DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERES COMERCIAL.

JORGE EDUARDO MARROQUIN FANDIÑO

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN QUÍMICA
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA 2018

JORGE EDUARDO MARROQUIN FANDIÑO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
LICENCIADO EN QUÍMICA

DIRECTORES:

JOSUÉ ANSELMO GARCIA ORTÍZ
Químico Universidad Nacional de Colombia.

JUAN DANIEL VALDERRAMA
Ingeniero Químico Universidad Nacional de Colombia
Doctor en Ingeniería Química y Biomolecular Universidad de Cornell

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN QUÍMICA
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
2018

"*…With equal passion I have sought knowledge. I have wished to understand the hearts of men. I have wished to know why the stars shine. And I have tried to apprehend the Pythagorean power by which number holds sway above the flux. A little of this, but not much, I have achieved. …* "

Bertrand Russell

AGRADECIMIENTOS

Desde muy joven tuve un gran maestro, que me enseñó a transformar el mundo tan solo con mis manos, aprendí de él que todo puede ser más sencillo si uso la herramienta correcta, pero sobre todo si cuento con el conocimiento para usarla, muchas gracias a mi abuelo José Álvaro.

Mi camino se tornó brillante de sonrisas, alegre de ocurrencias, trascendente de sueños, inspirador de conocimientos al compartir con buenos amigos. Pese a llevar años sin ver a muchos, sin compartir tardes soleadas sentados en la grama, los llevo en mi corazón, gracias por haber compartido etapas del sendero, gracias Mike, Jhony, Alejandro, Jhulian, Teff, Pauline, Tata, Carlos, Sally, Deisy, Didier, muchas gracias.

De pequeño adoraba leer las fabulosas historias de Verne, cargadas de artefactos y máquinas que solo mentes excelsas serían capaces de crear, nunca imaginé que asistiría hazañas semejantes, pero de hecho así fue, muchas gracias a los Ingenieros Andrés Valderrama y Arturo López por permitirme trabajar hombro a hombro creando instrumentos que muchas veces creí inalcanzables.

Agradezco además al grupo de investigación GRESIA de la Universidad Antonio Nariño, personas magníficas y cálidas, ha sido un gusto compartir estos dos años con ustedes.

Este trabajo no habría sido posible sin el Doctor Juan Daniel Valderrama, poseedor de un intelecto portentoso y capacidades creativas colosales, quien además de guiar el desarrollo de esta investigación, la financió totalmente. Muchas gracias profesor estaré infinitamente agradecido con usted.

Finalmente, gracias a todos esos desconocidos que, por años, con ímpetu, gallardía y grandes sacrificios han resistido los poderes de turno, permitiendo que miles logremos acceder a la educación superior.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS **4**

INDICE DE FIGURAS **8**

ABREVIATURAS **10**

RESUMEN **11**

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN **12**

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN **14**

3. OBJETIVOS **15**

3.1. OBJETIVO GENERAL **15**

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS **15**

4. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL **16**

4.1. BIOREACTORES **16**
4.1.1. Tipos de Biorreactores 16
4.1.2. Modo de operación hidráulico 17

4.2. FOTOBIORREACTORES **22**
4.2.1. Reactores de placa plana (fpr): 22
4.2.2. Reactores Tipo Fermentador (FTR) 22
4.2.3. Reactores Tubulares (TR) 23

4.3. DISEÑO **26**
4.3.1. Fases del Proceso de Diseño 26
4.3.2. Característica para el Diseño 28
4.3.3. Elementos de diseño biorreactores 28

4.4. REACTORES COMERCIALES **28**
4.4.1. Bioflo (Eppendorf) 29
4.4.2. Otros Reactores 29

4.5. CULTIVO DE MICROORGANISMOS **30**
4.5.1. Parámetros de Crecimiento 30
4.5.2. Curvas de Crecimiento 32

4.6. **ORGANISMOS MODELO PARA PRUEBAS DE CULTIVO** **34**
4.6.1. E. coli MC4100 34

5. METODOLOGÍA 35

5.1. MATERIALES 35
5.1.1. SOFTWARE 35
5.1.2. MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN PARA PROTOTIPADO: 35
5.1.3. SUMINISTRO, CONTROL Y SEGUIMIENTO ELCETRÓNICO 35
5.1.4. Cepa utilizada y medio de cultivo 38

5.2. PROTOTIPADO 38

5.3. DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL SENSOR DE MEDIDA ÓPTICA DESARROLLADO 39
5.3.1. Prueba de estabilidad 39
5.3.2. Barrido en el espectro visible del colorante verde limón. 39
5.3.3. Curvas de calibración para los sensores usando el colorante verde limón. 39

5.4. ENSAYO DE TRAZADORES 40
5.4.1. Modo de operación 40
5.4.2. Protocolo de introducción y seguimiento del trazador 42
5.4.3. Puntos de alimentación probados 42

5.5. CULTIVOS 43
5.5.1. Cultivo en milibiorreactor 43
5.5.2. Protocolos de cultivos 43
5.5.3. Final de los ensayos 43

5.6. MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR 44
5.6.1. Curva de calibración E.coli MC4100 44
5.6.2. Curva de calibración Chlorella sp. 44

6. DESARROLLO DE LA PROPUESTA 46

6.1. DEFINICIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DEL PROTOTIPO 46
6.1.1. Características generales para el biorreactor 46
6.1.2. Factores generales para el cultivo de microorganismos 46
6.1.3. Características generales para el dispositivo óptico de medida 46

6.2. DISEÑO CONCEPTUAL ASISTIDO POR SOFTWARE 46
6.2.1. Biorreactor 46
6.2.2. Celdas de medida 47
6.2.3. Armazón del sensor óptico 47
6.2.4. Cámara de incubación 48

6.3. PROTOTIPADO FUNCIONAL 48
6.3.1. Biorreactor (riser) 48
6.3.2. Celdas de medición 50
6.3.3. Armazón de los sensores de medida 51
6.3.4. Ensamble sistema de aireación 53
6.3.5. Cámara de incubación 53
6.3.6. Ensamble riser, downcomer y sistema de aireación. 54

6.4. PRUEBAS ELEMENTALES DE FUNCIONAMIENTO 55

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 56

7.1. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO 56

7.2. CURVAS DE COMPARACIÓN CONTRA ESPECTROFOTÓMETRO 57

7.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN COLORANTE VERDE LIMÓN 60

7.4. ENSAYO DE TRAZADORES 61

7.5. PRUEBAS DE CRECIMIENTO CON MICROORGANISMOS 63
7.5.1. Ensayo con cultivo E. coli MC4100 63
7.5.2. Ensayo con cultivo Chlorella 66

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 68

8.1. CONCLUSIONES 68

8.2. CONCLUSIONES ADICIONALES Y RECOMENDACIONES 68

9. RECONOCIMIENTOS 71

10. BIBLIOGRAFÍA 72

11. ANEXOS 75

11.1. COTIZACIÓN BIOFLO120® 75

11.2. BARRIDO EN EL ESPECTRO PARA COLORANTE VERDE LIMÓN 75

11.3. DATOS BARRIDO EN EL ESPECTRO PARA COLORANTE VERDE LIMÓN 75

11.4. CURVAS DE CALIBRACIÓN COLORANTE VERDE LIMÓN A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA EN ESPECTROFOTÓMETRO 75

11.5. PRUEBA DE ESTABILIDAD DE SENSORES 75

11.6. DATOS ENSAYOS DE CRECIMIENTO *E.COLI MC4100* 75

11.7. CURVA DE CALIBRACIÓN EN ESPECTROFOTÓMETRO DE *CHLORELLA SPP* 76

11.8. CURVAS DE COMPARACIÓN PARA *CHLORELLA SPP* ESPECTROFOTÓMETRO CONTRA LOS SENSORES DE MEDIDA ÓPTICA 76

11.9. DATOS ENSAYO DE TRAZADORES INYECCIÓN SUPERFICIAL 76

11.10. DATOS ENSAYO DE TRAZADORES INYECCIÓN EN PROFUNDIDAD 76

11.11. DATOS ENSAYOS DE CRECIMIENTO *CHLORELLA SPP* 76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Situaciones en reactores reales....18
Figura 2 Técnica de trazadores en un biorreactor....19
Figura 3 Curvas de respuesta a entrada por pulso. 20
Figura 4 Diagnóstico de la operación para reactores de tanque perfectamente agitado....21
Figura 5 Representación esquemática de reactores (A) Airlift simple y (B) columna de burbujeo. 24
Figura 6 Modelos convencionales de flujo para ALR....25
Figura 7 Diferentes tipos de separadores de gas para bucles internos y externos. Modificado de [31]....25
Figura 8 Resumen esquemático de los tipos de fotobiorreactores....26
Figura 9 Fases en el proceso de diseño....27
Figura 10 Reactor comercial BioFlo® 120 para cultivo y escalado....29
Figura 11 Biorreactor comercial modelo SF-2L del fabricante Kori Instruments Tomado de http://www.korichina.com/?p=332....30
Figura 12 Esquematización de la curva de crecimiento bacteriano para el modelo biológico E.coli....33
Figura 13 Métodos para determinar el crecimiento....33
Figura 14 Componentes electrónicos básicos: LDR y LED....36
Figura 15 Circuitos interconectados (sensores y almacenamiento de datos) 36
Figura 16 Esquema del tráfico de datos....37
Figura 17 Circuito controlador de temperatura con la respectiva sonda 37
Figura 18 Bomba peristáltica y circuito controlador. 38
Figura 19 Fases de diseño desarrolladas....39
Figura 20 Ensayo de trazadores con tres milibiorreactores....41
Figura 21 Ensayo de trazadores (esquema de flujos para un milibiorreactor) 41
Figura 22 Cortes laterales del biorreactor. 42
Figura 23 Armazones 3D diseñados en blender. 48
Figura 24 Molde para riser hecho en silicona (vistas laterales). 49
Figura 25 Riser obtenido en resina poliéster a partir del molde....49
Figura 26 Celda de para milibioreactor 50
Figura 27 Celda para la salida del reactor....51
Figura 28 Armazones impresos con componentes electrónicos empotrados 52
Figura 29 Celdas para salida de 3 milibioreactores con sistema de medida óptico ensamblado....52
Figura 30 Tubo de aireación para milibioreactores....53
Figura 31 Cámara de incubación....54
Figura 32 Milibiorreactor....54
Figura 33 Prueba de estabilidad de sensores electrónicos....56
Figura 34 Correlaciones espectrofotómetro a 420nm y sensores electrónicos....58
Figura 35 Correlaciones espectrofotómetro a 630nm y sensores electrónicos....58
Figura 36 Correlaciones espectrofotómetro a 680nm y sensores electrónicos....59
Figura 37 Curva de calibración para los sensores de medida óptica. 60
Figura 38 Gráfico ensayo de trazadores inyección en superficie....62

