



MODELO BIDIMENSIONAL BASADO EN AUTÓMATAS CELULARES PARA BIOFILMS MULTIESPECIES

CAROLINA GARCÍA, GONZALO PIZARRO, ROLANDO MORENO Y MARCOS
SEPÚLVEDA.

Depto. Ingeniería Hidráulica y Ambiental, P. Universidad Católica de Chile.
Av. Vicuña Mackenna 4860. Casilla 306 Correo 22, Santiago, Chile.

Teléfono: 6864873; Fax: 6865876

e-mail: cpgarcia@puc.cl

RESUMEN

La heterogeneidad microbiana y estructural se presenta en casi cualquier sistema de biofilm. En su mayoría los diseños de sistemas de biofilm los consideran como sistemas homogéneos y de densidad constante. Para poder representar esta heterogeneidad y mejorar el diseño de los modelos, se necesita incorporar el efecto de la materia inerte dentro del biofilm y una estructura heterogénea. Se presenta un modelo multidimensional mejorado basado en autómatas celulares (AC), que sirvió para simular un biofilm 2D con biomasa activa e inerte incluyendo un desarrollo auto organizado. Los resultados muestran que la presencia de biomasa inerte no altera el flujo de substrato hacia al biofilm debido a que la biomasa activa se sitúa en la superficie del biofilm. Simulaciones de largo plazo revelaron que aunque el biofilm es altamente heterogéneo y su microestructura está constantemente cambiando, éste llega a una condición estacionaria dinámica en donde el espesor y el flujo de substrato se estabilizan dentro de un rango

ABSTRACT

Structural and microbial heterogeneity occurs in almost any type of biofilm system. General approaches for the design of biofilm systems consider biofilms as homogeneous and of constant thickness. In order to improve the design of biofilms systems, models need to incorporate structural heterogeneity and the effect of inert microbial mass. We have improved a 2D biofilm model based on Cellular Automata (CA) and used it to simulate multidimensional biofilms with active and inert biomass including a self-organizing development. Results indicate that the presence of inert biomass within biofilm structures does not change considerably the substrate flux into the biofilm because the active biomass is located at the surface of the biofilm. Long-term simulations revealed that although the biofilm system is highly heterogeneous and the microstructure is continuously changing, the biofilm reaches a dynamic steady-state with prediction of biofilm thickness and substrate flux stabilizing on a delimited range.



MODELO BIDIMENSIONAL BASADO EN AUTÓMATAS CELULARES PARA BIOFILMS MULTIESPECIES

1 Introducción

Se ha demostrado que en casi todo tipo de sistema de biofilms se encuentra heterogeneidad estructural y microbiana. La mayoría de los diseños para sistemas de biofilms los consideran heterogéneos y de espesor constante. (Sáez y Rittmann 1992; Williamson y McCarty 1976). Los modelos más desarrollados incorporan esta heterogeneidad, sin embargo consideran un biofilm unidimensional. (Rittmann y Manem 1992; Wanner y Gujer 1986; Wanner y Reichert 1996). Para mejorar el diseño de los sistemas de biofilm es imprescindible que los modelos incorporen la heterogeneidad estructural que se presenta en los biofilms. Un factor importante para el diseño de sistemas de biofilm es el proceso de desprendimiento de bacterias. Para el modelo unidimensional el desprendimiento se supone como un término de primer orden sumado al coeficiente de decaimiento. Sin embargo esta forma de representar el desprendimiento no toma en cuenta la ubicación de células específicas dentro del biofilm. Un modelo de biofilm estructuralmente heterogéneo, puede representar el desprendimiento como consecuencia natural del decaimiento de las bacterias que forman el biofilm y no necesita agregar un coeficiente de desprendimiento. (Pizarro 2001).

