

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR ESTERILIZABLE Y DE
BAJO COSTO PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE
MICROORGANISMOS**

ERIKA VIVIANA MORENO RIVERA
DANIEL FERNANDO VANEGAS GUTIERREZ

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
BOGOTÁ D.C, COLOMBIA
2017**

ERIKA VIVIANA MORENO RIVERA
DANIEL FERNANDO VANEGAS GUTIERREZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de

LICENCIADO EN QUÍMICA

DIRECTORES:

JUAN DANIEL VALDERRAMA

Ingeniero Químico de la Universidad Nacional de Colombia
Doctor en Ingeniería Química de la Universidad de Cornell

JOSUÉ ANSELMO GARCIA ORTÍZ

Químico Universidad Nacional de Colombia.

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
BOGOTÁ D.C, COLOMBIA
2017

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. OBJETIVOS.....	12
4. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	13
4.1 Biorreactor.....	13
4.1.1¿Qué es un biorreactor?	13
4.1.2 Método de operación.....	13
4.1.3 Clasificación	14
4.1.4Sistemas de acople	16
4.1.5 Agitación	18
4.1.6 Mezclado	18
4.1.7 Materiales para la construcción de Biorreactores	19
4.1.8 Aplicaciones de Biorreactores	19
4.2 Bacterias	20
4.2.1Generalidades.....	20
4.2.2 Crecimiento.....	21
4.2.2.1Fases de crecimiento	21
4.2.3 Requerimientos para el crecimiento de E. coliMC4100.....	22
5. METODOLOGÍA	23
5.1 Generalidades.....	23
5.2 Diseño de biorreactor air-lift.....	23
5.2.1 Selección de las variables de control y medida	23
5.2.2 Desarrollo de métodos para las variables establecidas de control y medida.	23
5.2.3 Desarrollo de suministro de fuente de Oxígeno y nutrientes para el crecimiento de E. coliMC4100.....	27
5.2.4 Determinación de requisitos para la selección de recipiente y materiales adecuados en su construcción.....	28

5.2.5	Desarrollo del método de mezclado	31
5.2.6	Desarrollo de una bomba peristáltica para la reposición de agua evaporada. 31	
5.3	Optimización de los métodos de cultivo	32
5.3.1	Crecimiento y comprobación de la esterilidad de la bacteria E. coliMC4100 en medio LB	32
5.4	Ajustes finales al biorreactor para el crecimiento de E. coliMC4100.	32
5.5	Prueba de esterilidad en el biorreactor.....	33
5.6	Seguimiento y estudio del crecimiento deE. coliMC4100, en el biorreactor ya conformado.....	33
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	35
6.1	Diseño de biorreactor air-lift.....	35
6.2	Variables de control y medida	35
6.3	Materiales para el diseño del biorreactor.....	38
6.4	Prueba de esterilidad.....	40
6.5	Elección de E. coliMC4100 como microorganismo modelo.....	42
6.6	Crecimiento de E. coliMC4100	42
6.7	Análisis de costos.....	47
7.	CONCLUSIONES	49
8.	RECOMENDACIONES.....	50
9.	AGRADECIMIENTOS	52
10.	RECURSOS DISPONIBLES	53
11.	CRONOGRAMA	54
12.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>56</u>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. *Materiales y especificaciones de los sistemas sometidos a esterilización.*

Tabla 2. *Resultados de densidad celular en la prueba de esterilidad.*

Tabla 3. *Medida inicial y final de densidad celular de la prueba de crecimiento II.*

Tabla 4. *Costos de los materiales empleados en la construcción del BR.*

Tabla 5. *Características fotobiorreactores de referencia..*

Tabla 6. *Cronograma de actividades.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un reactor air-lift.

Figura 2. Tipos de bioreactores air-lift.

Figura 3. Fases de crecimiento bacteriano.

Figura 4. Sistemas electrónicos: temperatura, intensidad lumínica, reposición de agua.

Figura 5. Hornilla de calentamiento.

Figura 6. Sonda para la medición de temperatura.

Figura 7. Sistema de muestreo.

Figura 8. Filtro hidrófobo.

Figura 9. Recipiente usado como BR.

Figura 10. Empaque de caucho siliconado.

Figura 11. Riser: pieza que facilita el flujo uniforme del cultivo. Tiene soportes en las paredes para centrarlo.

Figura 12. Bomba peristáltica.

Figura 13. Disposición de los sistemas en la tapa hermética.

Figura 14. Biorreactor con sus sistemas acoplados: aireación, muestreo, mezclado y de control.

Figura 15. Prueba de esterilidad en caja de Petri.

Figura 16. Ensayos de crecimiento de *E. coli*MC4100, se presentaron el seguimiento de tres ensayos a. Rombos, b. Cuadros, c. Rectángulos.

Figura 17. Curva de crecimiento promedio *E. coli*MC4100; presenta barras de error a partir de la desviación estándar.

Figura 18. Seguimiento del cultivo de *E. coli*MC4100 en el BR puesto en marcha.

Figura 19. Tinción de Gram de muestra tomada del BR luego del periodo de operación. Vista en un microscopio óptico. Foto tomada y ampliada.

LISTA DE ABREVIATURAS

BR: *Biorreactor*

FBR: *Fotobiorreactor*

PVC: *Policloruro de vinilo*

GRESIA: *Grupo de Investigación en Recursos, Ecología, Desarrollo Sostenible e Ingeniería Ambiental*

UAN: *Universidad Antonio Nariño*

LDR: *light dependent resistor*

PSI: *PhotonSystems Instruments*

RESUMEN

Los microorganismos son objeto de interés debido a campos de investigación como biocombustibles, obtención de productos, tratamiento de aguas residuales, biorremediación de suelos y agua, entre otros. Estos se presentan como soluciones y/o alternativas autosustentables a diversas problemáticas ambientales, por esta razón, para tener un alcance de esta envergadura, es necesaria su implementación a nivel industrial; lo que requiere la obtención de biomasa en cantidades considerables.

A partir de esto, el desarrollo de estas biotecnologías va de la mano del uso de biorreactores, en los cuales se lleva a cabo el cultivo de dichos microorganismos y cuya función es, en principio, optimizar sus condiciones de operación con el fin de aumentar la velocidad de crecimiento y así, la producción de biomasa. Estos biorreactores son actualmente comercializados para su uso en investigación, sin embargo, tienen precios muy elevados, esto limita el desarrollo de sus estudios.

Así, este estudio se dio debido a la necesidad de hacer posible estos estudios con inversiones considerablemente menores para la adquisición de biorreactores, encaminado a aumentar las investigaciones relacionadas que contribuyan en los avances biotecnológicos que están involucrados.

La presente investigación se planteó como fin el diseño y construcción de un biorreactor de bajo costo, capaz de hacer seguimiento a variables de control (temperatura e iluminación) y medida (pH, intensidad lumínica y densidad óptica) y además mantener libre de contaminación para el estudio de cultivos de microorganismos. Para esto se desarrollaron sistemas de control y medida, que permitieran la obtención y seguimiento de las condiciones óptimas para un rápido crecimiento celular. Puesto a punto con ayuda de un microorganismo modelo (*E. coli MC4100*), a quien se le hizo seguimiento a su velocidad de crecimiento y esterilidad del cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente son innegables los diferentes problemas medio ambientales que se tratan alrededor del mundo, estos han pasado desde una concepción básica referente a un cambio climático, hasta tener efectos en diversos ámbitos de nuestra vida diaria, tales como la contaminación de la atmósfera, suelos y fuentes hídricas, muchos de estos siendo producto de residuos peligrosos no biodegradables. Además interminables daños a causa de sobreexplotación y pérdida de la biodiversidad fruto de la deforestación. Estos contribuyen a acelerar los diferentes impactos del planeta en donde se ve comprometida la capacidad de resiliencia del ecosistema(1).

A pesar de los diversos esfuerzos para concientizar a las entidades gubernamentales respecto a dichas problemáticas (Global 2000, 1977; Cumbre de la Tierra Río, 1992; Carta de la Tierra, 2000; Cumbre Río+10, 2002; COP 15, 2009), son escasos los cambios que realmente se han puesto en práctica para disminuir las consecuencias negativas causadas al medio ambiente.

En vista de una necesidad clara de tener un cambio drástico en las bases de la sociedad, para hacer una transición a un modelo más óptimo, desde hace más de una década han empezado a surgir nuevas iniciativas de tecnologías amigables con el medio ambiente que prometen ser en un futuro autosustentables, sin comprometer la calidad de su función en la cual se desenvuelve.

Desde los años 70 el cultivo de microorganismos ha tenido un considerable aumento, consecuencia de su capacidad de producir diversos productos de valor añadido (nutrición, farmacia, química fina, entre otros) y principalmente como alternativa de los combustibles fósiles tradicionales (producción de biodiesel, bioetanol, biohidrógeno y biometano), debido a su alto contenido lipídico (2). Es por ello que la producción masiva de las microorganismos (bacterias y microalgas, principalmente) es de gran interés. El crecimiento de microalgas se lleva a cabo en biorreactores, los cuales desde mediados del siglo XX han experimentado diversos cambios con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa.

En la actualidad las investigaciones que trabajan cultivos de microorganismos se desarrollan en biorreactores de diferentes tipos, en esencia estos tienen el mismo

principio y funcionamiento. Aquellos que se encuentran comercialmente a la venta permiten controlar condiciones de temperatura, pH, flujos de entrada y salida, esterilidad, además de medición de variables como concentración de dióxido de carbono y oxígeno, sin embargo estos son muy costosos (desde miles hasta decenas de miles de dólares), restringiendo las posibilidades de su uso para estudios.

Esto hace necesario para el desarrollo de la biotecnología, tener acceso a biorreactores económicos que permitan realizar un seguimiento del estudio, que disponga de los sistemas y características adecuadas que hagan posible realizar investigaciones serias sin limitaciones para obtener resultados confiables en tiempos aceptables.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Puesto que los BRs actualmente empleados en la producción de biomasa, poseen costos muy elevados y los elaborados de manera independiente no cumplen las necesidades requeridas para estudios especializados, esta investigación plantea desarrollar, el diseño y construcción de un BR, que permita su esterilización y sea de bajo costo, para hacer asequible el estudio de la producción de biomasa y así sus diferentes campos de aplicación.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Construir un biorreactor esterilizable de bajo costo para el crecimiento de microorganismos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer variables de control y medida del sistema.
- Diseñar sistemas de control y de medida para las variables seleccionadas.
- Elaborar el prototipo del biorreactor con los sistemas de control y medida implementados.
- Desarrollar un seguimiento del crecimiento del microorganismo modelo (*E. coli*/MC4100) en el biorreactor.
- Comprobar la esterilidad del biorreactor en funcionamiento.

4. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

4.1 Biorreactor

4.1.1 ¿Qué es un biorreactor?

Los biorreactores son contenedores donde se lleva a cabo el proceso de cultivo de microorganismos, para ello, el diseño debe proporcionar condiciones óptimas para su crecimiento y garantizar la homogeneización de los constituyentes del sistema. Es indispensable tener en cuenta aspectos para el diseño de un biorreactor(2), algunos de estos se mencionan a continuación:

- Debe permitir un área mayor de contacto entre los componentes del sistema, es decir, se debe contar con un sistema adecuado de aireación y agitación para abarcar las necesidades de los microorganismos.
- A medida que se produce el crecimiento celular se debe mantener las condiciones de temperatura deseada.
- Las células deben estar distribuidas uniformemente en el volumen del medio.
- Fácil montaje y operación.

Según la investigación también se pueden encontrar diseños que requieran:

- El seguimiento de pH y concentración de oxígeno disuelto además del suministro de nutrientes.
- Mantener la especie de cultivo aislada; una vez esté en funcionamiento el BR.
- Elección de materiales afines a los objetivos de la investigación.

4.1.2 Método de operación

Los biorreactores con condiciones homogéneas, debido a su agitación constante, se pueden dividir dependiendo de su modo de operación en tres diferentes tipos(3):

- *Biorreactores discontinuos:*

Son sencillos de operar e industrialmente se utilizan cuando se han de tratar pequeñas cantidades de sustancias. No tienen entrada o salida de nutrientes y biomasa. Normalmente son implementados para la puesta en marcha, crecimiento y desmontaje.