Figura 39 Gráfico ensayo de trazadores inyección en profundidad 62
Figura 40 Curva de calibración para E. coli MC4100 en los sensores de medida óptica 63
Figura 41 Primer ensayo de crecimiento E. coli MC4100 64
Figura 42 Primer ensayo de crecimiento E. coli MC4100 64
Figura 43 Curva de calibración para Chlorella sp. para los sensores de medida óptica 66
Figura 44 Cultivo de Chlorella sp. primeros 8000 minutos 67
Figura 45 Barrido en el espectro para el colorante verde limón 75
Figura 46 Curvas de calibración a partir de soluciones seriadas de colorante a diferentes longitudes de onda 75

ABREVIATURAS

AGM: Fotobiorreactor con marca comercial: AquasearchGrowth Module

ALR: Reactor Airlift

AU: Unidades arbitrarias

BR: Biorreactor

C: Concentración

DFT: Diseño para pruebas

DFE: Diseño para la excelencia

Eq: Ecuación

FBR: Fotobiorreactor

FE: Fase exponencial

FPR: Reactor de placa plana

FS: Fase estacionaria

FTR: Reactor tipo fermentador

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

HeTR: Reactor tubular helicoidal

HTR: Reactor tubular horizontal

LDR: Fotorresistencia

LED: Diodo emisor de Luz

PLA: Ácido poliláctico

PVC: Policloruro de vinilo

RTD: Distribución del tiempo de residencia

TR: Reactor Tubular

UAN: Universidad Antonio Nariño

VTR: Reactor tubular vertical

RESUMEN

Se desarrolló un nuevo prototipo funcional de biorreactor cuyo costo de construcción se encuentra alrededor del 3% del costo de un equipo comercial especializado en el crecimiento celular. El nuevo modelo incorpora además un sistema de medida óptica que no se encuentra en el mercado, cuya finalidad es el seguimiento del crecimiento de cultivos de microorganismos de manera automática.

Tras el desarrollo de varias fases de diseño que unían la experiencia, conocimientos teóricos respecto a los procesos de cultivo, conocimientos técnicos en el uso de equipos de laboratorio y procesos de fabricación (moldeo con silicona e impresión 3D). Se logró obtener 3 equipos funcionales, sobre los que se realizaron diferentes pruebas como: resistencia a los procesos de esterilización, estabilidad del sistema de medida óptica mediante el uso de un colorante, ensayos de crecimiento por triplicado de un organismo modelo (*Escherichia coli MC4100*) y de una especie no determinada del género Chlorella.

Los resultados obtenidos en primera medida se relacionan con la resistencia de los nuevos recipientes a los procesos de esterilización por autoclavado, mostrando integridad física en al menos 12 ciclos. El sistema de lectura óptica se logró construir con componentes electrónicos muy comunes y por ende de muy bajo costo, las medidas mostraron ser muy estables presentando vibraciones muy pequeñas (entre 0,5% y 0,9%). Las curvas de calibración construidas, a partir de diluciones seriadas para el sensor de medida óptica mostraron ajustarse a una tendencia lineal con coeficientes de correlación de mínimo 0,9911. Finalmente, los nuevos milibiorreactores fueron capaces de replicar las condiciones necesarias para el cultivo del modelo biológico y a la vez permitió realizar un seguimiento del crecimiento de manera no invasiva, haciendo lecturas directamente sobre el medio de cultivo. Es decir, se logró prescindir del muestreo clásico. A su vez el crecimiento exhibido por la población bacteriana se ajusta en forma y proporción a los crecimientos reportados en la literatura para estos organismos.

Se logró demostrar además que: ensayos de crecimiento desarrollados con este nuevo equipo, podrán prescindir del uso de instrumentos de laboratorio como el espectrofotómetro y que además se podrán obtener datos suficientes como para modelar las cinéticas de crecimiento de al menos los microorganismos que se asemejen al modelo biológico evaluado.

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El cultivo de algunos microrganismos como algas unicelulares y bacterias se ha desarrollado con base en dos grandes objetivos: (i) con el fin de suplir escasez de productos como consecuencia de crisis económicas y/o políticas, (ii) la obtención de compuestos como pigmentos, proteínas, enzimas, azúcares, ácidos grasos y vitaminas cuyos valores en el mercado resultan atractivos y por tanto se perciben como alternativas económicamente viables [1], [2].

A nivel industrial se cultivan microorganismos con diversos fines: obtención de grandes cantidades de biomasa, obtención de biocombustibles[3], obtención de bioproductos derivados como colorantes, ácidos grasos poliinsaturados y polisacáridos [4], [5], inclusive se han planteado aplicaciones en áreas como la biorremediación [3], donde se han evaluado múltiples microorganismos como potenciales agentes biorremediadores: investigaciones realizadas a escala piloto de algas cultivadas en biorreactores mostraron eficiencias de remoción de CO_2 de 82.3 ± 12.5% en días soleados y 50.1 ± 6.5% en días nublados, teniendo además como valor agregado el aumento de la masa algal [6].

Algunas moléculas específicas para la industria farmacéutica o en la denominada química fina comenzaron a ser obtenidas mediante el cultivo de microorganismos. Históricamente puede citarse el cultivo de *Isochrysis aff. galbana Green,* obtenida en biorreactores operados en continuo, las densidades celulares mostraron niveles de $5{,}18 \times 10^{11}$ células d^{-1} siendo las más altas obtenidos a la fecha del estudio [7]. De esta alga es posible obtener fucoxatina: un pigmento carotenoide que durante muchos años se ha usado en el tratamiento de la obesidad y la diabetes [8], y que en resientes investigaciones ha mostrado potenciales usos en el tratamiento en líneas celulares cancerígenas y tumores [9], [10].

Los procesos de cultivo de los microorganismos son realizados en biorreactores. En el caso de los estudios en laboratorio existen dos posibilidades de cultivo: (i) equipos comerciales de alto costo como el reconocido *Bioflo* de Eppendorf, (ii) operar con el reactor más sencillo a escala de laboratorio: el matraz *Erlenmeyer* (que requiere equipos adicionales para simular las condiciones de cultivo).

Cuando se desean hacer estudios específicos sobre las fases de crecimiento que permitan dilucidar los comportamientos, las respuestas a alteraciones físicas o químicas, la producción de metabolitos y en general todos aquellos aspectos relacionados con el desarrollo de los microorganismos en los medios de cultivo, suelen realizarse cinéticas de crecimiento, que, en esencia, son el producto de un seguimiento en el tiempo del crecimiento de un conjunto de microorganismos en un medio nutritivo. Con el fin de realizar estos estudios han surgido diferentes métodos

de análisis, el más extendido por su confiabilidad, rapidez y sencillez es el método óptico.

El método óptico para el estudio del crecimiento microbiano consiste en la determinación de la absorción de radiaciones electromagnéticas por un medio líquido cuando éstas (las radiaciones) lo atraviesan. En la práctica se requieren equipos especializados (colorímetros o espectrofotómetros) para realizar las lecturas de absorción.

Cuando los microorganismos presentan tiempos de generación cortos como es el caso de algunas bacterias (*Escherichea coli*, *Klebsiella sp*.) la construcción de una curva de crecimiento puede realizarse en cuestión de horas, mientras que organismos con tiempos de generación más prolongados como las algas (*Chlorella sp. Dunaliella sp*) pueden requerir un seguimiento continuo durante días e incluso semanas [11], [12].

Las limitaciones y riesgos del método óptico son: (ii) la toma de muestras ha de realizarse continuamente, es decir requiere un operario que efectúe el proceso, (ii) en rectores pequeños la suma de todas las extracciones de muestra modifica considerablemente el volumen total, (iii) cuando se realiza el muestreo se corre el riesgo de contaminar el medio y arruinar toda la operación, (iv) existe un número finito de muestras que pueden ser extraídas del volumen total, (v) el comportamiento real no es totalmente conocido (por las alteraciones en el volumen y la imposibilidad de conocer el estado del reactor en todo momento) quedando como alternativa la aproximación matemática.

El proceso de explotación comercial de los microorganismos se conserva vigente debido a la gran variedad de especies y los múltiples campos de acción ya mencionados. Uno de los pasos fundamentales que debe atenderse con el fin de explotar comercialmente un microorganismo es la investigación en el laboratorio. Han de realizarse múltiples ensayos de crecimiento que permitan establecer las condiciones de cultivo y además realizar extracciones de unos pocos miligramos del producto de interés con el fin de estimar la viabilidad del proceso productivo [2].