Una de las características más importantes del modelo multiespecies es la incorporación del destino de la materia inerte que se forma al decaer la biomasa. Para los modelos unidimensionales la materia inerte se acumula cerca del substratum mientras que la biomasa activa se agrupa sobre ésta, cerca de la superficie (Rittmann y Manem 1992; Wanner y Gujer 1986; Wanner y Reichert 1996). Como el coeficiente de separación se aplica a todas las células dentro del biofilm se puede obtener un estado estacionario con un alto máximo de biofilm. Para el modelo de biofilm con heterogeneidad estructural, el desprendimiento se modela como la pérdida de contacto entre las células y el substratum, por esto, cuando se incorporan las células inactivas, no hay un mecanismo que remueva las que quedan cerca del substratum, lo que resulta en un biofilm siempre creciente.

Usando técnicas experimentales, investigadores han logrado elucidar algunas implicancias de los procesos de muerte y lisis, como son; la disminución de la densidad del biofilm en las capas profundas (Bishop et al. 1995), la formación de cavidades dentro del biofilm y la contracción de éste (Ohashi y Harada 1996). Esto sugiere que la biomasa inerte debe en algún momento perder sus propiedades, dejando las capas profundas del biofilm abiertas y permitiendo que ocurra desprendimiento. Por ende, los principales avances dentro del modelo que se presenta, son la incorporación de formación de biomasa inerte dentro de un biofilm estructuralmente heterogéneo; la incorporación de mecanismos para el decaimiento de la biomasa inerte (en términos de sus propiedades mecánicas) e incluir un desarrollo auto organizado de la estructura del biofilm. Esto se logra a través de un modelo bidimensional de biofilm, basado en autómatas celulares (AC) (Pizarro et al. 2001).



2 Modelo matemático

El modelo de biofilm basado en AC presentado describe el substrato y la biomasa como partículas discretas, existiendo e interactuando en un dominio bidimensional específico. La difusión molecular se simula mediante el movimiento en forma aleatoria de las partículas de substrato. La concentración de substrato en un lugar específico está representada por la densidad de partículas de substrato en su vecindario. Los microorganismos activos dentro del biofilm pueden crecer adheridos al substratum o a otro microorganismo, pueden consumir partículas de substrato y duplicarse si consumen suficiente cantidad de substrato.

Las partículas microbianas inertes no consumen substrato y pueden servir como soporte para partículas microbianas activas. La dinámica del sistema se simula usando procesos estocásticos que representan la ocurrencia de un evento específico determinado; como la difusión de substrato; la utilización de substrato; crecimiento del biofilm y decaimiento del biofilm (materia activa e inerte). El desprendimiento es una consecuencia natural de la dinámica de la simulación y se determina evaluando la conectividad de las células al substratum. La difusión y los eventos reactivos y de reacción, se separan de los eventos de crecimiento y decaimiento usando el concepto de tiempos característicos (Kissel et al. 1984).

- El modelo considera sólo un substrato limitante.
- El biofilm se compone de dos tipos de bacteria: inerte y activa.
- Cuando una partícula activa decae, tiene una probabilidad de convertirse en una partícula inerte o de desaparecer del dominio físico.
- Las partículas de biomasa inerte tienen una probabilidad de desaparecer del dominio físico.
- La probabilidad de consumo de una partícula de substrato depende de la concentración de partículas de substrato en su vecindario.
- La capa límite se asume paralela al substratum y tiene un ancho mínimo definido, que se mide desde el seno del líquido al máximo espesor del biofilm simulado.

Una descripción detallada del modelo basado en AC de biofilm, al igual que la definición de las condiciones de borde y las relaciones con los parámetros físicos y cinéticos se puede encontrar en Pizarro et al. (2001).

3 Resultados del modelo

Las simulaciones fueron realizadas usando los parámetros típicos para biofilms heterótrofos (Sáez y Rittmann 1992), los cuales se muestran en la Tabla 1. La formación de biomasa inerte considera la fracción no biodegradable de biomasa ($1-f_d$) (Laspidou y Rittmann 2002). Para incorporar la pérdida de resistencia estructural de la biomasa inerte se utilizó una tasa de decaimiento de biomasa inerte (b_{inac}).

