. y HEMPEL, D.C., 1997. Substrate utilization and mass transfer in an autotrophic biofilm system: Experimental results and numerical simulation. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 53, no. 4, pp. 363-71.
- HORN, H. y LACKNER, S., 2014. Modeling of Biofilm Systems: A Review. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 146, no. August, pp. 53-76.
- HORN, H. y MORGENROTH, E., 2006. Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chemical Engineering Science*, vol. 61, pp. 1347-1356.
- I**RANPOUR, R., COX, H.H.J., DESHUSSES, M.A. y SCHROEDER, E.D., 2005. Literature review of air pollution control biofilters and biotrickling filters for odor and volatile organic compound removal. *Environmental Progress*, vol. 24, no. 3, pp. 254-267.

- J**OHNSON, R.D., GAVALAS, V.G., DAUNERT, S. y BACHAS, L.G., 2008. Microfluidic ion-sensing devices. *Analytica Chimica Acta*, vol. 613, no. 1, pp. 20-30.
- JUHLER, S., REVSBECH, N.P., SCHRAMM, A., HERRMANN, M., OTTOSEN, L.D.M. y NIELSEN, L.P., 2009. Distribution and rate of microbial processes in an ammonia-loaded air filter biofilm. *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, no. 11, pp. 3705-13.
- K**ENNES, C., RENE, E.R. y VEIGA, M.C., 2009. Bioprocesses for air pollution control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 84, no. 10, pp. 1419-1436.
- KENNES, C. y THALASSO, F., 1998. Review: Waste gas biotreatment technology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 72, no. 4, pp. 303-319.
- KIM, S. y DESHUSSES, M.A., 2003. Development and Experimental Validation of a Conceptual Model for Biotrickling Filtration of H₂S. *Environmental Progress*, vol. 22, no. July, pp. 119-128.
- KIM, S. y DESHUSSES, M.A., 2008. Determination of mass transfer coefficients for packing materials used in biofilters and biotrickling filters for air pollution control. 1. Experimental results. *Chemical Engineering Science*, vol. 63, no. 4, pp. 841-855.
- KIM, T.G., LEE, E.-H. y CHO, K.-S., 2013. Effects of nonmethane volatile organic compounds on microbial community of methanotrophic biofilter. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, no. 14, pp. 6549-59.
- KLIMANT, I., KÜHL, M., GLUD, R.N. y HOLST, G., 1997. Optical measurement of oxygen and temperature in microscale: strategies and biological applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 38, no. 1-3, pp. 29-37.
- KLIMANT, I., MEYER, V. y KUHL, M., 1995. Fiberoptic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology. *Limnology and Oceanography*, vol. 40, no. 6, pp. 1159-1165.
- KOCINCOVA, A.S., BORISOV, S.M., KRAUSE, C. y WOLFBEIS, O.S., 2007. Fiberoptic microsensors for simultaneous sensing of oxygen and pH, and of oxygen and temperature. *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 22, pp. 8486-8493.
- KOHL, O., KLIMANT, I., HOLST, G. y KÜHL, M., 1997. Development and comparison of pH microoptodes for use in marine systems. *Proceedings of SPIE*. S.l.: s.n., pp. 82-94.
- KÜHL, M. y JORGENSEN, B.B., 1992. Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic

- biofilms. En: Estudi de perfils de H₂S, O₂ i pH en biofilms aerobis, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, no. 4, pp. 1164-1174.
- KÜHL, M., STEUCKART, C., EICKERT, G. y JEROSCHEWSKI, P., 1998. A H₂S microsensor for profiling biofilms and sediments : application in an acidic lake sediment. *Aquatic Microbiology Ecology*, vol. 15, pp. 201-209.
- LASSALLE, N., MAILLEY, P., VIEIL, E., LIVACHE, T., ROGET, A., CORREIA, J. y ABRANTES, L., 2001. Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as electroensors of DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 509, no. 1, pp. 48-57.
- LATTNER, D., FLEMMING, H.C. y MAYER, C., 2003. ¹³C-NMR study of the interaction of bacterial alginate with bivalent cations. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 33, no. 1-3, pp. 81-88.