- *Biorreactores continuos*

Son ideales para fines industriales cuando han de tratarse grandes cantidades de sustancia y permiten obtener un buen control de la calidad del producto. Tienen un flujo uniforme de entrada y salida de nutrientes, donde la alimentación debe ser consistente con la cantidad de nutrientes que son usados y a la vez extraídos del biorreactor. Estos sistemas no tienen sedimentación.

- *Biorreactores semicontinuos*

Son sistemas más flexibles pero de más difícil análisis y operación que los anteriores; estos consisten en remover al “final” de la operación un 80 o 90% de la producción de biomasa y es restituida con una cantidad equivalente de medio de cultivo. Este proceso permite un “reinicio” con un inóculo de gran tamaño y elimina la fase de adaptación del microorganismo al medio, lo que favorece la velocidad de crecimiento, la cual puede controlarse con estrategias de suministro de nutrientes.

4.1.3 Clasificación

Los biorreactores son clasificados según su configuración y diseño, entre ellos se pueden encontrar(4):

- *Biorreactor tubular*

Están fabricados con plástico o cristal, en forma tubular ya sea horizontal, vertical, serpentín o cónico; normalmente estos operan al aire libre debido a la escala de trabajo y por tanto requerimiento de espacio. La transferencia de O_2 CO_2 se suele hacer a partir de la inyección de aire, la cual también permite su agitación.

- *Biorreactor tipo panel*

Tienen una gran relación superficie: volumen, esto favorece el área superficial y así la captación de luz, por esta razón este tipo de sistema es especialmente utilizado para organismos fotoautótrofos.

- *Fotobiorreactor (FBR)*

Es un biorreactor que incorpora algún tipo de fuente de luz. Los FBRs son por lo tanto sistemas especializados para el cultivo de microorganismos fotoautótrofos. Son principalmente empleados en el cultivo de microalgas, los FBRs introducen CO₂ para mejorar el crecimiento en presencia de luz, agua y nutrientes (5).

- *Biorreactor air-lift*

Este tipo de BRs consisten en un sistema de agitación neumática constituido por una columna dentro del contenedor, que facilita el intercambio de materia gas-líquido por medio de la entrada inferior de CO₂ a través de una cavidad (6). Su uso se ha popularizado en el tratamiento de aguas, la industria química y bioprocesos.

Aunque este tipo de BRs se consideran de gran potencial, por su simplicidad mecánica, dispersión uniforme, bajo daño celular debido al esfuerzo de corte y su relativa facilidad de manejar condiciones axénicas, aún no se han aplicado a gran escala en la industria de bioprocesos (7).

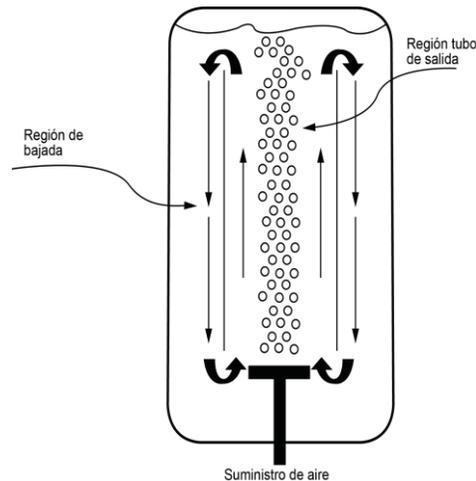


Figura 1. Esquema de un reactor air-lift. Figura tomada y adaptada de (8).

Por su clasificación los BRs *air-lift* se pueden dividir en dos clases según su tipo de estructura: reactores de bucle externos, en el cual la circulación toma lugar por conductos separados y distintos; y reactores de bucle interno, en los cuales los conductos se colocan de una manera estratégica dentro de un mismo recipiente para crear los flujos que permitan la circulación, sin embargo, estos diseños se pueden modificar, permitiendo variaciones en la dinámica de los fluidos (8).

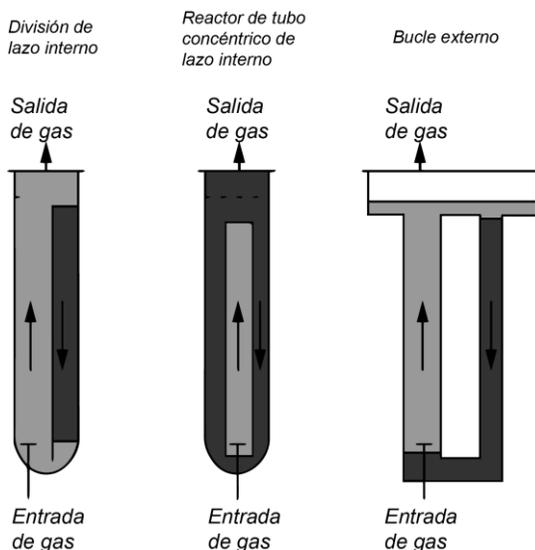


Figura 2. Tipos de bioreactores air-lift. Figura adaptada de (8).

Para alcanzar su óptimo funcionamiento y estudio, los BRs están provistos de sistemas de control y de medida como: temperatura, nutrientes, iluminación, pH, densidad óptica y volumen.

A partir de las necesidades planteadas en esta investigación, el diseño que se llevó a cabo por presentar las mejores características fue el BR *air-lift*.

4.1.4 Sistemas de acople

4.1.4.1 Sistemas de control

- *Temperatura:*

Cada microorganismo tiene diferentes requerimientos para su óptimo crecimiento, uno de estos es la temperatura. En el caso de las bacterias la temperatura idónea ésta generalmente alrededor de 37°C y para las microalgas se encuentra entre los 20 y 24°C, estas pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo, la especie y la sepa utilizada (10).

- *Nutrientes:*

La nutrición consiste en suministrar los componentes químicos necesarios para el crecimiento, sin embargo, estos requerimientos son específicos para cada microorganismo, pueden variar en cuanto a cantidad y tipo de nutrientes.

Algunos nutrientes se necesitan en una mayor cantidad que otros, a estos se les denomina macronutrientes y los usados en menor proporción, micronutrientes (9).

- *Iluminación:*

Esta es exclusiva en la aplicación de los FBRs, siendo importante para acelerar el proceso de fotosíntesis y así su adecuado crecimiento. Esta puede ser suministrada desde una fuente natural o artificial.

Aspectos a tener en cuenta para esta variable (10):

- En ausencia de luz, la biomasa (el producto del FBR) puede decrecer.
- El mezclado o circulación (del medio de cultivo) tiene gran influencia en la absorción de luz, de esta manera es importante para el crecimiento del producto.
- Un exceso en la intensidad lumínica puede mermar el índice de crecimiento del cultivo, a veces de manera drástica. Así es como ocurre la fotoinhibición, y provoca que el crecimiento de la biomasa se detenga, hasta llegar a un punto en el que el FBR es improductivo por completo.

- *pH:*

Para el crecimiento de un microorganismo el pH específico, representa solo el pH extracelular. El pH intracelular debe estar próximo a la neutralidad para evitar la desnaturalización de las macromoléculas que son sensibles a medios ácidos o básicos(9).

El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la producción de biomasa, la alcalinidad, composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica o heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO₂ (11).

4.1.4.2 Sistemas de medida

- *Densidad celular:*

Se establece como la relación entre la cantidad de células y el volumen del medio de cultivo. El crecimiento del cultivo ha de ser monitoreado para sus estudios, es

así, como es importante hacer un seguimiento de éste. Para tal seguimiento existen técnicas directas de medición, como el conteo celular que permite hacer una relación entre una muestra y la totalidad del cultivo, a pesar de ser un método relativamente preciso, presenta limitaciones instrumentales y rapidez de medición.

En consecuencia a dichas dificultades se han empleado otras técnicas de medición indirectas, entre ellas se pueden encontrar la turbidimetría y espectrofotometría, ambos métodos basados en la capacidad de un medio para absorber o permitir el paso de luz (12). Actualmente la evolución del crecimiento de un cultivo se hace con el uso de espectrofotómetros, debido a su rapidez de medición y especificidad.

- *Volumen:*

La aireación y evaporación suponen una pérdida de agua, por ende, cambia la relación entre nutriente y volumen del cultivo, por tal motivo es importante controlar la pérdida y reposición de agua.

4.1.5 Agitación

Es el proceso que acelera la relación entre los componentes del cultivo. Se caracteriza por mezclar varias fases como: una fase sólida constituida por células microbianas, una fase gaseosa constituida por el O₂ y una fase líquida compuesta por el agua y los nutrientes agregados.

- **Neumático:** Permite la entrada de gas mediante un tubo, esta agitación no ocasiona daños a las células lo que la hace especial para el cultivo de microorganismos sensibles a la acción de la cizalladora.
- **Mecánico:** Es diseñado para microorganismos cuya necesidad de oxígeno no es muy grande, posee elevados costos energéticos de transferencia de oxígeno.

4.1.6 Mezclado

Es parte fundamental de un BR ya que proporciona condiciones homogéneas de absorción de nutrientes y luz (en el caso de FBRs), mantener un equilibrio térmico, y lograr una dispersión uniforme de células, posibilitando el aumento de productividad de biomasa.

En el caso de microorganismos fotosintéticos, cumple otro factor importante y es el de transferir las células entre la zona de luz cercana a las superficies de iluminación y las regiones de interior oscuro, dando como resultado ciclos periódicos de luz y oscuridad (13).

4.1.7 Materiales para la construcción de Biorreactores

Los materiales de construcción de un BR son determinados de acuerdo a las condiciones de operación a las que se somete o a las demandas de la investigación, brindando las características adecuadas para su funcionamiento. Algunas de estas son: transparencia, alta fuerza mecánica, carencia de toxicidad, resistencia al desgaste (durabilidad), estabilidad química, fácil de limpiar y bajo costo (19).

4.1.8 Aplicaciones de Biorreactores

Los BRs han resultado de vital importancia para la evolución de la biotecnología, gracias a su desarrollo ha sido posible aplicar sus diferentes aspectos de interés a la industria, siendo cada vez más amplio su campo de acción. A continuación se hace mención de algunos de ellos.

- *Biorremediación de suelos contaminados*

Permite la transformación de los contaminantes en productos inofensivos, habitualmente mediante la actividad enzimática microbiana. Por lo tanto, el proceso establece una solución definitiva del problema, ya que no genera desechos, como puede pasar en otros tipos de tratamientos, que se limitan a la captación de los tóxicos para un posterior almacenamiento. También se busca que tenga un coste bajo en su aplicación y se convierta, por lo tanto, en una ventaja adicional. Estos procesos requieren de una alta producción de biomasa, donde participan activamente los BRs (14).

- *Tratamiento de aguas residuales*

En un BR de tratamiento de aguas conviven numerosas especies de microorganismos, podemos encontrar: virus, rotíferos, nematodos, microalgas y el más importante, bacterias. El objetivo es degradar adecuadamente los contaminantes (macro y micro contaminantes) por lo que el primer objetivo del desarrollo de esta tecnología es el de optimizar la biodegradación o eliminación de los compuestos difícilmente biodegradables y de aquellos contaminantes especialmente peligrosos como disruptores endocrinos, antibióticos o metales pesados (15).

- *Obtención de productos de interés*

Debido a su diversidad taxonómica, los microorganismos llevan a cabo diferentes procesos para la producción de sustancias que por medio de la síntesis química no se pueden alcanzar, bien sea, poco rentable por los costos del proceso o porque la industria no es capaz de llegar a tales resultados. Es así, como toman

importancia los microorganismos para ser fuentes de extracción de compuestos de interés nutricional y farmacológico, además de otras ramas.

- *Producción de biocombustibles*

La producción de biocombustibles a escala industrial en gran medida está dirigida hacia la industria azucarera, siendo un recurso cada vez más limitado. Por tal motivo surgió la necesidad de buscar fuentes alternativas de los biocombustibles, se ha encontrado que algunos microorganismos tienen considerables niveles de producción de biodiesel, bioetanol, biohidrógeno y biometano (16), (17), (18), (19), obtenidos directamente como producto de su metabolismo o elaborados a partir de su alto contenido lipídico.