Se realizaron tres clases de simulaciones con valores diferentes de formación y decaimiento de biomasa inerte. Los valores de los parámetros para las tres simulaciones realizadas se encuentran en la Tabla 2. El caso A sólo incluye decaimiento endógeno sin formación de inertes por lo que la biomasa activa desaparece del dominio físico. El caso B y C consideran que una parte de la biomasa activa que decae, formará biomasa inerte a una tasa r_{inert_f} (ecuación 1, donde b es el coeficiente de decaimiento y X_f es la densidad de biomasa activa). Para el caso B, parte de la biomasa inerte desaparecerá del dominio físico a una tasa de r_{inert_d} (ecuación 2



donde X_i es la densidad de biomasa inerte) mientras que para el caso C la biomasa inerte se acumulará ya que $r_{inert_d} \neq 0$.

Tabla 1 Parámetros usados para la simulación de un biofilm estructuralmente heterogéneo.

Parámetro	Valor	Unidades
\hat{q}	8.0	mg/mg-día
K_s	10.0	mg/L
Y	0.5	mg/mg
b	0.1	día ⁻¹
D_l	0.8	cm ² /día
D_f	0.64	cm ² /día

Tabla 2 Valores para los parámetros f_d y b_{inac} para las tres simulaciones analizadas.

Parámetro	Caso A	Caso B	Caso C
f_d	1	0.8	0.8
b_{inac} (d ⁻¹)	0	0.1	0

$$r_{inert_f} = b(1 - f_d)X_f \quad (1)$$

$$r_{inert_d} = b_{inac} X_i \quad (2)$$

Los resultados muestran que las predicciones de flujo de substrato hacia el biofilm en estado estacionario son similares en los tres casos simulados por el modelo (A; B y C). Esta similitud se debe a las estructuras heterogéneas y la distribución de la biomasa activa en la parte externa del biofilm (figura 1). Sin embargo el patrón de biofilm desprendimiento cambia. Se observó también que la distribución de la biomasa en la profundidad del biofilm cambiaba a medida que el tiempo se incrementaba (datos no mostrados). La figura 1 también muestra la densidad normalizada de biomasa inerte y activa con la profundidad del biofilm.