- LAUCHNOR, E.G., SEMPRINI, L. y WOOD, B.D., 2014. Kinetic parameter estimation in *N.europaea* biofilms using a 2-D reactive transport model. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 112, no. 6, pp. 1-31.
- LAWRENCE, J.R. y NEU, T.R., 2003. Microscale analyses of the formation and nature of microbial biofilm communities in river systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 2, no. 2-4, pp. 85-97.
- LEE, J.-H., LIM, T.-S., SEO, Y., BISHOP, P.L. y PAPAUTSKY, I., 2007. Needle-type dissolved oxygen microelectrode array sensors for in situ measurements. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 128, no. 1, pp. 179-185.
- LEE, J.-H., SEO, Y., LIM, T.-S., BISHOP, P.L. y PAPAUTSKY, I., 2007. MEMS needle-type sensor array for in situ measurements of dissolved oxygen and redox potential. *Environmental science & technology*, vol. 41, no. 22, pp. 7857-63.
- LEE, W.C. y DE BEER, D., 1995. Oxygen and pH microprofiles above corroding mild-steel covered with a biofilm. *Biofouling*, vol. 8, no. 4, pp. 273 - 280.
- LEE, W.H., CHOI, W.H., GUO, X.F., HEINEMAN, W.R. y BISHOP, P.L., 2012. Material science chemistry of electrochemical microsensors and applications for biofilm research. *Key Engineering Materials*, vol. 521, pp. 113-139.
- LEE, W.H., LEE, J.-H., BISHOP, P.L. y PAPAUTSKY, I., 2009. Biological application of micro-electro mechanical systems microelectrode array sensors for direct measurement of phosphate in the enhanced biological phosphorous removal process. *Water Environment Research*, vol. 81, no. 8, pp. 748-754.
- LEE, W.H., LEE, J.-H., CHOI, W.-H., HOSNI, A.A., PAPAUTSKY, I. y BISHOP, P.L., 2011. Needle-type environmental microsensors: design, construction and uses of microelectrodes and multi-analyte MEMS sensor arrays. *Measurement Science and Technology*, vol. 22, no. 4, pp. 042001.

- LEE, W.H., WAHMAN, D.G. y PRESSMAN, J.G., 2013. Amperometric carbon fiber nitrite microsensor for in situ biofilm monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 188, pp. 1263-1269.
- LETE, C., LUPU, S., LAKARD, B., HIHN, J.Y. y DEL CAMPO, F.J., 2015. Multi-analyte determination of dopamine and catechol at single-walled carbon nanotubes - Conducting polymer - Tyrosinase based electrochemical biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 744, pp. 53-61.
- LEWANDOWSKI, Z. y BEYENAL, H., 2007. *Fundamentals of biofilm research*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0-84933541-8.
- LEWIS, W.K. y WHITMAN, W.G., 1924. Absorption symposium. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 16, no. 12, pp. 1215-1220.
- LIN, J.-S., CHEN, C.-C., DIAU, E.W.-G. y LIU, T.-F., 2008. Fabrication and characterization of eutectic gold-silicon (Au-Si) nanowires. *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 206, no. 1-3, pp. 425-430.
- LIU, S., CHEN, Y., FANG, F., XU, J., SHENG, G.-P., YU, H.-Q., LIU, G. y TIAN, Y.-C., 2009. Measurement of Dissolved Oxygen and Its Diffusivity in Aerobic Granules Using a Microelectrode Array. *Environmental Science & Technology*, vol. 43, no. 4, pp. 1160-1165.
- LIU, S.-Y., LIU, G., TIAN, Y.-C., CHEN, Y.-P., YU, H.-Q. y FANG, F., 2007. An innovative microelectrode fabricated using photolithography for measuring dissolved oxygen distributions in aerobic granules. *Environmental science & technology*, vol. 41, no. 15, pp. 5447-52.
- LIU, Y., NI, B.-J., GANIGUÉ, R., WERNER, U., SHARMA, K.R. y YUAN, Z., 2015. Sulfide and methane production in sewer sediments. *Water Research*, vol. 70, pp. 350-359.
- LÓPEZ, J.C., QUIJANO, G., SOUZA, T.S.O., ESTRADA, J.M., LEBRERO, R. y MUÑOZ, R., 2013. Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, no. 6, pp. 2277-303.