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En los laboratorios de microbiología es habitual realizar cinéticas de crecimiento para estudiar el comportamiento de los microorganismos frente a diferentes factores (agentes físicos, agentes químicos, respuesta a modificaciones genéticas etc). El seguimiento del crecimiento se ha desarrollado mediante diferentes métodos, el más sencillo, rápido y confiable es el método óptico, que consiste fundamentalmente en la toma de muestras periódicas del cultivo para realizar medidas de absorción de luz mediante un instrumento (espectrofotómetro, colorímetro o nefelómetro) y finalmente, por aproximaciones matemáticas se estima el crecimiento microbiano. En la aplicación de este procedimiento surgen múltiples inconvenientes y situaciones no deseables: (i) han de tomarse un número de muestras significativo con el fin de representar de manera fiable el crecimiento del cultivo por tanto los volúmenes de trabajo en los reactores han de ser altos (para la escala de laboratorio), (ii) aun cuando el protocolo de muestreo sea realizado con la mayor rigurosidad se corre el riesgo de contaminar los medios de cultivo, (iii) el procedimiento demanda la presencia de un operario que constantemente realice la toma de muestras, (iv) la aproximación matemática puede no representar el comportamiento real. A estos inconvenientes de orden práctico se suman otras situaciones de orden económico (debido fundamentalmente a la necesidad de realizar múltiples ensayos que suministren suficiente información para los métodos estadísticos propios de estos estudios) como: costo de los equipos especializados para el cultivo de microorganismos (biorreactores), costos de operación para los ensayos. Ahora bien, con el fin de facilitar la elaboración de las cinéticas de crecimiento ¿Para el estudio de las cinéticas de crecimiento microbiano, de qué manera conservar las facilidades del método óptico y a la vez superar los inconvenientes propios de su ejecución?

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una nueva arquitectura de biorreactor, capaz de operar con bajos volúmenes, que integre un dispositivo de seguimiento del crecimiento poblacional de los microorganismos, con el fin de facilitar los procesos investigativos relacionados con las cinéticas de crecimiento microbiano.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar un biorreactor que permita mantener los parámetros necesarios para el crecimiento de microorganismos, incorporando un dispositivo óptico de medida.

2. Construir prototipos funcionales de biorreactores con sistemas de seguimiento poblacional que permitan disminuir costos de operación y producción.

3. Caracterizar hidrodinámicamente los biorreactores mediante ensayo de trazadores con el fin de establecer condiciones de operación.

4. Evaluar los biorreactores con cultivos de microorganismos modelo con el fin de estimar la viabilidad para el estudio del crecimiento.

4. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

4.1. BIOREACTORES

Los reactores en los cuales se puede disponer un medio de cultivo y son susceptibles de mantener las condiciones específicas para el crecimiento de microorganismos se denominan biorreactores.

4.1.1. Tipos de Biorreactores

Los procesos de cultivo en medio líquido se desarrollan en dos tipos de sistemas: abiertos y cerrados (Borowitzka, 1999).

4.1.1.1. Sistemas Abiertos

Los sistemas abiertos son aquellos que permiten el intercambio de materia y energía con sus alrededores, en estos espacios es posible disponer medios líquidos de cultivo, a su vez permiten el control de algunas variables de crecimiento (alimentación, flujo, aireación etc). son habitualmente usados para producción direccionada a la obtención de grandes masas.

Los cultivos en sistemas abiertos presentan dos grandes problemas: la productividad es baja y la exposición al ambiente ocasionan frecuentemente contaminaciones [13]. El éxito de estos sistemas se debe a las especies cultivadas, en virtud de su comportamiento similar a las malezas como es el caso de la *Chlorella* o por la capacidad para soportar condiciones de crecimiento adversas como *Spirulina* y *Dunaliella.* Bajo otras características, los procesos de cultivo en estos sistemas colapsan por la presión de organismos contaminantes [2].

4.1.1.2. Sistemas Cerrados

*L*os sistemas cerrados comprenden todos aquellos biorreactores en los cuales los medios de cultivo se aíslan del ambiente mediante barreras físicas, limitando el intercambio de materia. Estos sistemas minimizan la posibilidad de contaminación de los medios de crecimiento con microorganismos foráneos, en esencia propenden por la asepsia.

Los sistemas cerrados tienen otras prestaciones tales como: la posibilidad de mantener medios de cultivo homogéneos, reducir las pérdidas energéticas, volúmenes estables de crecimiento, en general, un mejor control de las variables de cultivo, lo que deriva en una mejor producción de biomasa [14]–[16].

Algunos estudios han comparado la producción en los dos sistemas encontrando que son más eficientes los sistemas cerrados, por ejemplo: La producción de

polisacáridos de dos especies *Porphyridium sp. y P. aerugineum* en sistemas cerrados mostró que el número de células, la biomasa y la producción de polisacáridos fueron mayores que en los reactores abiertos [13]. Y en otro estudio con el mismo enfoque se obtuvo resultados similares en el cultivo de S*pirulina platensis* y *S. Maxima* donde se alcanzó casi el doble de producción por año respecto a los sistemas abiertos [14].

Tabla 1 Principales características de diseño de biorreactores abiertos y cerrados [17]

Característica	Sistemas Abiertos	Sistemas Cerrados
Relación área-volumen	grande (4-10 veces mayor que la contraparte cerrada)	Pequeña
Especies de algas	Restringida	Flexible
Criterios principales para la selección de especies	Competencia de crecimiento	Resistencia al corte
Densidad de población	Baja	Alta
Eficiencia de cosecha	Baja	Alta
Periodo de cultivo	Limitado	Extendido
Contaminación	Posible	Improbable
Pérdida de agua por evaporación	Posible	Evitable
Eficiencia de utilización de luz	Pobre / Razonable	Razonable / excelente *
Transferencia de gas	Pobre / Razonable	Razonable / alta
Temperatura control	Ninguna	Excelente
Parámetros más costosos	Mezclado	Control de Oxígeno Control de Temperatura
Inversión de capital	Bajo	Alto

4.1.2. Modo de operación hidráulico

4.1.2.1. Modelos de Operación

Los biorreactores pueden ser considerados bajo cuatro modelos de funcionamiento[18]:

4.1.2.1.1. Tanque agitado continuo

Presentan flujos de alimentación y salida uniformes, junto con agitación perfecta y la composición en la salida se corresponde con la composición en el interior del reactor. No hay acumulación de nutrientes ni biomasa.

4.1.2.1.2. Flujo pistón

El flujo en este biorreactor es ordenado. Durante el paso del fluido a través del biorreactor ninguna fracción del mismo sobrepasa a otra, ni se mezcla entre sí con fracciones situadas antes o después.

4.1.2.1.3. Discontinuos por lotes (batch)

En este tipo de biorreactores no hay flujo constante de nutrientes, se carga una vez con todas las condiciones para su operación, se inicia y se descarga tras el lapso operativo. Se reinicia el proceso con la siguiente carga, el reactor se encuentra perfectamente agitado, por tanto, la composición de la biomasa y de los nutrientes del caldo de cultivo son iguales en todos los puntos para un instante de tiempo dado.

4.1.2.1.4. Por lotes alimentado (Fed-batch)

Es una técnica de cultivo batch donde el medio nutritivo es suministrado continuamente o alguno de los componentes. En casos donde el nutriente suministrado es el limitante del crecimiento resulta posible controlar la velocidad específica de crecimiento del microorganismo [19].

4.1.2.2. Comportamiento real

Los modelos de operación descritos en el apartado 4.1.2.1. corresponden a las formas ideales. La operación real puede presentar cortocircuitos, recirculaciones y zonas muertas. Suelen aplicarse procedimientos matemáticos para clasificar los reactores dentro de las formas de comportamiento hidráulico idealizadas.

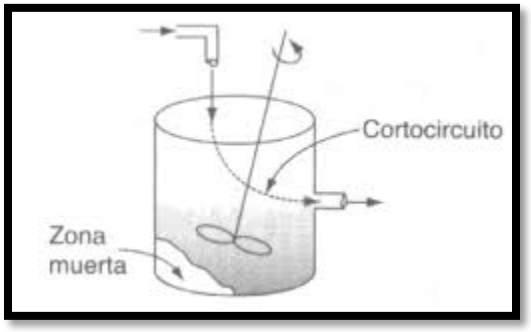


Figura 1 Situaciones en reactores reales
Tomado de: [20]

4.1.2.2.1. Distribución del tiempo de residencia

El tiempo que transcurre desde que un elemento entra al reactor hasta que lo abandona es denominado *tiempo de residencia.* En los modos de operación ideales flujo pistón y por lotes el tiempo de residencia es el mismo para todos los átomos, mientras que en los otros modos de operación los átomos alimentados gastan tiempos diferentes dentro del reactor lo que se conoce como una distribución de tiempos de residencia (RTD), la cual ofrece pistas importantes para estimar el tipo de mezclado en un reactor [20].

El tiempo de residencia teórico (τ) se representa en la ecuación 4.1, donde V

corresponde al volumen de operación en el reactor, mientras que v es el flujo volumétrico de alimentación.

$$\tau = \frac{V}{v}$$

Ecuación 1

4.1.2.2.2. Ensayo de Trazadores

Para estimar el comportamiento hidráulico en un biorreactor se puede efectuar el ensayo de trazadores, el cual consiste en la incorporación de una sustancia denominada trazador sobre la que posteriormente se realizan medidas de concentración en función del tiempo.