4.2 Bacterias

4.2.1 Generalidades

Las bacterias son microorganismos que presentan tamaños entre 0,5 y 5µm. Básicamente se diferencian según su forma, en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (19). Estos organismos son los más abundantes en el planeta siendo ubicuos, es decir, pueden crecer en el suelo, en la profundidad del mar, en lugares calientes y ácidos incluso en residuos radioactivos (20).

Las bacterias se pueden clasificar según su metabolismo y respiración(21).

Metabolismo: En autótrofas y heterótrofas, es decir, cuando producen su propio alimento a partir de compuestos inorgánicos y cuando no pueden fabricar su propio alimento y dependen de formas de carbono sintetizadas por organismos autótrofos, respectivamente.

Respiración: Los requerimientos de oxígeno de una bacteria, muestran el tipo de metabolismo productor de energía de acuerdo a la relación con el oxígeno, se tiene:

- *Anaerobios obligados:* Dentro de este grupo se encuentran dos tipos, estricto y aerotolerantes, para este grupo es letal la presencia de oxígeno pero los segundos toleran un poco más.
- *Aerobios facultativos:* Pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno.
- *Aerobios obligados:* Es indispensable el oxígeno para su desarrollo.

- *Microarófilos*: Crecen mejor con tensiones de oxígeno bajas (3%-5%), las concentraciones elevadas (21%) tienen un efecto inhibitor para estas bacterias.

4.2.2 Crecimiento

El crecimiento bacteriano es un proceso complejo que se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes de la célula; las bacterias poseen capacidades para utilizar los nutrientes necesarios y así, disponerlos según su requerimiento.

4.2.2.1 Fases de crecimiento

Por lo general una bacteria requiere 24 horas para su crecimiento a partir de unas pocas células en las condiciones adecuadas para su desarrollo, este presenta cuatro fases características(20), como se evidencia en la Figura 3.

- I. *Fase de latencia*: Cuando una población bacteriana se encuentra en un nuevo ambiente con elevada concentración de nutrientes que le permitan crecer, necesita un período de adaptación a dicho ambiente con un lento crecimiento, en esta fase se ve marcada una alta actividad metabólica, donde las bacterias se preparan para comenzar una elevada tasa de biosíntesis.
- II. *Fase exponencial*: Las bacterias se dividen a velocidad constante gracias a su naturaleza y a las condiciones del medio, durante esta fase los nutrientes son metabolizados rápidamente hasta que se agotan y se inicia la siguiente fase.
- III. *Fase estacionaria*: Posterior al agotamiento de los nutrientes las bacterias reducen su actividad metabólica y usan las proteínas no esenciales como fuente energética. Es una transición desde un rápido crecimiento a un estado de respuesta a estrés.
- IV. *Fase de muerte*: Luego de la fase estacionaria, aumenta el índice de muerte, disminuyendo la población de manera acelerada.

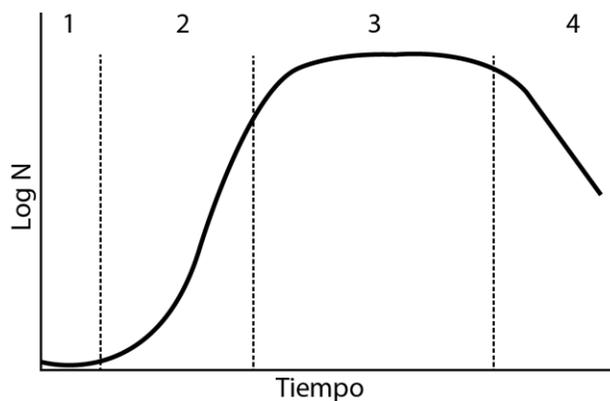


Figura 3. Fases de crecimiento bacteriano. Adaptado de (4).

4.2.3 Requerimientos para el crecimiento de *E. coli*MC4100.

Existen diversas cepas de *E.coli*MC4100, con necesidades de nutrientes distintas. Algunos tipos como TG1 y B54125 pueden crecer en medios completamente definidos, pero otros tienen necesidades mayores que no se conocen con precisión.

La *E. coli*MC4100 al ser heterótrofa demanda para su óptimo crecimiento, que su medio de cultivo contenga incluidos los nutrientes necesarios para su desarrollo. Debido a ser una de las bacterias más utilizadas en el desarrollo de la microbiología, se han desarrollado medios de cultivo para su estudio según las necesidades de la investigación. Su metabolismo funciona por medio de respiración anaerobia facultativa, lo que le da la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Alcanza una velocidad de crecimiento máxima a una temperatura de 37°C. La *E. coli*MC4100 puede crecer bien entre pH 6 - 8, pero su pH interno es siempre 7.6 o muy cercano a ese valor (22).

5. METODOLOGÍA

5.1 Generalidades

En esta investigación se llevó a cabo el diseño y construcción de un BR autoclavable de bajo costo, para la puesta a punto con un microorganismo modelo (*E. coli*/MC4100).

Para este diseño se tuvo como fin, elaborar métodos de control y medida de las variables de interés. Conjunto a esto se seleccionaron materiales que resistieran las condiciones a las cuales fueron sometidos.

5.2 Diseño de biorreactor air-lift

Este diseño se realizó teniendo en cuenta diseños preliminares de BRs(23),(24), (10), para la elaboración, selección y desarrollo de determinados métodos y variables, que se explican más adelante.

5.2.1 Selección de las variables de control y medida

A partir de la revisión bibliográfica se determinaron las variables de interés para el estudio, las cuales fueron: temperatura, densidad óptica y suministro de fuente de oxígeno y nutrientes.

En el caso del cultivo de microorganismos fotoautótrofos es necesaria una fuente de luz.

5.2.2 Desarrollo de métodos para las variables establecidas de control y medida

- *Temperatura:*

Para esta variable de control se utilizó un sistema de calentamiento electrónico (Suministrado por el Ingeniero Electrónico Andrés Valderrama de la UAN)(Figura 4), que se activa a temperaturas menores a 37°C ($T < 36.9^{\circ}\text{C}$) y desactiva cuando está por encima de ésta ($T > 37^{\circ}\text{C}$). Para la presente investigación éste fue configurado a 37°C, sin embargo, puede ser ajustado a diferentes temperaturas entre un rango de 0 a 99°C.

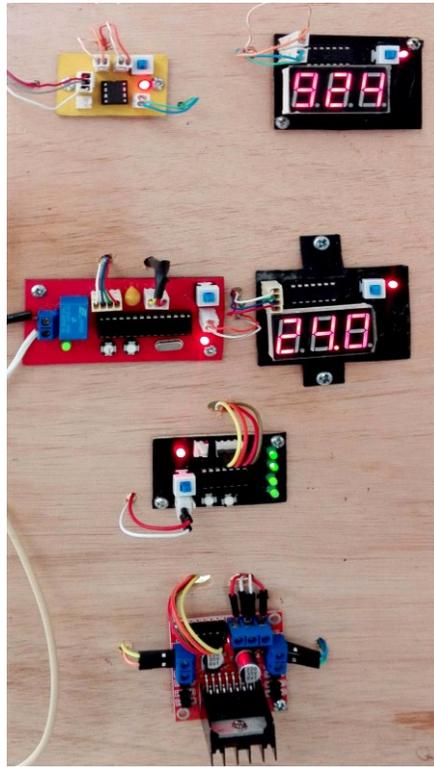


Figura 4. Sistemas electrónicos: temperatura, intensidad lumínica y reposición de agua.

El calentamiento es proporcionado por medio de un cordón de resistencia que se calienta al ser activado el sistema, este cordón está dispuesto en forma de hornilla (Figura 5) en contacto con la base del BR.

Hornilla de calentamiento

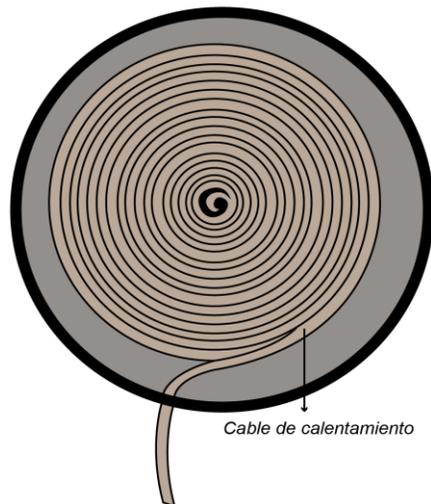


Figura 5. Hornilla de calentamiento.

El sistema mide la temperatura del cultivo a través de una sonda (*Figura 6*) que está dentro de un tubo de ensayo acoplado a la tapa del BR, que al cerrarse queda dentro del recipiente de tal manera que la base de este tubo está sumergida en el cultivo y así permite un equilibrio térmico entre el tubo, el medio y la sonda.



Figura 6. Sonda para la medición de temperatura.

- Densidad Celular:

Para esta variable de medida, se diseñó un sistema de muestreo que no interviene con la esterilidad del medio, a partir de éste, se tomaron las muestras para la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro.

El sistema funciona a través de una T de PVC (*Figura 7*) que se encuentra sellada herméticamente en sus salidas laterales con empaques de caucho siliconado (descritos posteriormente). Por uno de sus extremos laterales, está conectada una manguera siliconada curada al platino que va unida a una jeringa, esta última es la encargada de hacer la extracción del cultivo con ayuda de su émbolo, por el otro extremo lateral, mediante el uso de un tubo de acero inoxidable en forma de “U” (invertido), donde un lado está sumergido en el medio líquido y el otro apuntando al interior de la T, por último, el extremo inferior de la T está enroscado a un colector de PVC que recibe la muestra.

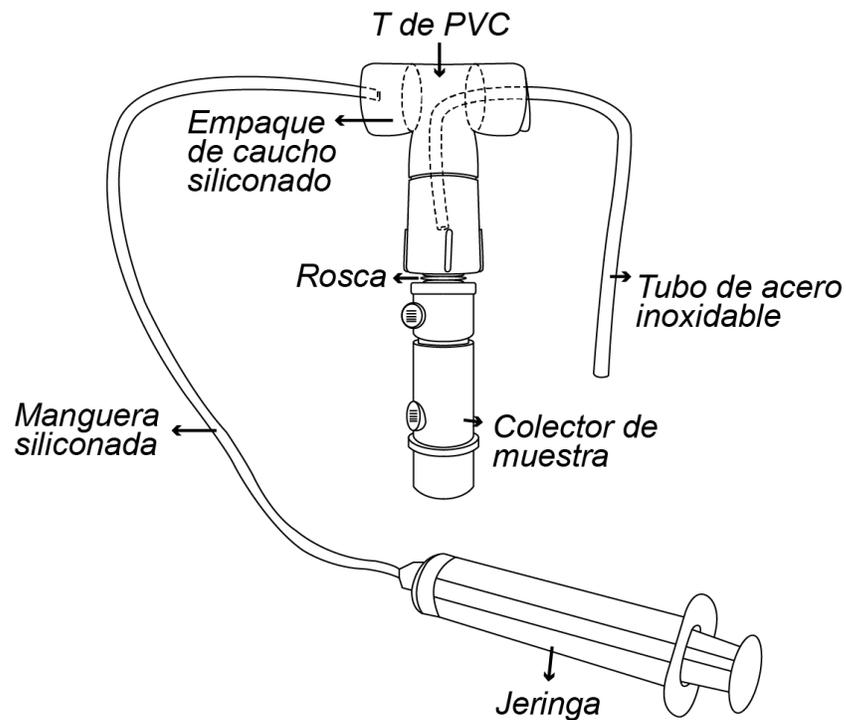


Figura 7. Sistema de muestreo.

- *Empaques de caucho siliconado:*

Estos fueron elaborados a partir de silicona poliéster, que solidifica con ayuda de un catalizador, para la obtención de los empaques fueron usados moldes a la medida elaborados en una impresora 3D (Figura 8).



Figura 8. Empaque de caucho siliconado.

- *Sistema de intensidad lumínica:*

Se utilizó un sistema electrónico que permite medir la intensidad de luz incidente en una resistencia tipo LDR (light dependent resistor), que con una escala de medida arbitraria asigna un valor a la señal tomada entre 0 y 999, (siendo 0 total oscuridad y 999 la máxima capacidad de la resistencia para absorción de la luz). La resistencia LDR se encuentra dentro de un tubo de vidrio y este a su vez unido a la tapa, sellado con un empaque siliconado y dejando sumergida la base del tubo en el cultivo.