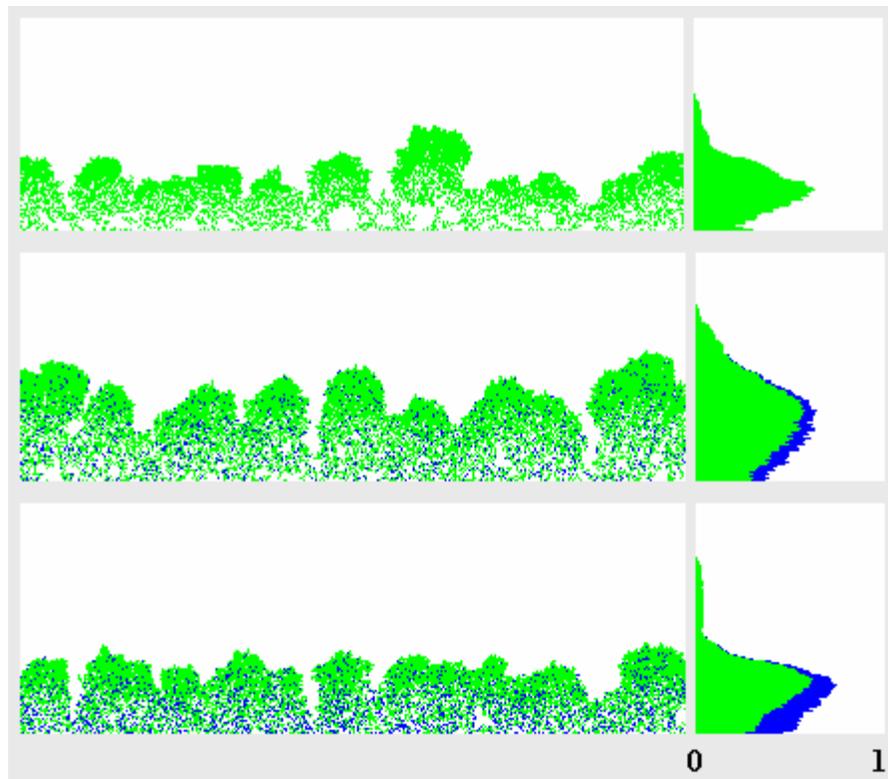


Figura 1. Foto de la estructura del biofilm al cabo de 15 días de simulación para el caso A) sin producción de biomasa inerte, B) con producción de biomasa inerte y $b_{inac} = 0.1$ y C) con producción de biomasa inerte y $b_{inac} = 0$. La biomasa inerte se muestra en el color más oscuro en los paneles B y C. A la derecha de cada panel se muestra la densidad normalizada a diferentes alturas del biofilm

En cuanto a resultados anteriores (Pizarro et al. 2001), las simulaciones a largo plazo habían revelado que, aunque el sistema es altamente heterogéneo y la microestructura va variando en el tiempo, el biofilm llega a un estado estacionario dinámico en donde las predicciones de altura de biofilm y flujo de substrato se estabilizan dentro de un rango delimitado (Figura 2 luego de 50 días de simulación). Se puede apreciar que esto no se aplica totalmente para la simulación del caso C, debido a que el alto del biofilm es siempre creciente aunque el flujo de substrato hacia al biofilm se mantiene bastante constante.

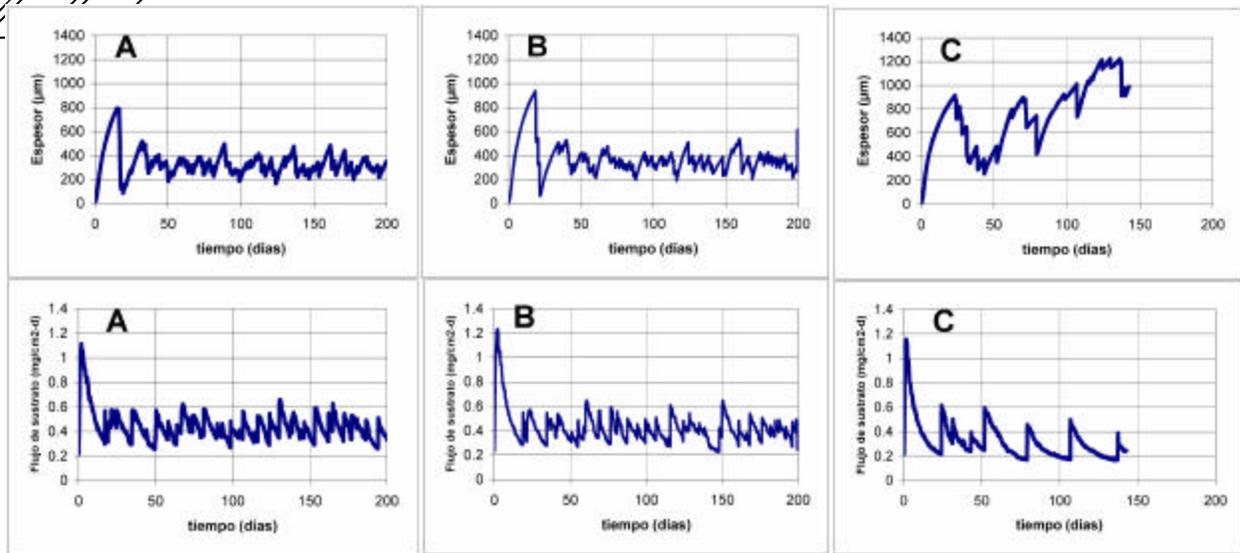
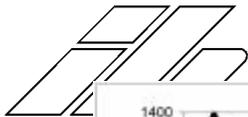


Figura 2. Altura promedio del biofilm y/o flujo de sustrato hacia el biofilm a través del tiempo para los casos A) sin producción de biomasa inerte, B) con producción de biomasa inerte y $b_{inac} = 0.1$ y C) con producción de biomasa inerte y $b_{inac} = 0$.