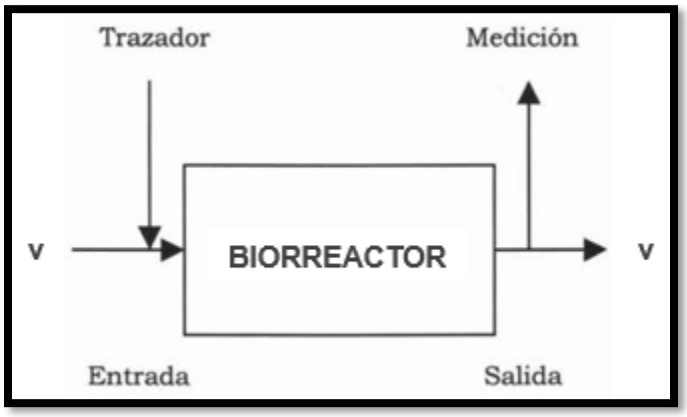


Figura 2 Técnica de trazadores en un biorreactor

Según Fogler [20] los materiales coloreados, radioactivos y gases inertes son los trazadores más comúnmente usados. Mientras que los métodos más empleados para la incorporación del trazador al reactor son:

1) Entrada por pulso: Inyección rápida en la corriente de alimentación de una porción pequeña pero muy concentrada de trazador para posteriormente medir en la salida la concentración en función del tiempo.

2) Entrada por escalón: El trazador se añade a velocidad constante en la entrada del reactor.

Una vez medida la concentración del trazador en la salida del reactor se obtienen los datos suficientes para graficar la función C(t) (la concentración respecto al tiempo del trazador en la salida del reactor) pudiendo obtenerse gráficas como las ilustradas en la figura 3.

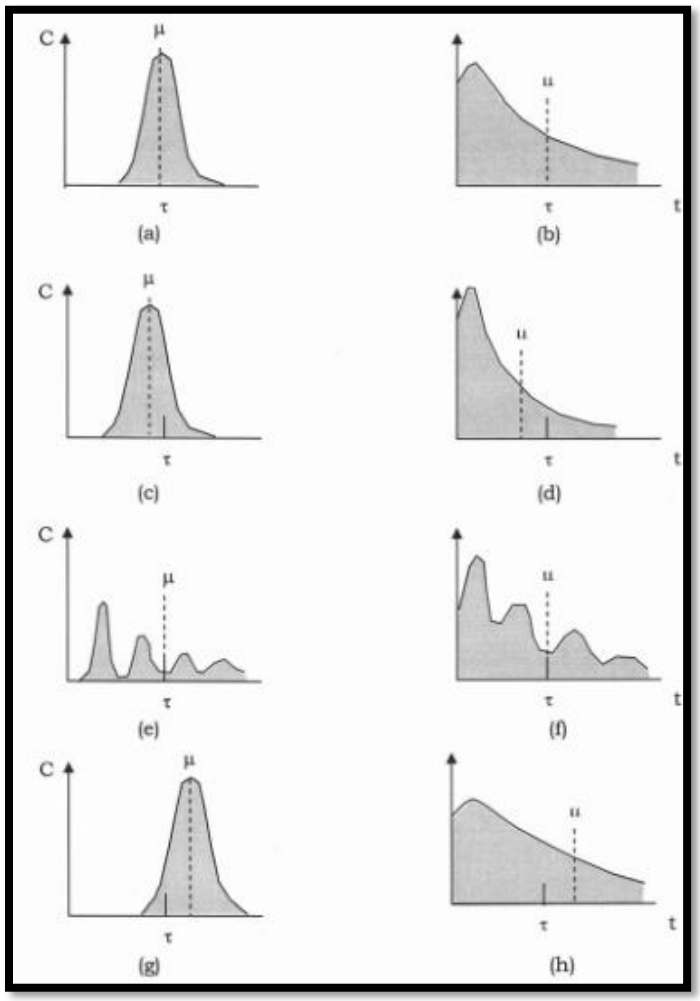


Figura 3 Curvas de respuesta a entrada por pulso.
Las gráficas a) c) e) g) corresponden a un comportamiento flujo pistón, mientras que las curvas b) d) f) h) corresponden a un comportamiento de mezcla completa. Los tiempos mostrados y las concentraciones dependen de cada ensayo en particular.
Tomado de: [21]

Según Fogler a partir de la función C(t), teniendo en cuenta un flujo constante de alimentación y mediante deducciones matemáticas que no se mostraran en este texto se obtiene la función normalizada E(t) llamada función de distribución del tiempo de residencia (Ecuación 2).

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^\infty C(t)\,dt}$$

Ecuación 2

Puede demostrarse además que: el valor del tiempo de residencia τ puede obtenerse a partir de la función E(t) (Ecuación 3) y de esta manera tener un valor experimental susceptible de ser comparado con el valor teórico y así determinar condiciones del comportamiento hidráulico del reactor en estudio.

$$\tau = \int_0^{\infty} tE(t)\,dt$$

Ecuación 3

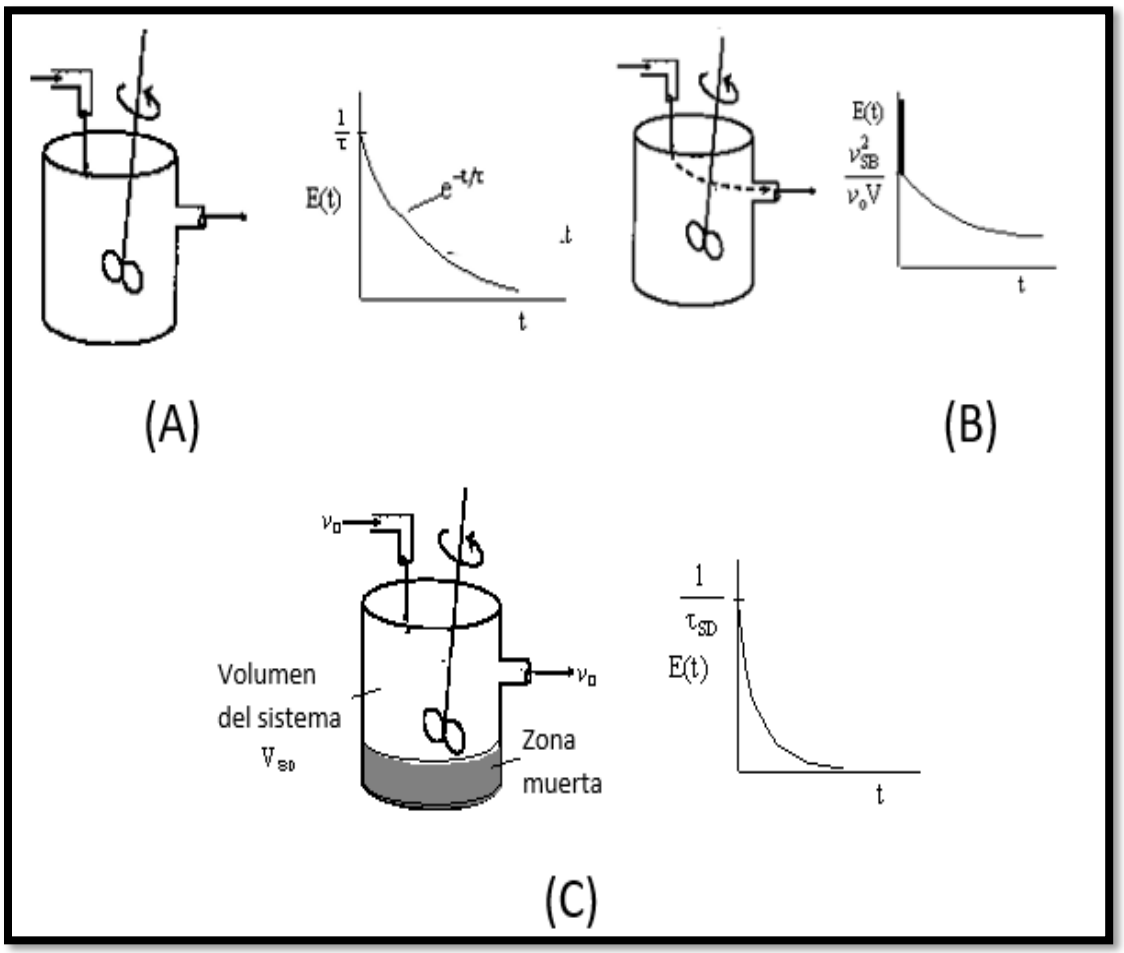


Figura 4 Diagnóstico de la operación para reactores de tanque perfectamente agitado (A)Operación perfecta (B) Cortocircuito (C)Volumen muerto
Modificado de: [20]

4.2. FOTOBIORREACTORES

Permitir el contacto del medio de cultivo con la luz resulta ser la característica fundamental en un fotobiorreactor (FBR), sin embargo, cabe señalar que: un FBR pueden ser igualmente utilizado para el cultivo de microorganismos que no requieran iluminación para sus ciclos metabólicos.

Los fotobiorreactores regularmente se encuentran construidos en polietileno, acrílico, vidrio borosilicato o plexiglás puesto que estos materiales permiten una buena penetración de luz [17] [22][5].

Los organismos fotoautótrofos presentan las mayores eficiencias fotosintéticas cuando tienen buenas provisiones de luz, esto deriva en una mejor productividad de biomasa y de producto [17]. No obstante, se sabe que el exceso de intensidad de luz puede incidir negativamente en la tasa de crecimiento, a veces de una manera muy drástica. Es posible denominar este fenómeno como una inhibición por sustrato (fotoinhibición), ya que la luz es el sustrato que proporciona energía en el proceso [4] [23].