- LÓPEZ, L.R., 2016. *Development and application of control strategies in an aerobic biotrickling filters for H₂S removal from biogas streams: experimental and modelling study*. S.l.: Universitat Autònoma de Barcelona.
- LÓPEZ, L.R., BEZERRA, T., MORA, M., LAFUENTE, J. y GABRIEL, D., 2015. Influence of trickling liquid velocity and flow pattern in the improvement of oxygen transport in aerobic biotrickling filters for biogas desulfurization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, no. February, pp. n/a-n/a.
- LÓPEZ, L.R., DORADO, a. D., MORA, M., GAMISANS, X., LAFUENTE, J. y

- GABRIEL, D., 2016. Modeling an aerobic biotrickling filter for biogas desulfurization through a multi-step oxidation mechanism. *Chemical Engineering Journal*, vol. 294, pp. 447-457.
- LOY, A., 2003. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 1, pp. 514-516.
- LU, R. y YU, T., 2002. Fabrication and evaluation of an oxygen microelectrode applicable to environmental engineering and science. *Journal of Environmental Engineering and Science*, vol. 1, no. 3, pp. 225-235.
- LYAUTEY, E., LACOSTE, B., TEN-HAGE, L., ROLS, J.L. y GARABETIAN, F., 2005. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16 S rDNA PCR-DGGE: Methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*, vol. 39, no. 2-3, pp. 380-388.
- M**ANNUCCI, A., MUNZ, G., MORI, G. y LUBELLO, C., 2012. Biomass accumulation modelling in a highly loaded biotrickling filter for hydrogen sulphide removal. *Chemosphere*, vol. 88, no. 6, pp. 712-7.
- MANZ, B., VOLKE, F., GOLL, D. y HORN, H., 2003. Measuring Local Flow Velocities and Biofilm Structure in Biofilm Systems With Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 84, no. 4, pp. 424-432.
- MARZOUK, S.A.M., UFER, S., BUCK, R.P., JOHNSON, T.A., DUNLAP, L.A. y CASCIO, W.E., 1998. Electrodeposited iridium oxide pH electrode for measurement of extracellular myocardial acidosis during acute ischemia. *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 23, pp. 5054-5061.
- MATSON, J. V. y CHARACKLIS, W.G., 1976. Diffusion into microbial aggregates. *Water Environment Research*, vol. 10, no. 1973, pp. 877-885.
- MAYER, C., LATTNER, D. y SCHURKS, N., 2001. C-13 nuclear magnetic resonance studies on selectively labeled bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no. 1-2, pp. 62-69.
- MEAYS, C.L., BROERSMA, K., NORDIN, R. y MAZUMDER, A., 2004. Source tracking fecal bacteria in water: A critical review of current methods. *Journal of Environmental Management*, vol. 73, no. 1, pp. 71-79.
- MELO, L.F. y FRIAS, R.R., 2004. Biofilm physical structure , internal diffusivity and tortuosity. *Water Science and Technology*, vol. 52, no. 7, pp. 77-84.
- MIRPURI, R., JONES, W. y BRYERS, J.D., 1997. Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 53, no. 6, pp. 535-546.
- MITCHELL, D.A., VON MEIEN, O.F., KRIEGER, N. y DALSENTER, F.D.H., 2004.

- A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 17, no. 1, pp. 15-26.
- MONTEBELLO, A.M., FERNÁNDEZ, M., ALMENGLO, F., RAMÍREZ, M., CANTERO, D., BAEZA, M. y GABRIEL, D., 2012. Simultaneous methylmercaptan and hydrogen sulfide removal in the desulfurization of biogas in aerobic and anoxic biotrickling filters. *Chemical Engineering Journal*, vol. 200-202, pp. 237-246.
- MORA, M., LÓPEZ, L.R., GAMISANS, X. y GABRIEL, D., 2014. Coupling respirometry and titrimetry for the characterization of the biological activity of a SO-NR consortium. *Chemical Engineering Journal*, vol. 251, pp. 111-115.
- MORA, M., LÓPEZ, L.R., LAFUENTE, J., PÉREZ, J., KLEEREBEZEM, R., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., GAMISANS, X. y GABRIEL, D., 2016. Respirometric characterization of aerobic sulfide, thiosulfate and elemental sulfur oxidation by S-oxidizing biomass. *Water Research*, vol. 89, pp. 282-292.