- *Suministro de luz:*

Este fue implementado para el uso de microorganismos fotoautótrofos, la fuente de luz fue a partir de 1 metro de cintas de luz LED (light-emitting diode), disponiéndolas en las paredes interiores de la caja de poliestireno expandido (ICOPOR).

5.2.3 Desarrollo de suministro de fuente de Oxígeno y nutrientes para el crecimiento de *E. coli*MC4100.

- *Fuente de Oxígeno:*

Como fuente de aireación se utilizó un compresor (RESUN AC1500; 120V; presión 0,014 MPa; capacidad 2,2L/min) aprovechando el oxígeno presente en el aire. Cuando éste es bombeado pasa a través de una manguera inicialmente conectada a un filtro hidrófobo (*Figura 9*), que por el tamaño de poro impide el ingreso de bacterias, a su vez éste último está acoplado por su salida a una manguera de silicona que entra al BR por la parte superior y que con un tubo de acero inoxidable sumergido en el cultivo, libera el aire desde el inferior del BR.

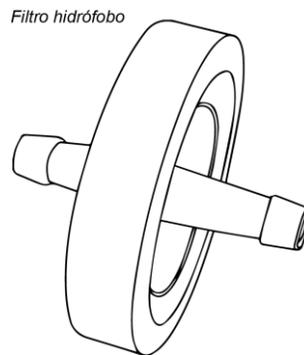


Figura 9. Filtro hidrófobo.

Con el fin de mejorar la disolución de oxígeno en el cultivo, se implemento el método de la manguera perforada para disminuir el tamaño de las burbujas y por ende aumentar el área superficial. A continuación, se describe el método implementado:

Manguera perforada: al extremo inferior del tubo de acero inoxidable se acopló una pieza de 3cm de manguera siliconada curada al platino, con la salida cerrada y perforaciones en sus paredes.

- *Fuente de nutrientes:*

Medio LB: como nutrientes para el cultivo de las bacterias fue usado medio LB que está compuesto por 1.0g de triptona, 5.0g NaCl y 5.0g de extracto de levadura por litro de agua destilada; este medio principalmente se usa para el desarrollo óptimo del microorganismo.

5.2.4 Determinación de requisitos para la selección de recipiente y materiales adecuados en su construcción.

Esta selección fue determinada a partir de los requisitos necesarios para los objetivos de la investigación.

- *Resistencia a procesos de esterilización:*

La esterilización se llevó a cabo por medio de una autoclave (All american model No 50X), donde los materiales se sometieron a una temperatura máxima de 122°C y a una presión de 20 psi, siendo así, los materiales que conforman el BR son resistentes a dicho proceso, éstos son, el recipiente que contiene el cultivo, salida de aire, los sistemas de inyección de aire y muestreo.

- *Transparencia:*

El recipiente debe permitir el seguimiento del cultivo a simple vista, esto facilita su estudio. Siendo así el recipiente usado es translucido para dicho requerimiento.

- *Resistencia a la oxidación por parte del medio acuoso:*

La parte del sistema de aireación que fue sumergida en el BR cuenta con la característica de ser inerte frente a este medio.

A partir de estos requerimientos fueron usados los siguientes materiales para la construcción de los diferentes sistemas:

- *Recipiente*: se utilizó un recipiente de polipropileno PP (*Figura 10*), comercialmente utilizado como contenedor de alimentos. Tiene una capacidad de 1600mL, es translucido y cuenta con una tapa del mismo material con sello hermético.

El PP comercial tiene un punto de fusión de 160°C y presenta una alta resistencia mecánica, esto lo hace apto para el uso en los procesos de esterilización.

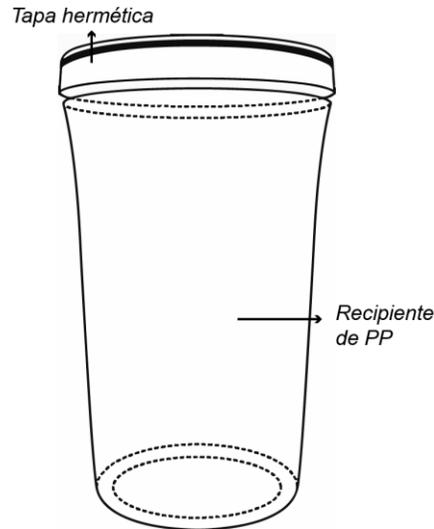


Figura 10. Recipiente de PP usado como BR.

- *Sistema de muestreo*: su diseño compuesto por tubos de PVC, tubo de acero inoxidable y empaques de caucho siliconado; resiste altas temperaturas sin afectar su estructura original. Los registros de temperatura de uso de PVC se encuentran entre 50 y 80°C. Duración de PVC y eficiencia en esterilidad en el análisis.

Los empaques de caucho de silicona poseen una temperatura de trabajo de hasta 200°C.

- *Manguera*: fue utilizada manguera de silicona curada al platino, cuenta con características como: flexibilidad, color blanco translucido, esterilizable y no permite el crecimiento bacteriano. Tiene un rango de temperatura operativa de -60°C hasta 180°C.

En la Tabla 1 se describen los materiales y especificaciones de cada sistema que requieren someterse a un proceso de esterilización.

Tabla 1. Materiales y especificaciones de los sistemas sometidos a esterilización.

Sistema	Material	Especificaciones
Muestreo (Ver figura 7)	PVC	Cuerpo de la T.
	Tubo de acero inoxidable	Forma de U invertida que conduce el cultivo hasta el colector.
	Empaques de caucho siliconado	Permiten la entrada de el tubo de acero inoxidable por un lado y por el otro el de la manguera conectada a la jeringa, sin perder el sello hermético de la T.
	Manguera siliconada	Una pieza de 2cm permite el ajuste del tubo en la tapa del BR.
Aireación	Tubo de acero inoxidable	A través de éste pasa el aire
	Manguera siliconada	-Es usada para crear un sello hermético en la tapa. -La manguera perforada está conectada a la parte inferior del tubo.
Recipiente (Ver figura 10)	PP	Resistencia a alta temperatura y transparencia. La tapa ofrece resistencia para la inclusión de los sistemas a través de ésta.
Riser (Ver figura 11)	PP	Su cuerpo está hecho a partir de un recipiente de PP de 500mL.
	Tubo de acero inoxidable	Se usaron cortes de 1 cm a los costados dentro de perforaciones, para ajustarlo en el centro del BR
	Manguera siliconada	Ajusta los cortes de tubo a las perforaciones en los costados.
Salida de aire (Ver figura 13)	Tubo de acero inoxidable	Es doblado en forma de L, la parte inferior de la L no esta sumergida en el medio.
	Manguera siliconada	-Es usada para crear un sello hermético en la tapa. -Es acoplada a la parte superior del tubo, doblada constantemente hacia abajo.

5.2.5 Desarrollo del método de mezclado

El mezclado es producto de la inyección de aire suministrado desde la parte inferior del BR, el burbujeo asciende hacia la superficie generando corrientes, que con ayuda de un riser (Figura 11) produce una circulación completa.

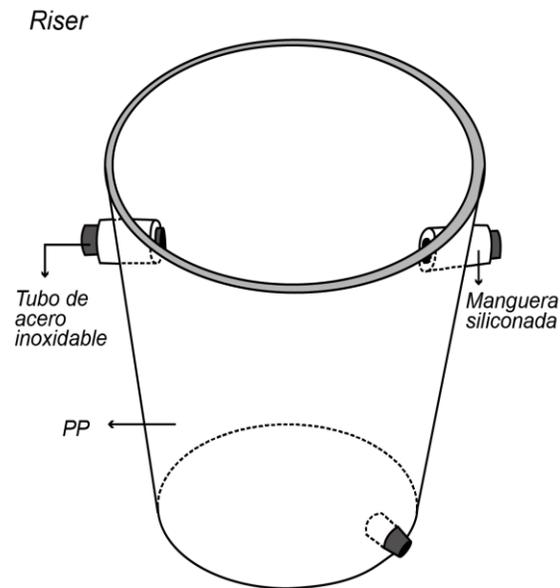


Figura 11. Riser: pieza que facilita el flujo uniforme del cultivo. Tiene soportes en las paredes para centrarlo.

5.2.6 Desarrollo de una bomba peristáltica para la reposición de agua evaporada.

Mediante una bomba peristáltica (Figura 12) se reemplazó el agua evaporada producto de la temperatura y aireación suministradas; este se realizó por medio de piezas impresas en 3D (desarrollada por el grupo de investigación GRESIA de la UAN), cumpliendo la función de bombear el agua hacia el BR.

La bomba peristáltica funciona a partir de un motor que hace girar un conjunto de cilindros los cuales presionan una manguera contra una pared, generando un flujo de entrada y salida de agua destilada y esterilizada hacia el BR.

El motor del sistema funciona a diferentes velocidades, siendo controlado por un circuito electrónico.

Bomba peristáltica

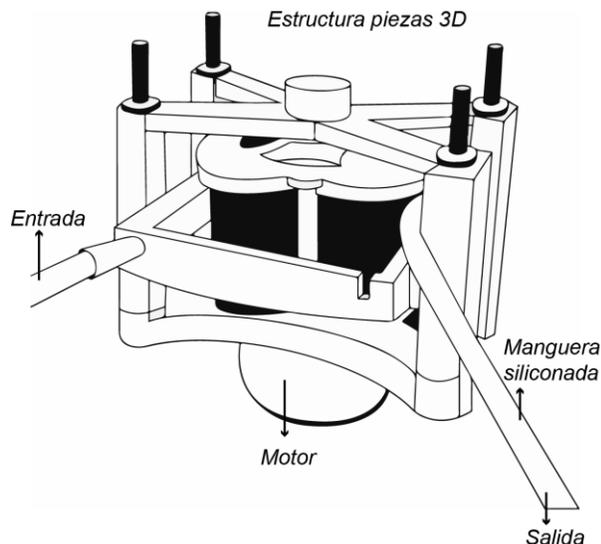


Figura 12. Diseño de la bomba peristáltica.

5.3 Optimización de los métodos de cultivo

5.3.1 Crecimiento y comprobación de la esterilidad de la bacteria *E. coli*MC4100 en medio LB

Se preparó medio LB (1.0g de triptona, 5.0g NaCl y 5.0g de extracto de levadura, en el caso que sea para cajas de Petri, 20g de agar solidificante por litro de agua destilada), se esterilizó por medio de la autoclave, una vez listo el medio se replicó el inóculo de *E. coli*MC4100 en cajas de Petri, se incubó a 37°C de 16 a 24 horas, luego de esto se le realizó una prueba de tinción de Gram para evidenciar su esterilidad. A partir de esta caja se tomó una colonia para su crecimiento en 10mL de caldo LB (medio LB sin agar) a igual temperatura y durante el mismo periodo de tiempo, además con ayuda de agitación para favorecer su crecimiento. Posteriormente este caldo se utilizó como inóculo para las pruebas de esterilidad y crecimiento en el BR.

5.4 Ajustes finales al biorreactor para el crecimiento de *E. coli*MC4100.

Una vez establecidos los materiales, métodos de control y medida se procedió a la inclusión de todos en el recipiente por medio de perforaciones en la tapa (Figura 13), con un periodo de prueba para la comprobación de su funcionamiento correcto, es decir, que el sistema de temperatura, aireación y mezclado

fueran óptimos y estables, el sistema de muestreo funcionara de manera adecuada y que su uso no afectara la esterilidad del BR, el sistema de reposición de agua fuera eficiente, en cuanto a velocidad de flujo y facilidad de uso, además, al igual que el anterior conserve la esterilidad del medio.