4 Conclusiones y/o Comentarios

El modelo de AC presentado confirma el concepto de estado estacionario dinámico y la importancia de la auto organización dentro de la formación de la estructura del biofilm. Los resultados de las simulaciones demostraron que la presencia de biomasa inerte dentro de la estructura del biofilm no cambia considerablemente el flujo de sustrato hacia el biofilm debido a que la materia activa se situaba mayoritariamente en la superficie del biofilm.

La Tabla 3 presenta para los tres casos simulados (A, B y C), los valores de la densidad de biomasa (activa e inerte) por unidad de área (M_{act} and M_{inert}). Se puede apreciar que la cantidad de biomasa activa es similar en los tres casos y lo que cambia es la cantidad de biomasa inerte presente.

Tabla 3 Valores de los tres casos A, B y C, para los parámetros de las simulaciones en estado estacionario

Parámetros	A	B	C
J_b (mg/cm ² día)	0,42	0,37	0,27
L_f (μm)	312	334	863
M_{act} (mg/cm ²)	0,93	0,96	0,97
M_{inert} (mg/cm ²)	0,00	0,12	0,71

Para un biofilm con heterogeneidad estructural, la única forma de obtener un biofilm finito es que ocurra el desprendimiento. En el modelo que se presenta, esto se obtuvo mediante la adición de un nuevo parámetro de primer orden b_{inac} , que representa la pérdida de resistencia estructural de la biomasa inerte, lo que deja que ocurra desprendimiento. De esta forma los biofilms pueden alcanzar un estado



estacionario dinámico en donde tienen flujos de sustrato hacia el biofilm similares a los encontrados en simulaciones sin formación de biomasa inerte y con alturas de biofilm finitas. La densidad del biofilm varía con la profundidad, según las observaciones hechas por Bishop y sus colegas (Bishop et al. 1995), aunque cambia continuamente debido a los eventos de desprendimiento que ocurren.

5 Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por FONDECYT (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico proyecto 1020736) y por el fondo para investigadores jóvenes de la Fundación Andes (C-13760).

6 Referencias

BISHOP, P. L., ZHANG, T. C., y FU, Y. C. Effects of biofilm structure, microbial distributions and mass transport on biodegradation processes. *Water Science and Technology*, 31(1), 143-152, 1995.

KISSEL, J. C., MCCARTY, P. L., y STREET, R. L. Numerical Simulation of Mixed-Culture Biofilm. *Journal of Environmental Engineering*, 110(2), 393-411, 1984.

LASPIDOU, C. S., y RITTMANN, B. E. Non-steady state modeling of extra cellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, 36(8), 1983-1992, 2002.

OHASHI, A., y HARADA, H. A novel concept for evaluation of biofilm adhesion strength by applying tensile force and shear force. *Water Science and Technology*, 34(5-6), 201-211, 1996.

PIZARRO, G. E. Quantitative Modeling of Heterogeneous Biofilms using Cellular Automata. Tesis de Doctorado. University of Wisconsin, Madison, 2001.

PIZARRO, G. E., GRIFFEATH, D., y NOGUERA, D. R. Quantitative cellular automaton model for biofilms. *Journal of Environmental Engineering, ASCE*, 127(9), 782-789, 2001.

RITTMANN, B. E., y MANEM, J. A. Development and experimental evaluation of a steady-state, multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(9), 914-922, 1992.

SÁEZ, P. B., y RITTMANN, B. E. Accurate Pseudoanalytical Solution for Steady-State Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(7), 790-793, 1992.

WANNER, O., y GUJER, W. A multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(3), 314-328, 1986.

WANNER, O., y REICHERT, P. Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(2), 172-184, 1996.

WILLIAMSON, K., y MCCARTY, P. L. A model of substrate utilization by bacterial films. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 48(1), 9-24, 1976.