- MUNZ, G., GORI, R., MORI, G. y LUBELLO, C., 2009. Monitoring biological sulphide oxidation processes using combined respirometric and titrimetric techniques. *Chemosphere*, vol. 76, no. 5, pp. 644-650.
- MURPHY, V.G., BARR, R.E. y HAHN, A.W., 1976. Control of electrode aging by a periodic anodization technique. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 75, pp. 69-75.
- NEU, T.R., WOELFL, S. y LAWRENCE, J.R., 2004. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *Journal of Microbiological Methods*, vol. 56, no. 2, pp. 161-172.
- NGUYEN, M.T., APPAN, A., TAN, D.S. y TAN, S.K., 2014. Influence of Small Water Surface Perturbations on the Reaeration Process. *Journal of Environmental Engineering*, vol. 140, pp. 1-7.
- NING, Y.-F., CHEN, Y.-P., LI, S., GUO, J.-S., GAO, X., FANG, F., SHEN, Y. y ZHANG, K., 2012. Development of an in situ dissolved oxygen measurement system and calculation of its effective diffusion coefficient in a biofilm. *Analytical Methods*, vol. 4, no. 8, pp. 2242.
- OHL, A.L., HORN, H. y HEMPEL, D.C., 2004. Behaviour of biofilm systems under varying hydrodynamic conditions. *Water Science and Technology*, vol. 49, no. 11-12, pp. 345-351.
- OKABE, S., ITOH, T., SATOH, H. y WATANABE, Y., 1999. Analyses of Spatial

- Distributions of Sulfate-Reducing Bacteria and Their Activity in Aerobic Wastewater Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 11, pp. 5107-5116.
- OKABE, S., SANTEGOEDS, C.M., WATANABE, Y. y DE BEER, D., 2002. Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in an activated sludge immobilized agar gel film. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 78, pp. 119-130.
- P**AGENDAM, D.E. y POLLET, P.K., 2009. Optimal sampling and problematic likelihood functions in a simple population model. *Environmental Modeling and Assessment*, vol. 14, pp. 759-767.
- PALITEIRO, C., 1994. (100)-Type behaviour of polycrystalline gold towards O₂ reduction. *Electrochimica Acta*, vol. 39, no. 11-12, pp. 1633-1639.
- PALMISANO, F., RIZZI, R., CENTONZE, D. y ZAMBONIN, P.G., 2000. Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 15, no. 9-10, pp. 531-539.
- PATERSON-BEEDLE, M., NOTT, K.P., MACASKIE, L.E. y HALL, L.D., 2001. Study of biofilm within a packed-bed reactor by three-dimensional magnetic resonance imaging. *Methods in Enzymology*, vol. 337, no. X, pp. 285-305.
- PERRY, R.H. y GREEN, D.W., 1997. Perry's chemical engineer's handbook. 7 Edition. S.I.: Mc Graw-Hill.
- PETERSEN, B., GERNAEY, K. y VANROLLEGHEM, P.A., 2002. Anoxic activated sludge monitoring with combined nitrate and titrimetric measurements. *Water Science and Technology*, vol. 45, no. 4-5, pp. 181-190.
- PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. y HEIJNEN, J.J., 1998. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 58, no. 1, pp. 101-16.
- PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. y HEIJNEN, J.J., 1999. Discrete-differential modelling of biofilm structure. *Water Science and Technology*, vol. 39, no. 7, pp. 115-122.
- PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. y HEIJNEN, J.J., 2000. A theoretical study on the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 68, no. 4, pp. 355-369.
- PRADES, L., GUIMERÀ, X., CLIMENT, J., CHIVA, S., DORADO, A.D. y GAMISANS, X., 2015. Coupling Hydrodynamics and Biodegradation Kinetics to

- Model Gas-Phase Biofiltration. Biotechniques for air pollution control 2015. S.l.: s.n.,
- PRADES, L., GUIMERA, X., GAMISANS, X. y DORADO, A.D., 2014. Exploring sulfur-oxidizing biofilms in a gas-phase flat-plate bioreactor under controlled pH. Mediterranean Congress of Chemical Engineering. S.l.: s.n., pp. 356.