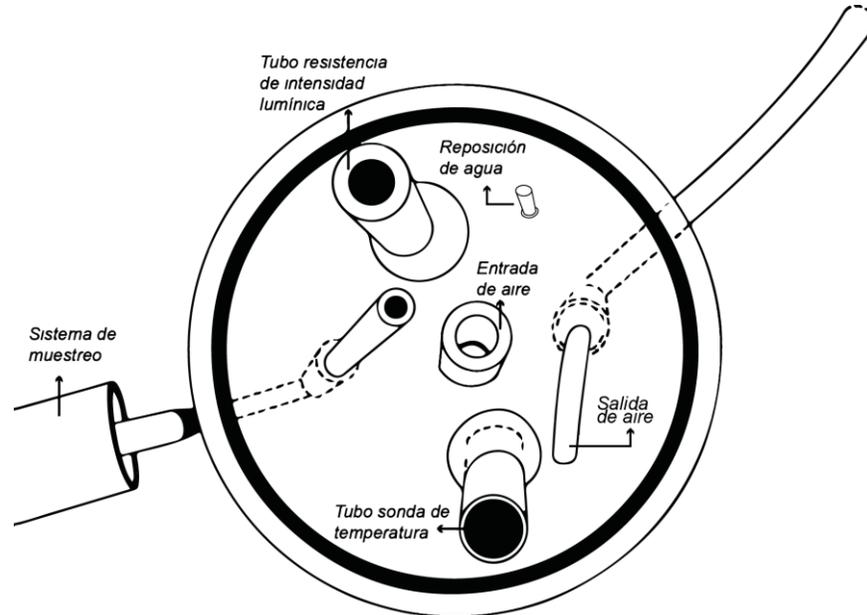


Figura 13. Disposición de los sistemas en la tapa hermética.

5.5 Prueba de esterilidad en el biorreactor.

Una vez acoplados los sistemas al BR se preparó medio LB hasta completar 1500mL de su volumen, luego fue sometido al proceso de esterilización con una autoclave; posteriormente se conectó a los sistemas de control y aireación, durante un periodo de dos días, con el fin de comprobar si había o no crecimiento de algún microorganismo. Además, a las 24 y 48h se tomaron muestras que fueron leídas en el espectrofotómetro, en celdas de 2,5mL y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 600nm, utilizando como blanco medio LB estéril.

Además se tomó una muestra del cultivo a las 48h y esta se sembró en medio LB con agar sólido, se incubó a 37°C por 24h.

5.6 Seguimiento y estudio del crecimiento de *E. coli* MC4100, en el biorreactor ya conformado.

Se procedió a acoplar los sistemas en el BR y a esterilizar con el mismo método que en la prueba de esterilidad, para ser agregado el inóculo (10mL de caldo LB con *E. coli* MC4100) en una cabina de flujo laminar con las condiciones de esterilidad debidas, de esta manera se realizó el seguimiento de la cinética del

crecimiento celular por medio de la densidad óptica, con ayuda del sistema de muestreo y un espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC GENESYS 20), realizado de la siguiente manera:

Mediante el sistema de muestreo se tomaron las muestras del cultivo, con una frecuencia de 30 minutos, iniciando en el minuto cero, esta muestra se llevó al espectrofotómetro con el método de muestreo usado en la prueba de esterilidad (600nm y medio LB estéril como blanco). El blanco utilizado fue desechado y renovado en cada medición.

Prueba de esterilidad: al finalizar el estudio cinético, se le realizó Tinción de Gram al cultivo de *E. coli*/MC4100, para evidenciar la ausencia de contaminación a partir de su forma. Los ensayos de crecimiento se realizaron por triplicado.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 *Diseño de biorreactor air-lift.*

Teniendo en cuenta la revisión preliminar en estudios anteriores, se planteó realizar un diseño de biorreactor tipo *air-lift*, principalmente debido a la simplicidad que presenta su sistema de mezclado, que a la vez proporciona una fuente de aireación, permitiendo la difusión de oxígeno y dióxido de carbono (según el tipo de microorganismo en crecimiento). En oposición a los sistemas de agitación mecánicos, este método cuenta con un corte de cizalla mínimo, disminuyendo el daño celular. Además, posee menores costos energéticos e instrumentales.

Por su modo de operación el BR *air-lift* es una variante de los BRs discontinuos, ya que a pesar de tener una fuente nutritiva inicial y tener un tiempo de funcionamiento y recolección de biomasa, este requiere de una fuente constante de oxígeno para la respiración bacteriana (o dióxido de carbono en el caso de microorganismos fotoautótrofos), teniendo flujo de entrada, lo que lo diferencia de un BR discontinuo tradicional.

Para facilitar la hermeticidad del BR se dispuso la entrada de la aireación por la parte superior (tapa) con ayuda de un tubo de acero inoxidable que difundía el aire desde la parte inferior, en contra parte con los diseños de referencia, quienes disponen de la aireación directamente desde la parte inferior. Este aspecto fue modificado para impedir las posibles fugas de medio de cultivo y facilitar el uso del dispositivo (la inyección desde la parte inferior no permitiría colocar el BR sobre una superficie, sería necesario el uso de un soporte que lo mantenga elevado).

6.2 *Variables de control y medida*

La selección de variables de interés fue determinada con el fin de optimizar las condiciones para el crecimiento y estudio de éste.

- *Densidad celular*

Para el estudio del crecimiento bacteriano el uso de la espectrofotometría resultó ser fácil de implementar, gracias a la velocidad del método y sencillez de operación; por otra parte la medición es confiable ya que las muestras tomadas y el cultivo en general presentaron buena homogeneidad, eliminando la posibilidad de errores de medición, debidos a suspensiones o turbidez en la muestra.

En las mediciones espectrofotométricas se utilizó como blanco medio LB estéril. Para su conservación, se encontraba sellado en un cuarto frío. Así, al

momento de su uso se encontraba a una menor temperatura que la del entorno, este aspecto no afecta directamente en la medición. Sin embargo, es de considerar que la conservación del blanco fue perturbada debido a esta diferencia de temperaturas entre el blanco y el entorno, ya que al entrar en equilibrio térmico con el medio generaba pequeñas burbujas en la pared de la celda en la que estaba contenido, teniendo como resultado un error considerable; dicho fenómeno condujo a la necesidad de desechar y renovar el blanco en cada medición.

- *Intensidad lumínica*

Este sistema se basó en el uso de una resistencia tipo LDR como fuente de medición, donde, al poner en marcha el BR la medición representaría la mayor absorción de luz, por el contrario, la menor al finalizar, debido al aumento de la densidad celular impidiendo el paso de luz.

En este proceso es importante la fuente de luz (natural o artificial), es por esto que fue necesario establecer una fuente de luz constante, para lo cual fueron utilizadas las luces LED, estas fueron dispuestas en las paredes de una caja cerrada, destinadas para el uso con microorganismos fotoautótrofos. Con esto se aseguró que la entrada incidente de luz fuese constante y que cualquier variación sería debido al crecimiento celular.

La intención de este sistema era hacer una correlación de los resultados obtenidos entre éste (resistencia LDR) y la densidad celular (espectrofotómetro), si existía una proporción en los resultados, sería posible relacionar una medida con la otra, lo que eliminaría la fase de muestreo para proporcionar la medición de la densidad óptica. A pesar de las consideraciones tenidas en cuenta, el sistema no presentó estabilidad y por tanto fiabilidad, por esta razón no fue tenido en cuenta en el estudio del BR.

- *Fuente de luz*

Inicialmente la cinta de luces LED fue puesta en contacto alrededor del recipiente, lo cual presentó un inconveniente, debido a que su funcionamiento tenía como resultado un aporte energético, esto evitaba mantener la temperatura deseada. Por esto fue necesario el uso de una caja de madera que en las paredes de su interior tuviese las luces. Posteriormente esta caja fue reemplazada por una de poliestireno expandido, con el fin de obtener una menor pérdida de energía térmica y así cumplir los requerimientos de *E. coli*/MC4100 (hablados más adelante).

El suministro de luz cumplió dos funciones, la primera fue para llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis, el segundo fue destinado en hacer que la luz incidente en la resistencia LDR (del sistema de intensidad lumínica) fuese constante, por

esta razón, aun para el cultivo de microorganismos no autótrofos esta fuente de luz permaneció activa.

- *Temperatura*

En ensayos preliminares a bajas temperaturas (24°C) el sistema electrónico demostró un correcto funcionamiento en alcanzar y mantener la temperatura establecida. Sin embargo, para los requerimientos del crecimiento de *E. coli* MC4100 no consiguió los parámetros deseados (37°C); principalmente debido a la limitación de calentamiento del cordón de resistencia. Esta dificultad se solucionó a partir del aislamiento térmico por medio de una caja de poliestireno expandido, de esta manera se disminuyó la pérdida de energía térmica y se logró esta condición, requerida para el buen desarrollo de la población bacteriana.

- *Suministro de oxígeno*

Filtro hidrófobo: al realizar ensayos preliminares se encontró que el medio de cultivo presentaba contaminación (bacteriana y fúngica). Al tenerlos demás sistemas de acople del BR sellados; se determinó como origen de la contaminación el suministro de oxígeno. Para esto fue implementado un filtro hidrófobo que se especializa en impedir el paso de bacterias (y otro tipo de microorganismos de mayor tamaño celular) debido a su tamaño de poro de 0,1 μm; cuya eficacia se demostró en la prueba de esterilidad.

Disolución de oxígeno: teniendo en cuenta que la absorción de oxígeno mejora con la disminución de tamaño de burbujas, se ejecutó el desarrollo de un difusor a partir de resina epóxica mezclada con NaCl, que en la proporción correcta permite que al sumergir esta mezcla en agua se disuelva el NaCl y genere porosidades. Cuando el aire es inyectado a través de este difusor, se producen burbujas de menor tamaño y una mejor dispersión a través de dichos poros. Sin embargo, su aplicación no presentó la estabilidad mecánica requerida, ya que luego de un periodo de operación (una semana), éste perdía poco a poco su composición, lo que lo hizo no apto para el proceso, considerando que para microorganismos fotoautótrofos el tiempo de operación es mucho más extenso que las bacterias (alrededor de 10 días).

Para la investigación se utilizó el método de la manguera perforada debido a ser el más estable de los dos.

- *Volumen de cultivo*

Sistema de reposición de agua: el volumen del cultivo puede disminuir principalmente por dos razones, la primera es la evaporación del agua, facilitada por la aireación, calentamiento y agitación. La segunda es por medio del uso del

sistema de muestreo, que toma directamente el cultivo, manteniendo un equilibrio entre la relación de la cantidad de células y el volumen del medio de cultivo (densidad celular). Este aspecto es importante, ya que a pesar de disminuir el volumen del medio por la toma de muestras, este decrecimiento no afectaría las futuras mediciones.

Inicialmente el sistema se diseñó para controlar la pérdida de agua por evaporación. Sin embargo, la prueba de esterilidad (la prueba en la cual se hicieron la menor cantidad de toma de muestras) demostró una disminución de volumen alrededor de 40mL después de 48h de operación. Teniendo en cuenta que se hicieron tres muestreos (0, 24 y 48h) y el volumen tomado era de 5mL, se tiene:

$$\text{Perdida de Vol} = \text{Vol. de evaporación} + [\text{Vol. por muestra} * \# \text{ de muestras}]$$

$$40\text{mL} = \text{Vol. de evaporación} + [5\text{mL} * 3]$$

$$\text{Vol. de evaporación} = 40\text{mL} - [5\text{mL} * 3]$$

$$\text{Vol. de evaporación} = 25\text{mL}$$

Respecto al volumen total del cultivo (1500mL) la pérdida por evaporación es pequeña, por esta razón, no fue necesario el uso de este sistema para mantener el nivel del volumen.

Considerando largos tiempos de operación como los empleados en microalgas, si sería necesario el uso de este sistema para la reposición de agua evaporada.

Debido a que el riser permite el flujo del sistema, es importante que el nivel del medio de cultivo esté por encima del riser cubriéndolo completamente. Es así como esto condiciona el volumen de operación, siendo estimado con un mínimo de 900mL y un máximo de 1500mL.

6.3 Materiales para el diseño del biorreactor

- *Recipiente:* se eligió como material de éste el PP por sus características de transparencia, resistencia a altas temperaturas y por ser usado comúnmente para el almacenamiento de alimentos, siendo fácil encontrar recipientes con tapa hermética, lo que lo hace ideal para conservar la esterilidad y estar al alcance económico.