Una alta relación superficie - volumen mejora la provisión de luz. Con esta premisa se han desarrollado varias configuraciones exitosas de fotobiorreactores, las cuales se pueden agrupar en tres formas básicas: placa plana , tipo fermentador y tubular.[17].

4.2.1. Reactores de placa plana (fpr):

Estos reactores fueron diseñados conceptualmente con el fin de aprovechar eficientemente la luz solar, se usaron incluso lámparas de haluro de mercurio con el fin de simular la luz solar y así poder realizar los estudios de eficiencia [24]. Son construidos con una alta relación área volumen[17]. Sin embargo, resultan costosos y el control del flujo de los cultivos es deficiente [1].

La unidad de transferencia de gas abierta muestra eficiencia para superar la acumulación de oxígeno, pero a su vez, por tratarse de un aditamento abierto hace imposible el efectivo control de los contaminantes externos.

4.2.2. Reactores Tipo Fermentador (FTR)

Presentan una relación área volumen baja lo que por supuesto deriva en bajas productividades de biomasa. Sin embargo, por tratarse de sistemas cerrados los cultivos axénicos se mantienen durante largos periodos de tiempo, situación deseable en la producción de ciertos metabolitos de alto valor. [17] .

Con el fin de solventar la baja incidencia de luz en los FTR se han incorporado sistemas de iluminación dentro de los reactores, lo que aumenta el costo energético de la producción en este tipo de reactor.

Una alternativa que permite aminorar los costos productivos corresponde a sistemas duales de iluminación natural y artificial. Mediante sensores de intensidad lumínica es posible estimar la radiación dentro del biorreactor y de este modo en las noches o en días nublados, se activa la iluminación artificial automáticamente [25].

En un FTR es habitual realizar la agitación mediante componentes físicos, tales como paletas giratorias; no obstante, cuando el medio se agita vigorosamente se dañan las células debido al esfuerzo cortante [3].

4.2.3. Reactores Tubulares (TR)

Los reactores de este estilo pueden ser subdivididos en tres tipos:

1. ***Reactor tubular horizontal:*** Compuesto por tubos transparentes horizontales con sistemas de transferencia de gas unidos a las conexiones.

2. ***Reactor tubular helicoidal:*** En este diseño un tubo plástico transparente se enrolla alrededor de un marco circular [17].

3. ***Columna de burbujeo con airlift simple:*** Compuestos por un tubo vertical transparentes, el suministro de gases se realiza mediante burbujeo en la parte inferior del tubo.

4.2.3.1. Reactor Tubular Horizontal (HTR)

Por tratarse de reactores horizontales el ángulo hacia la luz solar resulta muy adecuado y por tanto se hace un aprovechamiento eficiente [17].

Debido a su exposición a la luz solar y grandes volúmenes pueden presentar variaciones de temperatura en rangos de hasta 20°C por tanto se deben proporcionar sistemas de control de temperatura que resultan costosos [17], además de las dificultades en el control de la temperatura, los HTR presentan inconvenientes en el efectivo control en la concentración de oxígeno en la suspensión de los cultivos [14].

4.2.3.2. Reactor Tubular Helicoidal (HeTR)

La arquitectura de este tipo de reactor consiste en un conjunto de tubos enrrollados a una torre circular, presentan además una zona de intercambio de gases e intercambiadores de calor, el primer diseño patentado incluía una bomba centrífuga que conduce el caldo de cultivo a través del tubo enrollado y con dirección a la zona de intercambio de gases [26]. Modificaciones posteriores eliminaron la bomba centrífuga e incorporaron columnas airlift con el fin de reducir el esfuerzo cortante que se generaba sobre las células en cultivo del diseño original [17].

4.2.3.3. Reactor Tubular Vertical (VTR)

Respecto a los volúmenes se reportan equipos que operan con menos de 10 litros hasta 25 000 litros [2], [13], [27], [28]. A medida que aumenta el volumen, el costo de construcción y operación se hace inviable, junto con una disminución en la eficiencia [17].

Resulta innegable por otro lado que la eficiencia de los VTR es muy superior a otras configuraciones [7].

El principio sobre el que descansa este tipo de diseños corresponde a una configuración tubular vertical. Por tratarse de fotobiorreactores resulta fundamental que las paredes sean transparentes. Se han desarrollado configuraciones en las cuales si bien las paredes cumplen con esta característica no son las responsables del soporte, este último reposa sobre armazones y rejillas que le confieren forma y rigidez a las cámaras de cultivo [29].

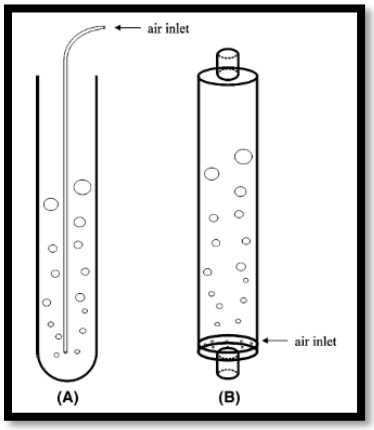


Figura 5 Representación esquemática de reactores (A) Airlift simple y (B) columna de burbujeo. Tomado de [17].

VTR fabricados con bolsas de polietileno con capacidad de 8, 20 y 40 litros mostraron alta eficiencia, confiabilidad y rentabilidad en la producción de las especies de microalgas *Ankistrodesmus falcatus* y *Scenedesmus incrassatulus.* [27]

4.2.3.4. Reactor Airlift (ALR)

El funcionamiento general de un reactor airlift (ALR) se basa en la existencia de compartimentos, separados parcialmente por barreras físicas. Un sistema de inyección incorpora gas en la parte inferior y se genera así una mezcla líquido – gas que asciende por el compartimento denominado *riser.* Una vez en la parte superior, el gas se separa del líquido, el cual desciende por gravedad por la zona denominada *downcomer*.

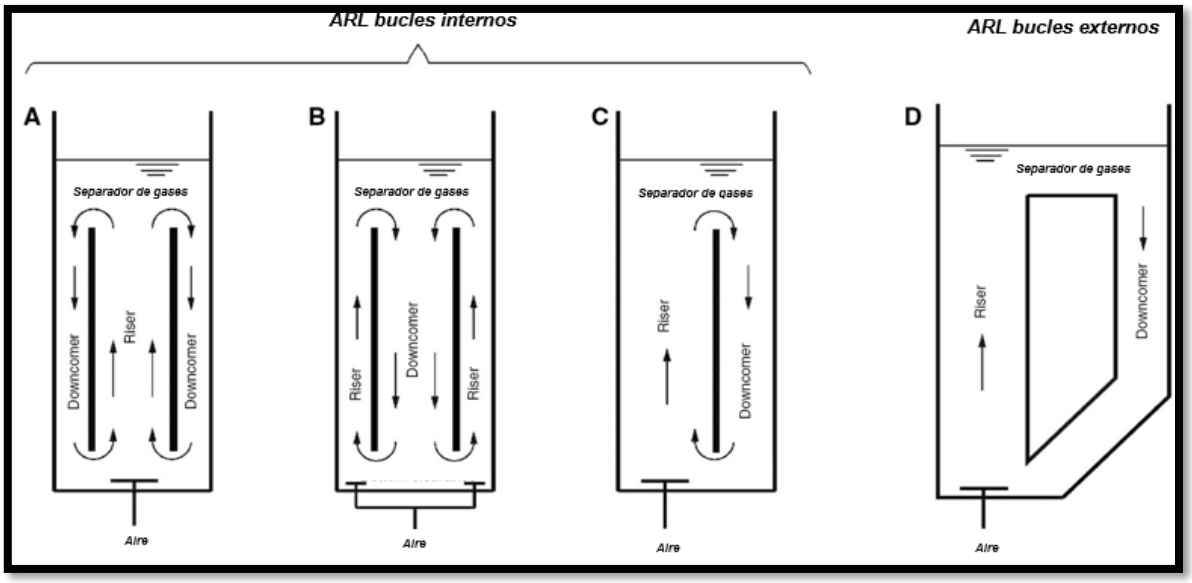


Figura 6 Modelos convencionales de flujo para ALR.
Tomado de [30]

Las figuras A, B y C corresponden a las estructuras de bucles internos, es decir que la circulación del líquido tiene lugar en conductos dentro de un mismo recipiente, por otro lado la figura D corresponde a una estructura de bucles externos, en esta última, el flujo se da entre compartimentos separados [31].

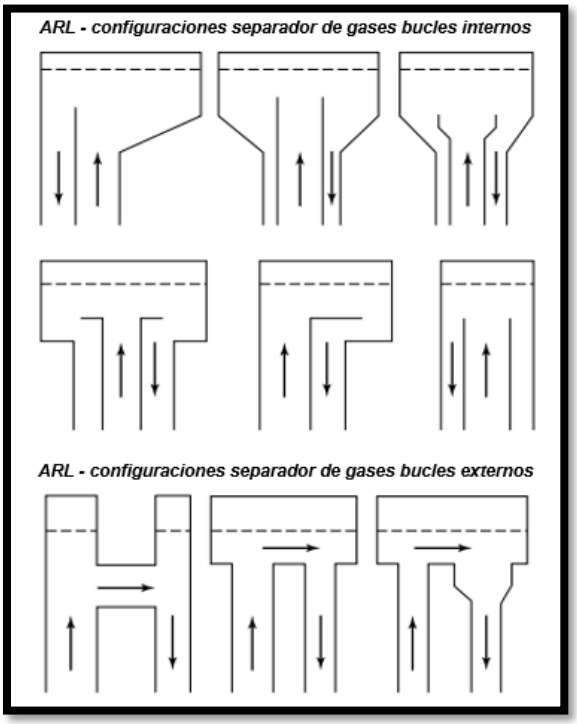


Figura 7 Diferentes tipos de separadores de gas para bucles internos y externos.