- PRADO, Ó.J., REDONDO, R.M., LAFUENTE, J. y GABRIEL, D., 2009. Retrofitting of an Industrial Chemical Scrubber into a Biotrickling Filter: Performance at a Gas Contact Time below. Journal of Environmental Engineering, vol. 135, no. 5, pp. 359-366.
- PRATS-ALFONSO, E., ABAD, L., CASANÑ-PASTOR, N., GONZALO-RUIZ, J. y BALDRICH, E., 2013. Iridium oxide pH sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine samples. Biosensors and Bioelectronics, vol. 39, pp. 163-169.
- PREHN, R., ABAD, L., SÁNCHEZ-MOLAS, D., DUCH, M., SABATÉ, N., DEL CAMPO, F.J., MUÑOZ, F.X. y COMPTON, R.G., 2011. Microfabrication and characterization of cylinder micropillar array electrodes. Journal of Electroanalytical Chemistry, vol. 662, no. 2, pp. 361-370.
- R**ASMUSSEN, K. y LEWANDOWSKI, Z., 1998. Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms. Biotechnology and bioengineering, vol. 59, no. 3, pp. 302-9.
- REISS, L.P. y HANRATTY, T.J., 1963. An experimental study of the unsteady nature of the viscous sublayer. AIChE Journal, vol. 9, pp. 154-160.
- RENSLOW, R.S., MAJORS, P.D., MCLEAN, J.S., FREDRICKSON, J.K., AHMED, B. y BEYENAL, H., 2010. In situ effective diffusion coefficient profiles in live biofilms using pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance. Biotechnology and bioengineering, vol. 106, no. 6, pp. 928-37.
- REVSBECH, N.P., 2005. Analysis of microbial communities with electrochemical microsensors and microscale biosensors. Methods in enzymology, vol. 397, no. 2003, pp. 147-66.
- REVSBECH, N.-P. y JÖRGENSEN, B.B., 1986. Microelectrodes: Their use in microbial ecology. Advances in Microbial Ecology, vol. 9, pp. 293-352.
- REVSBECH, N.P., NIELSEN, L.P., CHRISTENSEN, P.B. y SORENSEN, J., 1988. Combined Oxygen and Nitrous Oxide Microsensor for Denitrification Studies. Appl. Envir. Microbiol., vol. 54, no. 9, pp. 2245-2249.
- REVSBECH, N.P., NIELSEN, L.P. y RAMSING, N.B., 1998. A novel microsensor for determination of apparent diffusivity in sediments. Limnology and Oceanography, vol. 43, no. 5, pp. 986-992.

- RODRIGUEZ, G., 2013. Eliminació de H₂S mitjançant biofiltres percoladors: millora de la transferència d'oxigen. S.l.: Universitat Politècnica de Catalunya.
- RODRIGUEZ, G., DORADO, A.D., BONSFILLS, A., SANAHUJA, R., GABRIEL, D. y GAMISANS, X., 2012. Optimization of oxygen transfer through venturi-based systems applied to the biological sweetening of biogas. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 87, no. 6, pp. 854-860.
- RODRIGUEZ, G., DORADO, A.D., FORTUNY, M., GABRIEL, D. y GAMISANS, X., 2014. Biotrickling filters for biogas sweetening: Oxygen transfer improvement for a reliable operation. *Process Safety and Environmental Protection*, vol. 92, no. 3, pp. 261-268.
- ROOSTA, A., JAHANMIRI, A., MOWLA, D. y NIAZI, A., 2011. Mathematical modeling of biological sulfide removal in a fed batch bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 58-59, pp. 50-56.
- ROOSTA, A., JAHANMIRI, A., MOWLA, D., NIAZI, A. y SOTOODEH, H., 2012. Optimization of biological sulfide removal in a CSTR bioreactor. *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 35, no. 6, pp. 1005-10.
- S**ANTEGOEDS, C.M., FERDELMAN, T.G., MUYZER, G. y BEER, D. De, 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Applied and environmental microbiology*, vol. 64, no. 10, pp. 3731-3739.
- SANTEGOEDS, C.M., SCHRAMM, A. y DE BEER, D., 1998. Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs. *Biodegradation*, vol. 9, no. 3-4, pp. 159-167.