El PP se clasifica según el tipo de configuración espacial de su estructura molecular, estas pueden ser: PP isotáctico, atáctico o sindiotáctico. Esto

condiciona el comportamiento del material y le brinda unas características físicas particulares; por su transparencia, rigidez y resistencia comercialmente se usa el PP isotáctico (25).

Se consideraron otras alternativas como recipientes de vidrio y de PP más económicos; pero fueron descartadas por no cumplir con los parámetros necesarios de la investigación. En el caso del vidrio, inicialmente presentó la dificultad de encontrar un recipiente de este material en el mercado y con las condiciones de hermeticidad necesarias, una opción era fabricar uno a medida, sin embargo, esto presentaba altos costos y un riesgo por su fragilidad. Además de ser necesario tener la posibilidad de realizar cambios en su diseño, en el caso de la tapa no sería recomendable hacerle perforaciones, siendo poco versátil para el estudio. El PP económico presentaba opacidad y menor rigidez en cuerpo y tapa, posiblemente estas características son debidas al tipo de PP que lo constituía, además su tapa no presentaba un sellado fiable para la investigación.

- *Mangueras*: para los ensayos se probó con tres tipos de mangueras: manguera de látex, poliéster y siliconada; las mangueras de látex y poliéster no brindaron las condiciones requeridas ya que al ser sometidas al proceso de esterilización, la temperatura las deformó, haciéndolas inútiles para el diseño del BR. Además, la manguera de látex presentó inconvenientes al ser usada en la bomba peristáltica, pese a su elasticidad se rasgó y no resistió al proceso.

La manguera de silicona curada al platino presentó las mejores condiciones, posee alta translucidez, permite lavar y esterilizar varias veces y no permite el crecimiento bacteriano, por estas razones fue altamente confiable para el diseño (26).

- *PVC*: soportó las condiciones a las que fue sometido para su esterilización (121°C y 20psi), pese a que tiene una temperatura de trabajo entre 50 a 80°C. Esto es debido a que no estuvo en contacto con un buen conductor térmico, como el medio de cultivo o el tubo de acero inoxidable que está en su interior, este último, se encuentra aislado del PVC gracias a los empaques de caucho siliconado. Es de señalar que la T de PVC tuvo una leve deformación, sin embargo, esto no alteró su desempeño. A lo largo de la investigación se sometió el BR (con medio de cultivo en su interior) a esterilización cerca de 20 ciclos, presentando cada uno de sus materiales resistencia al proceso y sin desgaste aparente, exceptuando ligeras deformaciones en la T de PVC del muestreador.

En la figura 14 se muestra el diseño del BR con los diferentes sistemas acoplados.

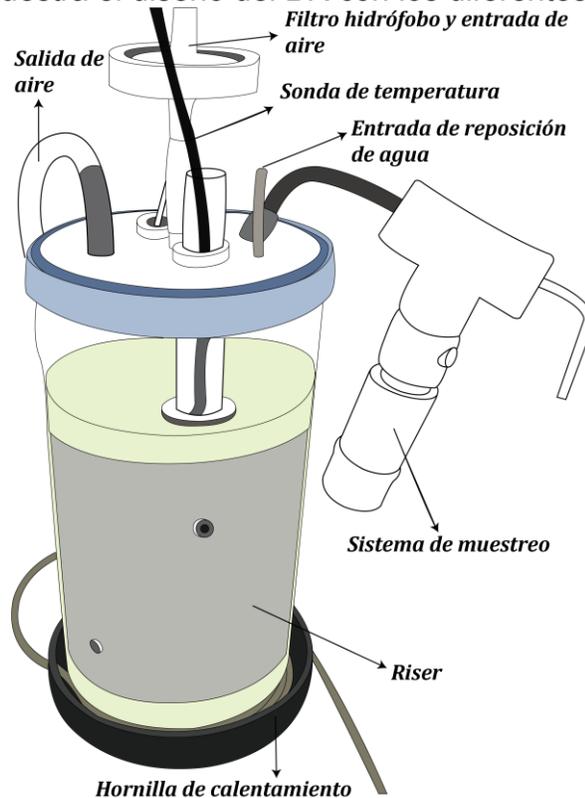


Figura 14. Biorreactor con sus sistemas acoplados: aireación, muestreo, mezclado y de control.

6.4 Prueba de esterilidad

Esta prueba fue planteada con el fin de comprobar la capacidad para mantener la esterilidad del medio del BR en completo funcionamiento de sus sistemas de calentamiento, aireación y muestreo. Se esperaba que los valores de absorbancia obtenidos en las tres mediciones fuesen cero, comprobando que no hay crecimiento bacteriano en el BR. Sin embargo, estos no fueron los resultados encontrados, los cuales se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Seguimiento de la densidad celular en la prueba de esterilidad.

Tiempo de cultivo (h)	Densidad celular (Absorbancia)
0	0,000
24	0,004
48	0,008

Las posibles causas de la variación en los valores de densidad celular se discuten a continuación:

- **Contaminación:** es de resaltar la baja velocidad con la cual aumentó su densidad celular, yendo de 0,004 a 0,008 en 24h (entre las 24h y 48h de la prueba). Si este valor se compara con la prueba de crecimiento II (tabla 3), en el minuto cero donde su densidad celular era 0,005, se puede decir que el tamaño de su población bacteriana era similar. Si fuesen ambas medidas producto del crecimiento bacteriano, sería de esperarse una evolución equivalente en ambos cultivos, sin embargo, como se puede observar en las tablas 3 y 4, sus valores de densidad celular a las 24h presentan diferencias significativas; considerando un cambio de densidad celular de 0,005 a 1,207 luego de 24h de la prueba de crecimiento II. Por esta razón se descarta la contaminación bacteriana como posible causa del aumento de densidad celular en la prueba de esterilidad.

Tabla 3. Medida inicial y final de densidad celular de la prueba de crecimiento II.

Tiempo de cultivo (h)	Densidad celular (Absorbancia)
0	0,005
24	1,207

- **Error instrumental:** otra posible causa sería alguna variación en la medida por parte del equipo utilizado, ya que los espectrofotómetros presentan un rango por debajo de 0,100 y por encima de 1,500 donde sus medidas son menos confiables (27). Lo que hace las medidas tomadas en este rango de baja confiabilidad instrumental.

- **Cambio en la composición del medio de cultivo:** el suministro constante de aire supone una disolución, principalmente de dióxido de carbono y oxígeno, cambiando la composición química del medio al aumentar la concentración de dichos gases, diferenciándolo del blanco. Esto puede haber influido en la medición, contribuyendo a la variación en la absorbancia. Por lo anterior se puede decir que los errores experimentales y el cambio de la composición del medio contribuyeron para obtener una variación en la medida espectrofotométrica en la prueba de esterilidad y que dicha variación no corresponde a un aumento de población bacteriana.

Esto demuestra la eficiencia de los diferentes sistemas implementados para la conservación de la esterilidad, empaques de silicona y manguera siliconada, tapa hermética, filtro hidrófobo y sistema de muestreo; este último, no contamina el cultivo a pesar de estar expuesto al ambiente parte del proceso. Así, se abre la posibilidad de realizar estudios que requieran esterilidad, logrando tomar

muestras en tiempo real sin afectar las condiciones del ensayo, además de ser un método sencillo, económico y eficaz.

Por otra parte al hacer un rayado del cultivo que se encontraba en el BR, en una caja de Petri con medio LB sólido (Figura 15) luego de 48h, se evidenció que no existía presencia de crecimiento bacteriano, asegurando así, junto con las medidas espectrofotométricas que la prueba de esterilidad para el BR y sus sistemas es positiva, es decir, el BR cumple con los requisitos de esterilidad.

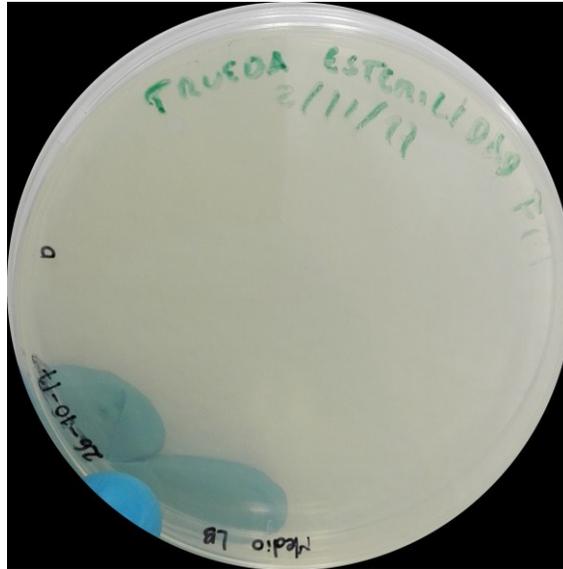


Figura 15. Prueba de esterilidad en caja de Petri.

6.5 Elección de *E. coli*MC4100 como microorganismo modelo

Como microorganismo modelo fue elegida una bacteria por su rápido crecimiento, teniendo así la posibilidad de obtener resultados en poco tiempo. La cepa de bacteria usada fue *E. coli*MC4100, básicamente debido a su disponibilidad y conocimiento de su especie. Además al ser la *E. coli* tan estudiada se tiene conocimiento de su comportamiento y necesidades.

La velocidad de crecimiento de *E. coli*MC4100 depende de factores como: composición del medio de cultivo, temperatura y condiciones del inóculo, en este último se encuentran su tamaño (colonia, lavado de caja de Petri o caldo) y medio de crecimiento. Por estos motivos es difícil tener una referencia confiable de la evolución del cultivo, así, se hace importante el seguimiento de las fases de crecimiento para su estudio.

6.6 Crecimiento de *E. coli*MC4100

- *Curva de crecimiento:*

En la figura 16 se pueden observar los tres ensayos realizados de la evolución del crecimiento de *E. coli* MC4100, donde la variación del desarrollo de su crecimiento es dado dependiendo la velocidad en que se lleva a cabo la fase de latencia, logrando ver que los ensayos alcanzan dicha fase en tiempos distintos. Es de resaltar que a partir de que los cultivos superan la fase de latencia tienden a comportarse de forma paralela, demostrando una velocidad de crecimiento similar en los diferentes ensayos, este hecho da mayor importancia a la fase de latencia como parte crucial de la evolución del cultivo.

De igual manera se puede notar que las tres curvas consiguen tener las dos primeras fases de crecimiento y su desarrollo tiende hacia la tercera fase (estacionaria).

Cabe mencionar que en uno de los ensayos (representado con rombos) no fue posible la medición espectrofotométrica de dos muestras (360 y 390 min), debido a fallas con el equipo, las cuales fueron solucionadas para la última medición (420

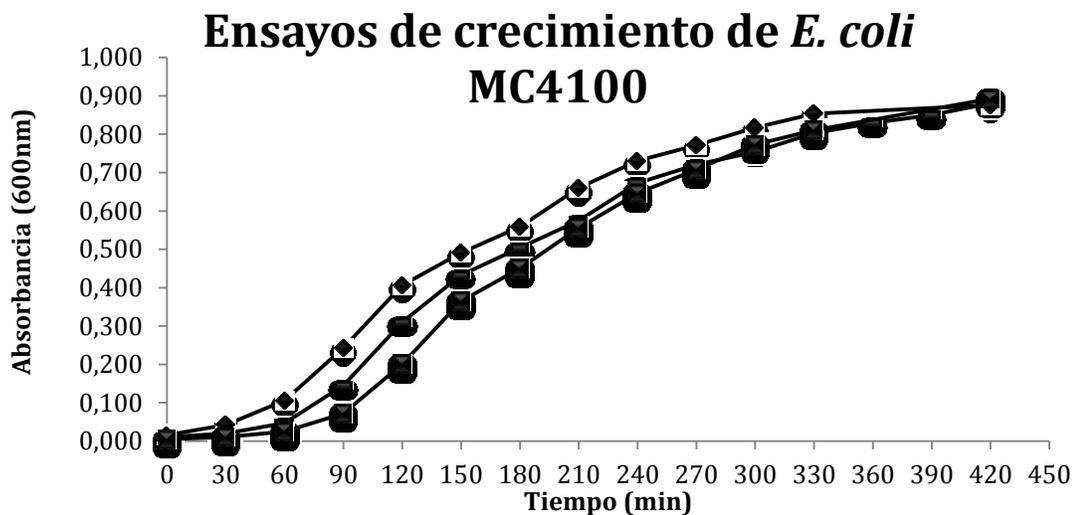


Figura 16. Ensayos de crecimiento de *E. coli* MC4100, se presentaron el seguimiento de tres ensayos a. Rombo, b. Cuadros, c. Rectángulos.