Modificado de [31]

Los reactores con el sistema airlift presentan un gran potencial para los procesos productivos puesto que el sistema de agitación es homogéneo y a la vez presenta bajos niveles de cizallamiento. [6]. En ensayos de laboratorio donde suelen usarse volúmenes mucho menores el burbujeo constante produce evaporación del agua del medio de cultivo, por tanto resulta muy recomendable instalar humidificadores que contrarresten este fenómeno[32].

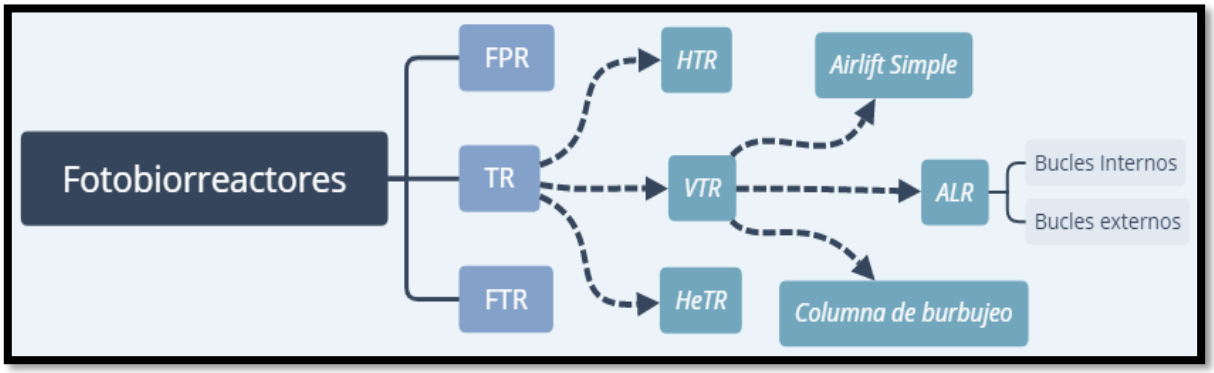


Figura 8 Resumen esquemático de los tipos de fotobiorreactores

4.3. DISEÑO

El diseño industrial y de producto es uno de los escenarios específicos del diseño. En este campo de acción se tiene como objetivo determinar todas las características de un producto uniendo experiencia, conocimientos técnicos de productos y procesos de fabricación[33].

4.3.1. Fases del Proceso de Diseño

Las etapas del proceso de diseño ilustradas en la Figura 9 pueden ser un recorrido para la creación de un producto y se pueden definir así [33]:

1. Definición estratégica: se define que se hará, pero no como se hará, la definición del producto a desarrollar desde el punto de vista de las necesidades que se van a cubrir, se tiene además en cuenta las ventajas respecto a los productos existentes en el mercado

2. Diseño de concepto: es una etapa sumamente creativa, se generan diferentes conceptos de producto mediante herramientas tales como renderizado, software, maquetas y se escoge la propuesta más apta acorde a las limitaciones y objetivos marcados.

3. Diseño de detalle: Se inicia el desarrollo del producto, se eligen materiales de construcción, tiene como objetivo determinar el perfil formal del producto o sistema. Suelen usarse herramientas de diseño 3D paramétricas o dibujo técnico.

4. Ingeniería de producto: En esta etapa se desarrollan actividades diferenciadas del diseño pero muy ligadas a él. Es una etapa en la que se ejecutan las soluciones técnicas de manera que progresivamente se convierten en soluciones fabricables. Comprende la construcción de prototipos de prueba.

5. Producción: Comprende la incorporación del nuevo producto en los procesos de fabricación relacionados con cadenas de producción y montaje para comercialización.

6. Lanzamiento: Relacionado con eventos de marketing y puesta en el mercado del producto, son actividades que permitan visibilizar por parte del consumidor final la existencia del nuevo producto.



Figura 9 Fases en el proceso de diseño
Tomado de: [33]

Otro aspecto, contemplado de manera diferente a la anterior categorización anterior pero que también aporta elementos importantes es el diseño para la excelencia DFE (*Design for excelence*) comprende un conjunto de técnicas de diseño cuyo fin es realizar una gestión de la calidad, el costo y el tiempo de desarrollo de un nuevo producto. Una de estas técnicas es el denominado diseño para las pruebas DFT (*Design for Testability*) cuyo objetivo es obtener en el menor tiempo posible un prototipo funcional en el cual se puedan ejecutar diferentes pruebas antes de su

fabricación en masa, una de las formas de ejecutar este proceso consiste en la fabricación en forma modular, de tal manera que los componentes puedan ser probados por separado[34].

4.3.2. Característica para el Diseño

Los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos, como lo son la biomasa microbiana o metabolitos en un tiempo mínimo y a menor costo de producción. [35]

4.3.3. Elementos de diseño biorreactores

Los factores generales a tener en cuenta en el diseño de biorreactores son descritos a continuación [35].

Características:

- El contenedor ha de funcionar asépticamente durante largos periodos, evitando así la contaminación en bioprocesos de larga duración.

- El contacto entre los componentes biótico y abiótico ha de ser eficiente, por tanto resulta muy adecuado tener sistemas de aireación y agitación capaces efectuar esta tarea, esto con el fin de cubrir las necesidades metabólicas de la totalidad de los microorganismos y a su vez mantener una distribución uniforme de las células.

- Direccionar el diseño hacia el uso eficiente de la energía.

- Permitir el acceso de dispositivos de medida para establecer las condiciones de cultivo (pH, temperatura, etc).

- Permitir el intercambio energético con el ambiente; esto con el fin de mantener estable la temperatura del medio.

- Suministrar gases necesarios en los metabolismos celulares a una velocidad tal que satisfaga el consumo.

4.4. REACTORES COMERCIALES

Históricamente han sido los biorreactores y los fermentadores de tanque agitado los equipos predilectos para todo tipo de cultivos sumergidos, incluidas suspensiones de células dependientes de mamíferos, plantas, levaduras e insectos y cultivos de microorganismos [36]

4.4.1. Bioflo (Eppendorf)

Este biorreactor es usado en el cultivo celular y en procesos fermentativos, combina el uso de componentes autoclavables (de reúso) con descartables (componentes de un solo uso), de manera operativa cuenta con impulsores de paletas, un contenedor para operación con volúmenes variables (400mL-1L de medio de cultivo), la posibilidad de instalar sondas analógicas para el seguimiento del pH, DO y Redox y puertos específicos (Mettler-Toledo®) para la lectura de CO_2, 3 bombas peristálticas (5-25 rpm) y válvulas para la mezcla de hasta tres tipos de gases, todos estos dispositivos manejados por un sistema computarizado [36].



Figura 10 Reactor comercial BioFlo® 120 para cultivo y escalado
Tomado de: http://bioflo120.eppendorf.com/media/images/DW_BioFlo120-409_filter.jpg

El biorreactor sin los sistemas de control tiene un costo en el mercado de 17.000 dólares, no obstante junto con el software de control y consumibles y los sistemas de control que se deseen incorporar el costo puede alcanzar los 47.000 dólares. En el apartado anexos con el numeral 11.1. se incorpora cotización a noviembre de 2018, que muestra el precio de un equipo con estas características.

4.4.2. Otros Reactores

La fábrica de instrumentos Xingyang Kori construye reactores no específicos (para aplicaciones químicas, bioquímicas y farmacéuticas) con prestaciones similares al Bioflo ®, como son: agitación por aspas, control de temperatura por flujo de líquido entre doble pared, capacidad de operación entre 400mL y 2000mL, fabricado en vidrio de borosilicato, con un costo de 1000 euros, sin contemplar los costos de envío (Datos tomados de compras online en la página del fabricante: http://www.korichina.com/). En estos reactores, por sus características sería posible además acoplar sondas para las medidas de pH, CO2, DO y de esta manera hacer estudios sobre cultivos de microorganismos a escala de laboratorio.



Figura 11 Biorreactor comercial modelo SF-2L del fabricante Kori Instruments

Tomado de http://www.korichina.com/?p=332

4.5. CULTIVO DE MICROORGANISMOS

4.5.1. Parámetros de Crecimiento

4.5.1.1. Alimentación

La densidad de cultivo puede ser usada como parámetro para determinar las necesidades metabólicas, a partir de esto se pueden ajustar sistemas automatizados que provean al BR del medio de cultivo y de la aireación necesaria para el óptimo desarrollo de los microorganismos [28].

En general los microorganismos como las algas requieren materiales comúnmente disponibles para su crecimiento como sales minerales, CO_2, agua y luz solar [2].

4.5.1.2. Agitación y Mezcla

Una mezcla apropiada mejora la transferencia de oxígeno, el suministro de nutrientes, la homogeneidad del pH y la temperatura lo que proporciona un entorno óptimo para el cultivo en todo el recipiente [36], [37].

La mezcla tiene una fuerte influencia en la tasa de crecimiento independientemente de los efectos de transferencia de masa [4].

La turbulencia dentro de un biorreactor puede ser generada por diferentes dispositivos, tales como tornillos de Arquímedes, bombas centrífugas, airlift y agitación por paletas giratorias [2], [4], [37].