- SANTOS, A., GUIMERÀ, X., DORADO, A.D., GAMISANS, X. y GABRIEL, D., 2014. Conversion of chemical scrubbers to biotrickling filters for VOCs and H₂S treatment at low contact times. *Applied microbiology and biotechnology*,
- SAUER, K., 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome biology*, vol. 4, no. 6, pp. 219.
- SCHRAMM, A., LARSEN, L.H., REVSBECH, N.P., RAMSING, N.B., AMANN, R. y SCHLEIFER, K.H., 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and environmental microbiology*, vol. 62, no. 12, pp. 4641-7.
- SCHÜRKS, N., WINGENDER, J., FLEMMING, H.C. y MAYER, C., 2002. Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 30, no. 2, pp. 105-111.
- SCHWERMER, C.U., LAVIK, G., ABED, R.M.M., DUNSMORE, B., FERDELMAN, T.G., STOODLEY, P., GIESEKE, A. y DE BEER, D., 2008. Impact of nitrate on the structure and function of bacterial biofilm communities in pipelines used for

- injection of seawater into oil fields. *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, no. 9, pp. 2841-51.
- SEYMOUR, J.D., CODD, S.L., GJERSING, E.L. y STEWART, P.S., 2004. Magnetic resonance microscopy of biofilm structure and impact on transport in a capillary bioreactor. *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 167, no. 2, pp. 322-327.
- STEWART, P.S., 2003. Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology*, vol. 185, no. 5, pp. 1485-1491.
- STEWART, P.S., MURGA, R., SRINIVASAN, R. y DE BEER, D., 1995. Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water research*, vol. 29, no. 8, pp. 2006-2009.
- STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z. y DE BEER, D., 1994. Liquid Flow in Biofilm Systems. *Applied and environmental microbiology*, vol. 60, no. 8, pp. 2711-2716.
- STOODLEY, P., YANG, S., LAPPIN-SCOTT, H. y LEWANDOWSKI, Z., 1997. Relationship Between mass transfer coefficient and liquid flow velocity in heterogenous biofilms using microelectrodes and confocal microscopy. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 56, no. 6, pp. 681-688.
- STRATHMANN, M., WINGENDER, J. y FLEMMING, H.C., 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 50, no. 3, pp. 237-248.
- SUZUKI, H., 2000. Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring. *Materials Science and Engineering C*, vol. 12, pp. 55-61.
- T**AN, T.W. y NG, H.Y., 2008. Influence of mixed liquor recycle ratio and dissolved oxygen on performance of pre-denitrification submerged membrane bioreactors. *Water Research*, vol. 42, no. 4-5, pp. 1122-1132.
- U**CINSKI, D. y PATAN, M., 2007. D-optimal design of a monitoring network for parameter estimation of distributed systems. *Journal of Global Optimization*, vol. 39, no. 2, pp. 291-322.
- V**AN GROENESTIJN, J.W. y LAKE, M.E., 1999. Elimination of Alkanes from Off-gases Using Biotrickling Filters Containing Two Liquid Phases. *Environmental Progress*, vol. 18, no. 3, pp. 151-155.
- W**ANG, X. y WOLFBEIS, O.S., 2014. Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications. *Chemical Society reviews*, vol. 43, pp. 3666-761.

- WANG, Z.-W., LIU, Y. y TAY, J.-H., 2005. Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 69, no. 4, pp. 469-473.
- WÄSCHE, S., HORN, H. y HEMPEL, D.C., 2002. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water research*, vol. 36, no. 19, pp. 4775-84.
- WICK, L.M., WEILENMANN, H. y EGLI, T., 2002. The apparent clock-like evolution of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostats is reproducible at large but not at small population sizes and can be explained with Monod kinetics. *Microbiology*, vol. 148, no. 9, pp. 2889-2902.
- WOLF, G., CRESPO, J.G. y REIS, M.A.M., 2002. Optical and spectroscopic methods for bio film examination and monitoring. *Review Literature And Arts Of The Americas*, pp. 227-251.
- WOLFF, C.M. y MOTTOLA, H.A., 1978. Enzymic substrate determination in closed flow-through systems by sample injection and amperometric monitoring of dissolved oxygen levels. En: Cited By (since 1996):1Export Date: 6 June 2013Source: Scopus, *Analytical Chemistry*, vol. 50, no. 1, pp. 94-98.