En la curva de crecimiento promedio (Figura 17) se pudo evidenciar inicialmente una baja tasa de crecimiento, denominada fase de latencia, donde las células bacterianas inician un proceso de adaptación al nuevo medio y se preparan para una elevada actividad metabólica, absorbiendo los nutrientes necesarios; esta fase conllevó un tiempo alrededor de 60 min. Seguido a esto se observó la fase de crecimiento exponencial, donde el cultivo toma la mayor velocidad de crecimiento hasta disminuir considerablemente la presencia de los nutrientes en el medio de cultivo, en este momento se reduce su metabolismo. Los ensayos realizados

solose evidenciaron hasta esta etapa del crecimiento por disponibilidad horaria de los espacios.

Luego de esto, según las referencias, se esperaríallegar a un momento en el que no hay división celular, debido a la menor disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. De esta manera se presentan cambios en la curva de crecimiento, a esta fase se le asigna el nombre de estacionaria.

En la figura 17 se calculó el error estándar en cada punto de medición. Se observa que en la fase de latencia e iniciando la fase estacionaria el grado de error es mínimo, mientras que en la fase exponencial, algunas poseen una variación mayor, demostrando que esta etapa de crecimiento es la que presenta mayor fluctuación; esto puede darse por la rapidez debido a los diferentes tiempos en los que cada cultivo superó la fase de latencia, condicionando la velocidad de la evolución restante del cultivo.

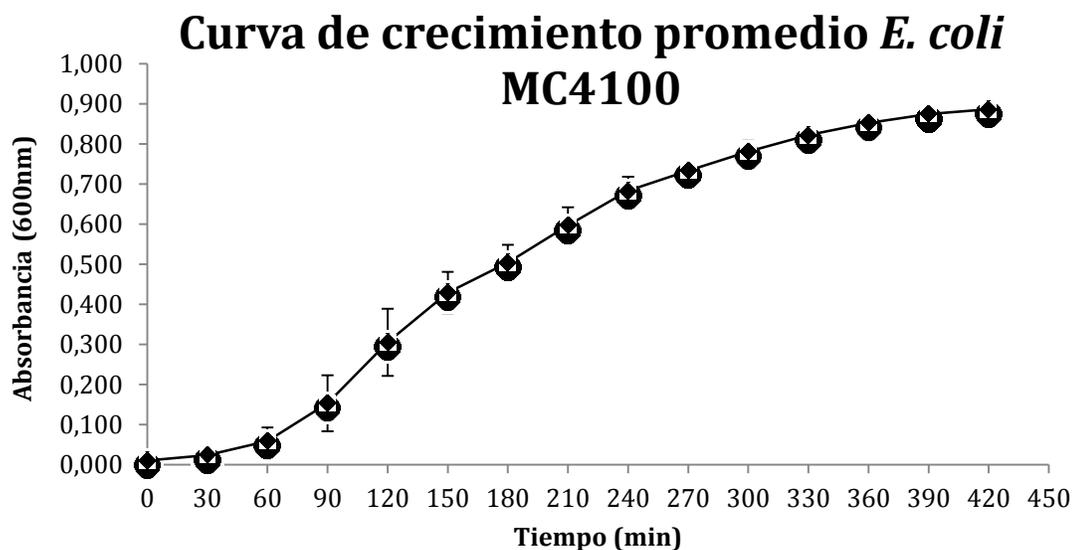


Figura 17. Curva de crecimiento promedio *E. coli* MC4100; presenta barras de error a partir de la desviación estándar.

- *Evolución del cultivo*

En la Figura 18 se hace un seguimiento al cambio observado en el medio de cultivo de la prueba de crecimiento I, con un intervalo de 60 min. Se observa como con el transcurso del tiempo la biomasa aumenta haciendo el cultivo cada vez más opaco. Aquí es importante la transparencia del recipiente para poder hacer un seguimiento de cultivo sin necesidad de requerir una evidencia más elaborada del crecimiento bacteriano. De esta manera una contaminación (de tamaño considerable) por parte de otros microorganismos como hongos o microalgas puede ser detectada sin necesidad de abrir el recipiente. En el caso de otras especies de bacterias serán necesarias pruebas más específicas para comprobar su presencia.

A lo largo del proceso se genera espuma que se acumula en la superficie del medio, ésta es producto del metabolismo y excreción de *E. coli* MC4100, que cambia la viscosidad del cultivo con ayuda de la agitación se favorece esta producción.

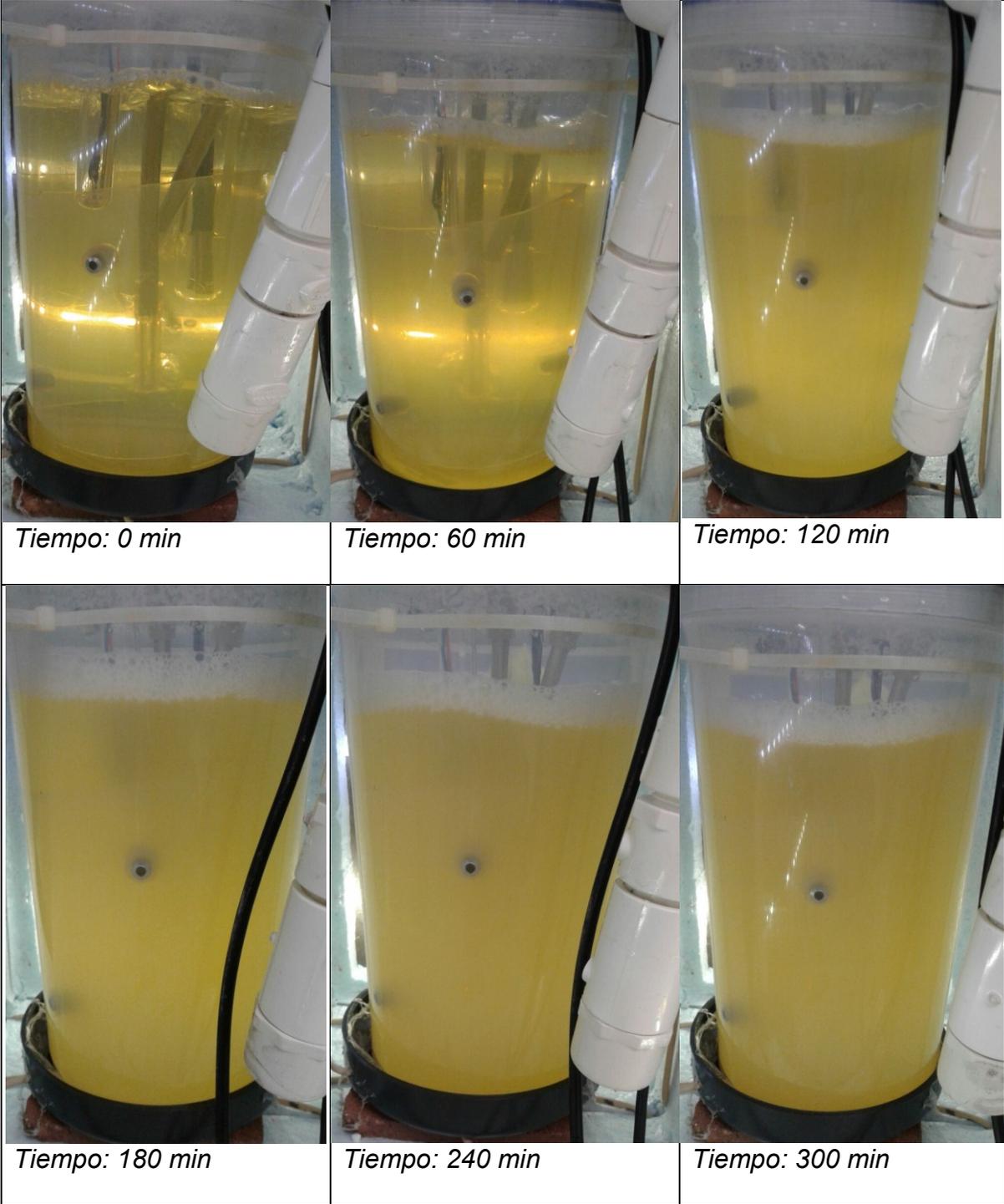


Figura 18. Seguimiento del cultivo de *E. coli*MC4100 en el BR puesto en marcha.

- *Prueba tinción de Gram*

Con el fin de comprobar la presencia de solo un tipo de microorganismo, se aplicó tinción de Gram, tomando como referencia las características fisiológicas de la *E. coli*MC4100, una bacteria con forma de bastones y Gramnegativa, tomando una coloración rosada luego de la tinción. A partir de estas características se diferenciaron de los posibles contaminantes presentes, vistos al microscopio óptico.

La Figura 19, muestra el cultivo con una alta presencia de bacterias en forma de bastones rosados, aparentemente el cultivo es uniforme en cuanto a estas características, sin manifestarse otro tipo de presencia celular. Si bien este método no es del todo confiable para determinar con seguridad la presencia de contaminantes, sí da cierto nivel de confianza.

Si se consideran los resultados obtenidos por la prueba de esterilidad y la tinción de Gram, se puede considerar que el BR cumple los requerimientos establecidos de esterilidad, evitando el ingreso y proliferación de otros microorganismos.

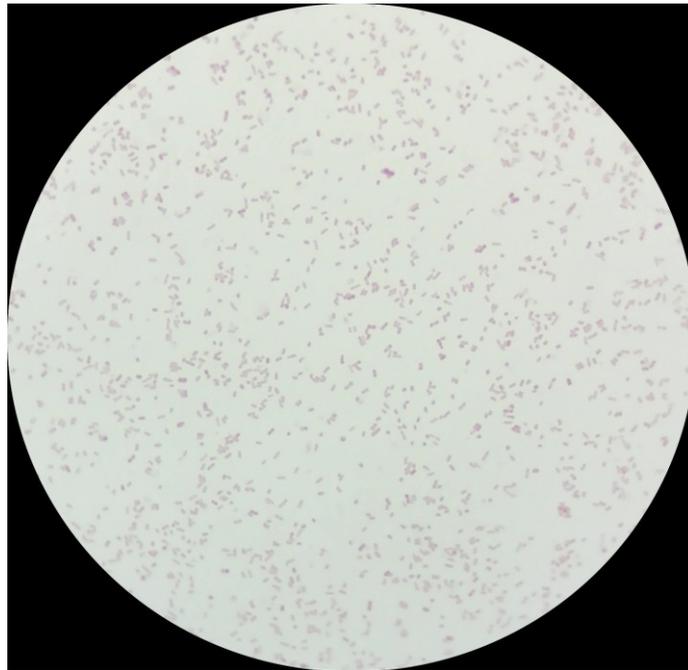


Figura 19. Tinción de Gram de muestra tomada del BR luego del periodo de operación. Vista en un microscopio óptico. Foto tomada y ampliada.

6.7 Análisis de costos

En la Tabla 4 se presentan los costos de los materiales utilizados. Estos fueron ajustados dependiendo de la cantidad utilizada de cada uno para conformar un BR.

Tabla 4. Costos de los materiales empleados en la construcción del BR.