Los esfuerzos cortantes relacionados con sistemas de agitación por paletas o por bombas centrífugas pueden ser reducidos con la implementación de sistemas airlift

lo que tendría una consecuencia directa en la minimización del daño celular [17].

4.5.1.3. Temperatura

En un RT a escala de laboratorio el control de temperatura puede ser realizado mediante un fluido de refrigeración que recorra una doble pared, lo que comúnmente es denominado chaqueta de regulación térmica [7].

Sumergir los reactores en piscinas resulta ser otra forma de regulación de la temperatura, en este caso se pueden tener rangos cortos de variación, sin embargo el costo energético para mantener el agua dentro de las piscinas a una temperatura dada es significativo, a lo que debe sumarse una disminución en la captación de luz dentro del reactor que se encuentra sumergido [17].

4.5.1.4. pH

Cada especie de microorganismo tiene un pH óptimo para su crecimiento, los microorganismos crecen a menudo en algunos intervalos de pH con límites de tolerancia. Variaciones fuera de los rangos de crecimiento pueden dañar la membrana plasmática o inhibir la actividad de las enzimas y proteínas transportadoras. El cambio de pH en los medios de cultivo puede además alterar la estabilidad de los nutrientes disminuyendo así la disponibilidad [38].

En los cultivos el pH puede verse modificado por varios factores como la composición del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica o heterotrófica y la adición de CO_2 en el sistema de aireación.

4.5.1.5. Transferencia de gases

En un biorreactor es importante la transferencia de gases puesto remueve del medio algunos productos de desecho del metabolismo celular y a la vez puede ser fuente de nutrientes. La geometría y las dimensiones de los biorreactores son fundamentales en este asunto [17].

4.5.1.6. Iluminación

Los fotobiorreactores pueden ser iluminados por fuentes naturales [39], artificiales [7] o de manera combinada. La mejor elección se corresponde con la arquitectura del biorreactor, así por ejemplo, en un HTR por su ángulo respecto al sol tendrían una mejor exposición a la luz solar mientras que un VTR tendrían serias limitaciones de exposición [40].

Respecto a los niveles de iluminación, resulta evidente que: cultivos de organismos fotótrofos expuestos a bajos niveles de luz, presentarían desarrollos deficientes, no obstante, ha de tenerse en cuenta, como se indicó con anterioridad que: la iluminación excesiva puede llegar a producir inhibición del crecimiento; sin embargo, dicha situación (la fotoinhibición) es altamente dependiente de la concentración de

biomasa. El fenómeno de absorción y dispersión causado por las células resulta determinante. Un cultivo denso puede prosperar donde un cultivo magro se deterioraría seriamente [4].

4.5.2. Curvas de Crecimiento

El crecimiento de los sistemas biológicos se relaciona con el incremento de manera ordenada de los diferentes componentes de ese sistema. En organismos pluricelulares el crecimiento se relaciona con un aumento de tamaño mientras que en organismos unicelulares lo que sucede es un aumento poblacional. Existiendo no obstante casos específicos que no pertenecen a ninguna de las dos situaciones [41].

El crecimiento de los organismos unicelulares además puede ser estudiado desde dos perspectivas: a escala individual y a escala poblacional. La primera de las aproximaciones se relaciona con los procesos específicos individuales (fases de división, características etc) mientras que en el segundo caso (poblacional) suelen estudiarse aspectos relacionados con el desarrollo en conjunto en un medio de cultivo[42].

El crecimiento bacteriano en medio nutritivo líquido es exponencial y puede ser representado en una curva que relaciona la concentración contra el tiempo, aunque suele graficarse el logaritmo de esta concentración y allí se distinguen con claridad las fases del desarrollo poblacional bacteriano [41], [43], [44]:

1. ***Fase de latencia:*** Corresponde al lapso en el cual las bacterias del inóculo se adaptan al medio nutritivo en que han sido sembradas. Es un tiempo de ajustes metabólicos y la duración depende de algunos factores como: tamaño del inóculo, estado del inóculo, condiciones de cultivo previas.

2. ***Fase exponencial:*** Las bacterias se multiplican exponencialmente, la actividad metabólica es máxima y además en esta fase la población se caracteriza por una alta sensibilidad a los agentes físico y químicos externos.

3. **Fase de transición**: También denominada fase de crecimiento no balanceado, inicia cuando disminuyen los nutrientes, cambia la pendiente de la curva de crecimiento exponencial y se reduce la velocidad en el metabolismo de macromoléculas.

4. **Fase estacionaria*:*** el crecimiento entra en equilibrio con las muertes celulares por tanto el crecimiento neto es nulo (no hay aumento ni disminución de la población). La actividad metabólica disminuye, aumenta la resistencia a agentes físicos y químicos y pueden producirse metabolitos secundarios, como antibióticos toxinas u otros productos.

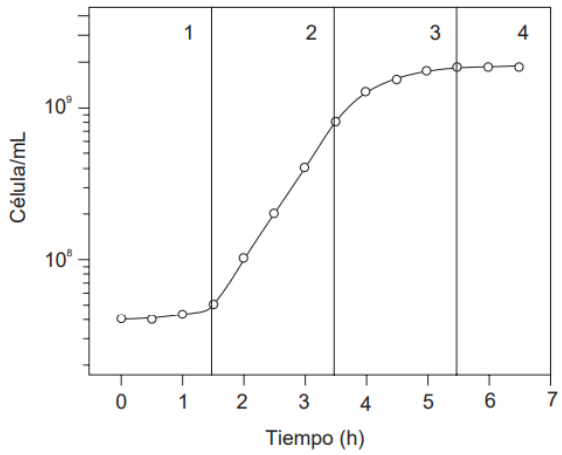


Figura 12 Esquematización de la curva de crecimiento bacteriano para el modelo biológico E.coli. Tomado de:[44]

4.5.2.1. Medidas del crecimiento de la masa celular

Salvo las medidas del consumo de nutrientes o producción de metabolitos en el tiempo (que pueden seguirse mediante sondas inmersas en el cultivo) para realizar cada una de las estimaciones indicadas en la ilustración 6 resulta necesario tomar muestras del cultivo en desarrollo en diferentes instantes[42].

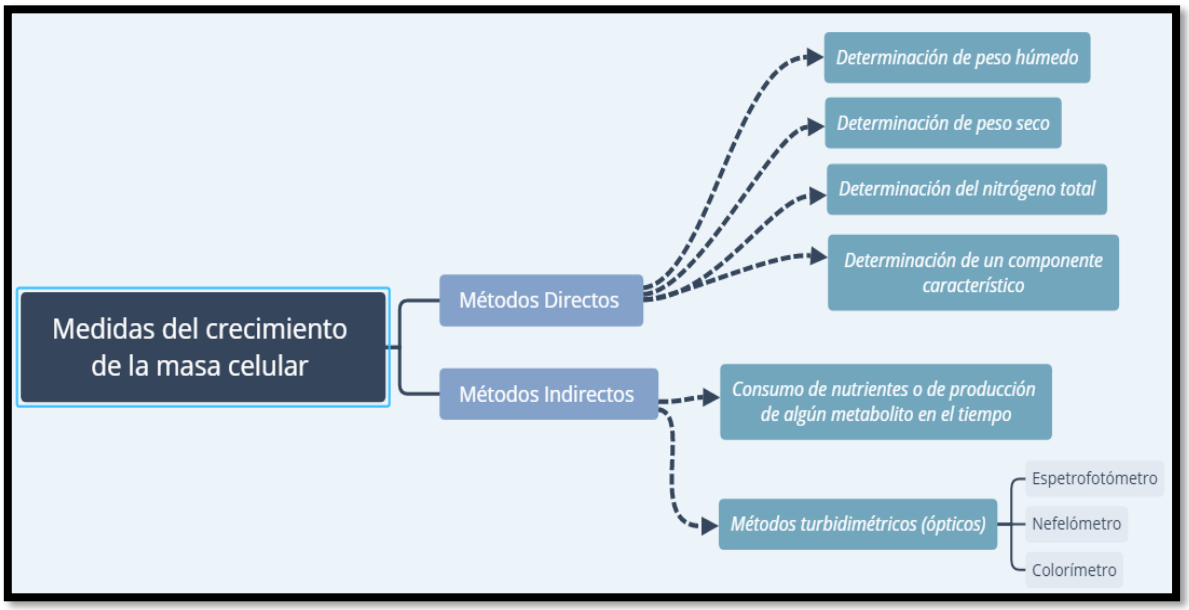


Figura 13 Métodos para determinar el crecimiento. Adaptado de: [42].

Las determinaciones de masa húmeda son bastante inexactas mientras que las determinaciones de masa seca presentan mejores grados de exactitud a expensas del tiempo requerido para sus determinaciones, junto con dificultades de medida cuando los cultivos son poco numerosos por las características intrínsecas del

método (medidas de masa en el orden de los miligramos).

En las determinaciones de nitrógeno total además de los múltiples pasos del proceso debe considerarse que cada estimación ha de realizarse inmediatamente de tal manera que se garanticen las condiciones del cultivo para cada instante de tiempo en el que se ha realizado el muestreo. Del mismo modo las determinaciones de componentes característicos requieren análisis inmediatos, métodos de preservación o inhibición del crecimiento.

Los métodos turbidímetros son ampliamente usados en la práctica de laboratorio, puesto que permiten medidas rápidas con un notable grado de exactitud. El proceso consiste en la toma de muestras de manera periódica para su posterior lectura en el instrumento (turbidímetro, espectrofotómetro o colorímetro), un proceso que en lo referente a los aspectos operativos, no ha cambiado en los últimos 70 años [45], [46].