- WU, C.-C., YASUKAWA, T., SHIKU, H. y MATSUE, T., 2005. Fabrication of miniature Clark oxygen sensor integrated with microstructure. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 110, no. 2, pp. 342-349.
- WUERTZ, S., OKABE, S. y HAUSNER, M., 2004. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: An overview. 2004. S.l.: s.n.
- XU**, X.-Y., FENG, L.-J., ZHU, L., XU, J., DING, W. y QI, H.-Y., 2012. Biofilm formation and microbial community analysis of the simulated river bioreactor for contaminated source water remediation. *Environmental science and pollution research international*, vol. 19, no. 5, pp. 1584-93.
- YANG**, S. y LEWANDOWSKI, Z., 1995. Measurement of local mass transfer coefficient in biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 48, no. 6, pp. 737-44.
- YANG, Y., TADA, C., MIAH, M.S., TSUKAHARA, K., YAGISHITA, T. y SAWAYAMA, S., 2004. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Materials Science and Engineering C*, vol. 24, no. 3, pp. 413-419.
- YURT, N., BEYENAL, H., SEARS, J. y LEWANDOWSKI, Z., 2003. Quantifying selected growth parameters of *Leptothrix discophora* SP-6 in biofilms from oxygen concentration profiles. *Chemical Engineering Science*, vol. 58, no. 20, pp. 4557-

4566.

- YURT, N., SEARS, J. y LEWANDOWSKI, Z., 2002. Multiple substrate growth kinetics of *Leptothrix discophora* SP-6. *Biotechnology progress*, vol. 18, no. 5, pp. 994-1002.
- Z**HANG, S., CHEN, H., XIA, Y., LIU, N., LU, B.-H. y LI, W., 2014. Current advances of integrated processes combining chemical absorption and biological reduction for NO_x removal from flue gas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 98, no. 20, pp. 8497-8512.
- ZHANG, T. y FANG, H.H.P., 2001. Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters*, no. February, pp. 405-409.
- ZHANG, T.C. y BISHOP, P.L., 1994a. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Research*, vol. 28, no. 11, pp. 2267-2277.
- ZHANG, T.C. y BISHOP, P.L., 1994b. Evaluation of tortuosity factors and effective diffusivities in biofilms. *Water Research*, vol. 28, no. I, pp. 2279-2287.
- ZHANG, T.C. y BISHOP, P.L., 1995. Experimental determination of the dissolved oxygen boundary layer and mass transfer resistance near the fluid-biofilm interface. *Water Science & Technology*, vol. 30, no. 11, pp. 47-58.
- ZHANG, Z., SZITA, N., BOCCAZZI, P., SINSKEY, A.J. y JENSEN, K.F., 2006. A well-mixed, polymer-based microbioreactor with integrated optical measurements. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 93, no. 2, pp. 286-296.
- ZHOU, X.-H., LIU, J., SONG, H.-M., QIU, Y.-Q. y SHI, H.-C., 2012. Estimation of Heterotrophic Biokinetic Parameters in Wastewater Biofilms from Oxygen Concentration Profiles by Microelectrode. *Environmental Engineering Science*, vol. 29, no. 6, pp. 466-471.
- ZHOU, X.-H., QIU, Y.-Q., SHI, H.-C., YU, T., HE, M. y CAI, Q., 2009. A new approach to quantify spatial distribution of biofilm kinetic parameters by in situ determination of oxygen uptake rate (OUR). *Environmental science & technology*, vol. 43, no. 3, pp. 757-63.
- ZHOU, X.-H., SHI, H.-C., CAI, Q., HE, M. y WU, Y.-X., 2008. Function of self-forming dynamic membrane and biokinetic parameters' determination by microelectrode. *Water research*, vol. 42, no. 10-11, pp. 2369-76.
- ZHU, X., SUIDAN, M.T., ALONSO, C., YU, T., KIM, B.J. y KIM, B.R., 2001. Biofilm structure and mass transfer in a gas phase trickle-bed biofilter. *Water Science and Technology*, vol. 43, no. 1, pp. 285-293.