Material	Descripción	Cantidad	Costo (COP\$)
Recipiente	PP de 1600mL	1 unidad	16.000
Recipiente	PP de 500mL	1 unidad	8.000
Tubo de acero inoxidable	¼"	50 cm	2.670
Manguera siliconada	- 3/16 x 5/16	- 50 cm	5.500
	- 3/32 x 5/32	-15 cm	1.380
Empaques de caucho siliconado	- Empaques de 5mL	3 unidades	En conjunto
	- Corchos de 12mL	2 unidades	7.000
Tubos de ensayo	15mL	2 unidades	4.000
Cordón de resistencia		3 m	1.260
Dispositivo de PVC	- T - unión - macho - hembra - tapón de PVC ½ "	- 1 unidad - 2 unidad - 1 unidad - 1 unidad - 1 unidad	En conjunto 8.800
Moldes y piezas en 3D	- moldes - piezas	- 2 unidades (4g) -31g	35.000
Motor paso a paso	-	1 unidad	13.000
Compresor	capacidad 2,2L/min	1 unidad	30.000
Filtro hidrófobo	Ref. S-003	1 unidad	16.774
Sistemas electrónicos	- Display 7 segmentos	- 1 unidad	16.500
	- Control de temperatura	- 1 unidad	29.000
	- Lector análogo	- 1 unidad	10.000
Nevera de poliestireno expandido	- 10 L	1 unidad	11.000
Luz LED	Cinta	1.5 m	7.500
Jeringa	Capacidad de 50 mL	1 unidad	1.600
Total			224.984

Cabe resaltar que las piezas fabricadas en 3D no fueron compradas, debido a que se contaba con la impresora 3D, por ello para determinar su costo, estas fueron cotizadas en lugares especializados en este campo.

Así, un BR elaborado a partir de la presente investigación tiene un costo de \$224.984 (COP), convertido a dólares (tasa de cambio 1 de diciembre del 2017) sería: \$74,84 (US) para servir de parámetro de comparación se utilizaron dos FBR (con la posibilidad al igual que el presente, de ser usado como BR) comercializados y distribuidos por industrias que desarrollan equipos de laboratorio.

A continuación se describen algunas de sus características:

Tabla 5. Características fotobiorreactores de referencia.

Parámetro	Fotobiorreactor FMT 150/1000-CUST (PSI)	Fotobiorreactor Algaemaster 10 control (IKA)
Volumen de operación (mL)	Entre 150 y 1000	Entre 6000 y 10000
Variables de control y medida	pH, Temperatura, iluminación, densidad óptica (en tiempo real), concentración de CO ₂ y O ₂	pH, Temperatura, iluminación, suministro de nutrientes, agitación
Entrada de energía (W)	500	375
Agitación	Magnética	Hélice
Modo de operación	Continuo	Continuo
Manipulación	Manual, computadora, internet	Manual, computadora, programada, internet
Precio c/u (US\$)	14.900	30.098

En general estos equipos cumplen los requerimientos mínimos establecidos para el cultivo y estudio de microorganismos, con algunas características que facilitan y mejoran el seguimiento del desarrollo de estos (control de pH, concentración CO₂, O₂, entre otros). Estos están automatizados son fáciles de operar, siendo esencial para su aplicación en la investigación.

Como se puede apreciar, sus precios son mucho más elevados en comparación con los costos obtenidos en el presente proyecto, representando cerca del 0.5% del valor del más económico (US\$14.900).

Si bien el BR diseñado y construido no alcanza los estándares de calidad y versatilidad que ofrecen los comercialmente distribuidos, si cumple con los requerimientos necesarios para el desarrollo e investigación de estas tecnologías. Siendo una herramienta útil, dispuesto a cambios según se requiera o planeen mejoraren su diseño. Esto a un costo menor, abriendo la posibilidad de realizar múltiples investigaciones con una inversión coherente con las posibilidades que nos puede ofrecer una entidad académica.

7. CONCLUSIONES

El diseño cumplió con los parámetros establecidos: un bajo costo respecto a los asequibles comercialmente (\$224.984 COP) y esterilizable para conservar las condiciones de cultivo.

A partir de las necesidades de los microorganismos y aspectos técnicos disponibles, se establecieron como variables de medida, la temperatura y densidad celular y de control, temperatura, volumen y nutrientes; para los cuales se desarrollaron sistemas y parámetros destinados a su determinada aplicación.

Los materiales implementados soportaron los procesos a los cuales fueron sometidos y cumplieron con los requerimientos económicos establecidos. Demostrando resistencia, luego de ser sometidos alrededor de veinte ciclos sin cambios significativos.

El crecimiento de *E. coli* MC4100 fue satisfactorio, presentando las primeras dos fases, latencia y exponencial al final de siete horas de operación, con tendencia a iniciar la fase estacionaria.

La esterilidad del cultivo se mantuvo, evidenciada mediante las pruebas de esterilidad y tinción de Gram, lo que da soporte a la conservación por parte del BR de las condiciones de cultivo.

8. RECOMENDACIONES

Para el uso del biorreactor con microalgas fue implementada la fuente de energía lumínica con ayuda de luces LED, en este caso la aireación suministraría al cultivo dióxido de carbono como fuente de carbono para el proceso de fotosíntesis, otorgando el nombre de FBR. De esta manera el sistema está listo para su implementación en el cultivo de microorganismos fotoautótrofos.

El sistema de muestreo llevaba a cabo una esterilización en cada muestreo con ayuda de etanol, con el fin de disminuir posibles contaminantes que se pueden almacenar en el colector y posteriormente infiltrar en el cultivo, se recomienda desarrollar pruebas para evaluar la posibilidad de contaminación a través del sistema de succión (tubo de acero inoxidable) cuando está sin operación.

La implementación de la intensidad lumínica y correlación con la densidad celular, puede ser una alternativa para el seguimiento de la evolución del cultivo sin necesidad del uso de un muestreador, para esto se debe tener completa seguridad en la estabilidad y precisión del sistema de iluminación y de medida de la intensidad de ésta, respectivamente.

El uso de difusores de burbujas para mejorar la transferencia gaseosa al cultivo a partir de resina epóxica es prometedor. Es posible probar otros diseños para optimizar su estabilidad y desempeño. Se recomienda determinar el tiempo de vida útil y su contribución salina al medio de cultivo, determinando si es o no aceptable para el equilibrio osmótico de las células.

El uso de un cordón de resistencia como elemento de calentamiento presentó dificultades para alcanzar y mantener una temperatura de 37°C, fue necesario un aislamiento para su funcionamiento, este problema se puede solucionar adicionando un cordón de resistencia más al sistema electrónico, disponiéndolo en las paredes de la caja contenedora.

En el caso del cultivo de microorganismos que requieran de mayor tiempo para su crecimiento, se recomienda considerar según la necesidad del estudio la reposición de agua o directamente del medio de cultivo, por medio de la bomba peristáltica desarrollada.

La tubería galvanizada, es un material económico y con mayor resistencia, alternativo al PVC que conforma el sistema de muestreo, que luego de ser sometido a la esterilización varias veces presentó pequeñas deformaciones.

El filtro hidrófobo implementado demostró un cambio en el color de su interior tornandose oscuro, debido a la retencion de particulas en su membrana, esto no tuvo un efecto luego de 3 meses de funcionamiento. Por esto es recomendable determinar el periodo de vida útil de éste para el control de la esterilidad.

9. AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecemos a la universidad Distrital Francisco Jose de Caldas por habernos aceptado ser parte de ella y por los diversos profesores que guiaron nuestro aprendizaje.

Agradecemos a nuestros directores de tesis, por brindarnos la oportunidad y apoyo a lo largo del proyecto de grado.

A nuestras familias por ser parte esencial a lo largo del camino demostrando su apoyo y acompañamiento.

Y por último a la universidad Antonio Nariño por brindarnos sus instalaciones y equipos para el desarrollo del presente trabajo.

10. RECURSOS DISPONIBLES

Recursos humanos

Esta investigación cuenta con los docentes investigadores, Directores: **JUAN DANIEL VALDERRAMA** Ingeniero Químico de la Universidad Nacional de Colombia y Doctor en Ingeniería Química de la Universidad de Cornell y **JOSUE ANSELMO GARCIA ORTÍZ** Químico de la universidad Nacional de Colombia y los tesistas **ERIKA VIVIANA MORENO RIVERA** y **DANIEL FERNANDO VANEGAS GUTIERREZ** estudiantes de Licenciatura en Química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Recursos físicos

El desarrollo de la investigación se realizó al interior de la Universidad Antonio Nariño, en el espacio físico del laboratorio de Ingeniería Ambiental ubicado en el segundo piso de las instalaciones de los laboratorios de investigación de la sede circunvalar, contando con las herramientas y material correspondientes y los insumos de reactivos, equipos de instrumentación técnica de alta tecnología y otros necesarios para la investigación.

11. CRONOGRAMA

Tabla 6. Cronograma de actividades

ACTIVIDADES	MES																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
Revisión bibliográfica y consulta de estado del arte.																				
Elaboración esquemática de un prototipo de fotobiorreactor.																				
Selección de variables de control y de medida.																				
Desarrollo de métodos para las variables establecidas de control y medida.																				
Desarrollo de suministro de fuente de oxígeno y nutrientes para el crecimiento de <i>E.coli</i> MC4100.																				
Determinación de requisitos para la selección de materiales y recipiente adecuados en su construcción.																				
Desarrollo del método de mezclado.																				
Desarrollo de una bomba peristáltica para la reposición de agua evaporada.																				

12. BIBLIOGRAFIA

1. Altieri M a., Nicholls Cl. Agroecología y resiliencia al cambio climático: Principios y consideraciones metodológicas. Agroecología [Internet]. 2013;8(1):7–20. Available from: <http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2056/servlet/articulo?codigo=4536643&info=resumen&idioma=ENG>
2. Ruiz-Leza, H.A R. R. DISEÑO DE BIORREACTORES PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO. redalyc. 2007;
3. L. LIB. Introducción al diseño de reactores. 2009;
4. Lafarga Poyo T. Aspectos prácticos de la producción de microalgas: Objetivos y Necesidades. Univ Almer. 2013;44.
5. Hagen MT. Temperature Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors. 2009;(February).
6. Merchuk JC, Wu X. Modeling of photobioreactors: Application to bubble column simulation. J Appl Phycol. 2003;15:163–9.
7. Vunjak-novakovic G, Kim Y, Wu X, Berzin I. Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas: Mathematical Modeling and Pilot-Plant Studies. 2005;6154–63.
8. Cuervo CMG, Silva DKG. propuesta de diseño de un sistema continuo para un fotobiorreactor air-lift a escala laboratorio. 2016;
9. Edinson R, Choez P. Determinación de los parámetros biocinéticos K, Ks, Kd, Y; para su aplicación en el diseño de un Biorreactor tipo Batch. 2016;
10. Lopez F, Morales E. “Prototipo de un fotobiorreactor.” 2006;
11. Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresour Technol [Internet]. 2011;102(1):35–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
12. Arnáiz C, Isac L, Lebrato J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Tecnol del agua. 2000;45–52.
13. Gupta PL, Lee SM, Choi HJ. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. World J Microbiol Biotechnol. 2015;31(9):1409–17.
14. Blanch AR. Biotecnología ambiental . Aplicaciones biotecnológicas.

2010;183–98.

15. Ibarbalz FM. Metagenómica de lodos activados. Factores determinantes del ensamblado de comunidades bacterianas en el tratamiento de efluentes. 2016;
16. Ruiz A. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Univ Politécnica Val. 2011;102.
17. Alvarez HM, Blanco M, Fajardo MA. La producción de Biocombustibles Biocombustibles con eficiencia , estabilidad y equidad. 2007;1–7.
18. Pablo J, Moreno M. Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial evaluation and selection of microorganisms for ethanol production at industrial level. 2011;
19. Priyadarshani I, Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. J Algal Biomass Util. 2012;3(4):89–100.
20. Media E, Negra P, Khatima I. BACTERIA. 2010;(1020).
21. Varela G. Fisiología y metabolismo bacteriano. :1–8.
22. Quiroga A. Optimización del Cultivo de Escherichia Coli para la Producción de Cutinasas Recombinantes. 2015;(April).
23. Rubio Fernández D, Sierra Herrera JA, Ruiz Fonseca S, Sandoval Herrera JA. Diseño de un fotobioreactor Airlift a escala de banco. Elementos. 2014;4:21.
24. Fernandez M. ~ o , montaje y caracterizaci o ´ n Dise ñ de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga Chlorella sorokiniana. 2013;13–5.
25. M, Beltran; A M. Tema 1. estructura y propiedades de los polímeros 1. :1–54.
26. REPRESENTACIONES INDUSTRIALES R.D.V LTDA [Internet]. 2017. Available from: <http://rdv.com.co/mangueras-silicona-usos-aplicaciones/>
27. De la Torre F. Apuntes de espectrofotometría . :1–20.