En general ha de considerarse que para los métodos de seguimiento cada toma de muestra modifica el volumen total del cultivo y que el proceso de muestreo conlleva riesgos de contaminación.

4.6. ORGANISMOS MODELO PARA PRUEBAS DE CULTIVO

4.6.1. E. coli MC4100

Las bacterias de la especie *E. coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriácea.* Son bacilos cortos, gram negativos, quimioheterótrofos, anaerobios facultativos [38], es uno de los modelos biológicos más estudiados a nivel genético, bioquímico y funcional[44]. Algunas de las ventajas que tienen como hospedero son: rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), manipulación genética fácil, los requerimientos para su cultivo en lo que se refiere a medios de cultivo y equipos no son costosos, alta eficiencia en la incorporación de material genético externo, variedad de vectores de expresión y variantes mutantes[45].

Algunas *E. coli* pueden crecer en temperaturas que van desde los 7°C hasta 46°C, la temperatura óptima de crecimiento está en 35-40°C[38]. E.coliMC4100 tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, el medio de cultivo indicado por el Instituto Leibniz en su Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) es el medio LB (Luria-Bertani) [47].

E. coli frente al ayuno nutrimental presenta cambios morfológicos y fisiológicos durante su ingreso a la fase estacionaria. Algunas bacterias suspenden por completo el metabolismo y proceden a esporular, pero este no es el caso de *E.coli*, durante la fase estacionaria conserva un metabolismo basal incluso después de semanas de ayuno. Esta condición se alcanza a partir de la expresión oportuna de genes que se organizan en redes de regulación.

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIALES

5.1.1. SOFTWARE

El software para realizar el diseño conceptual fue Blender en su versión 2.78, se trata de un software libre. Además de los diseños conceptuales preliminares de los sensores ópticos, fue usado con el fin de realizar los diseños finales de los armazones de los sensores ópticos destinados a impresión 3D.

El software para ordenar y graficar los datos obtenidos fue Microsoft Excel en su versión 2016. Este software se usó además con el fin de realizar el análisis estadístico elemental, concretamente la estimación de las líneas por método de mínimos cuadrados con el fin de estimar ecuaciones de las líneas de tendencia. El software opera mediante aproximaciones por mínimos cuadrados.

5.1.2. MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN PARA PROTOTIPADO:

Resina poliester preacelerada líquida
Caucho de silicona líquido
Tubo de vidrio 16mm (diámetro externo)
Tubo de vidrio 7.9mm (diámetro externo)
Filamento PLA comercial de 1.7mm
Tubo de acero inoxidable 6.4mm (diámetro externo).
Manguera de silicona 9.8mm

Tabla 2 Uso de los materiales en cada uno de los componentes.

	Biorreactores	Armazón de los sensores ópticos	Celdas de lectura
Manguera siliconada	-	-	+
Resina poliester	+	-	+
Caucho de silicona	+	-	+
Tubos de vidrio	+	-	+
PLA	-	+	-
Acero inoxidable	-	-	+

5.1.3. SUMINISTRO, CONTROL Y SEGUIMIENTO ELCETRÓNICO

5.1.3.1. Sensores de medida óptica

Los componentes electrónicos son: LED de luz roja y LDR (Figura 14), estos componentes operaron mediante un circuito electrónico que suministrarán la

energía necesaria para encender el diodo emisor de luz *LED (Light-Emitting Diode)* mientras que un microchip media la resistencia en una fotorresistencia LDR (*light-dependent resistor)* en el tiempo, asignándole un valor entre 0 y 999, (0 corresponde a la ausencia total de iluminación y 999 a la saturación de la LDR), los circuitos se muestran en la figura Figura 15.

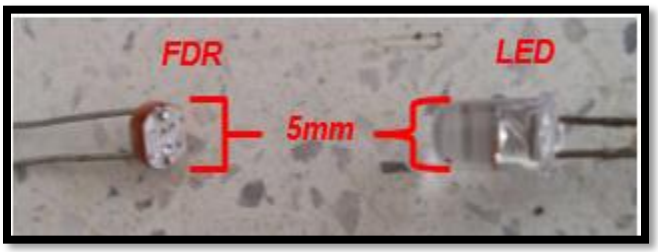


Figura 14 Componentes electrónicos básicos: LDR y LED

5.1.3.2. Almacenamiento de información

Los valores medidos sobre la LDR (mencionados en el apartado 5.1.3.1) eran registrados mediante un circuito recolector de datos (Figura 15), cuya función era almacenar las lecturas realizadas una memoria micro SD, guardando la información en un archivo con extensión .txt, para posteriormente ser vistos en un computador, el tráfico de datos se ilustra mediante un esquema en la Figura 16. El circuito se configuró para realizar el almacenamiento cada minuto.

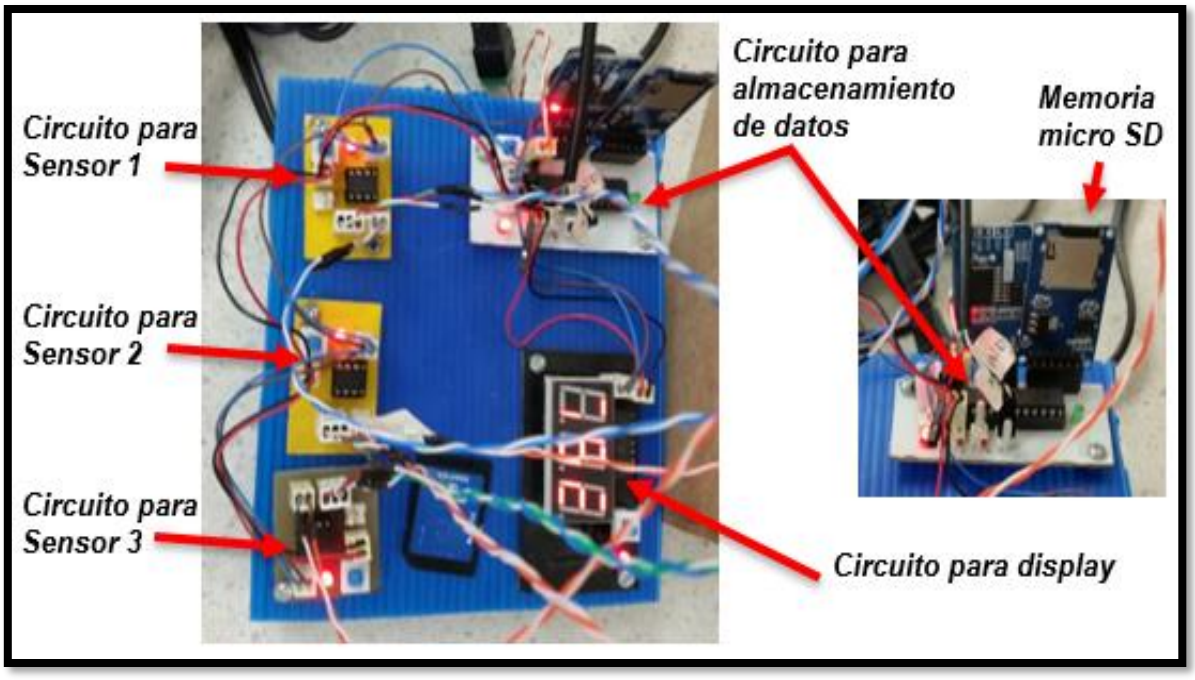


Figura 15 Circuitos interconectados (sensores y almacenamiento de datos)

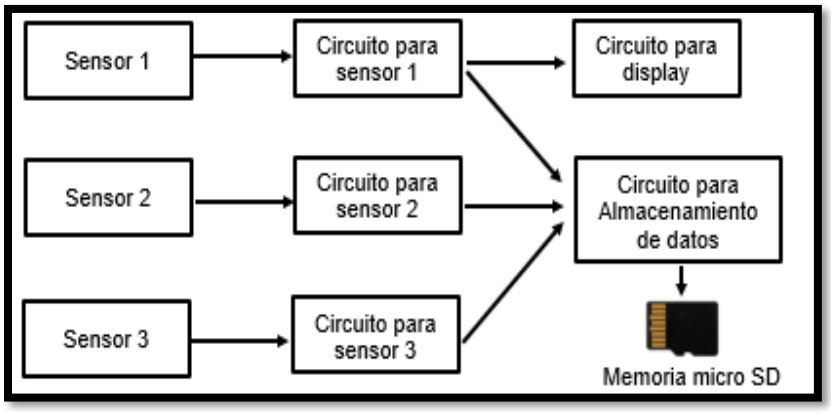


Figura 16 Esquema del tráfico de datos

5.1.3.3. Control de temperatura

Para la cámara de incubación se utilizaron dos circuitos idénticos controladores de temperatura provistos de una sonda cada uno, uno de ellos se encargaba del enfriamiento mientras que el otro del calentamiento. La temperatura deseada podía ser modificada con pulsadores. La sonda de temperatura era sumergible, haciendo posible identificar la temperatura en el cultivo.

Los rangos de oscilación de la temperatura antes de activarse el circuito eran 0,1 grados por debajo de la temperatura esperada y 0,2 grados por encima. Así, por ejemplo, en modo calentamiento para una temperatura deseada de cultivo de 37°C, el valor mínimo era de 36,9°C, momento en el cual el circuito encendía termorresistencias distribuidas en la cámara de calentamiento hasta que la temperatura en los cultivos alcanzaba 37,2°C, momento en el que el circuito apagaba automáticamente las termorresistencias. El modo enfriamiento operaba por extracción de aire mediante un ventilador de forma similar.

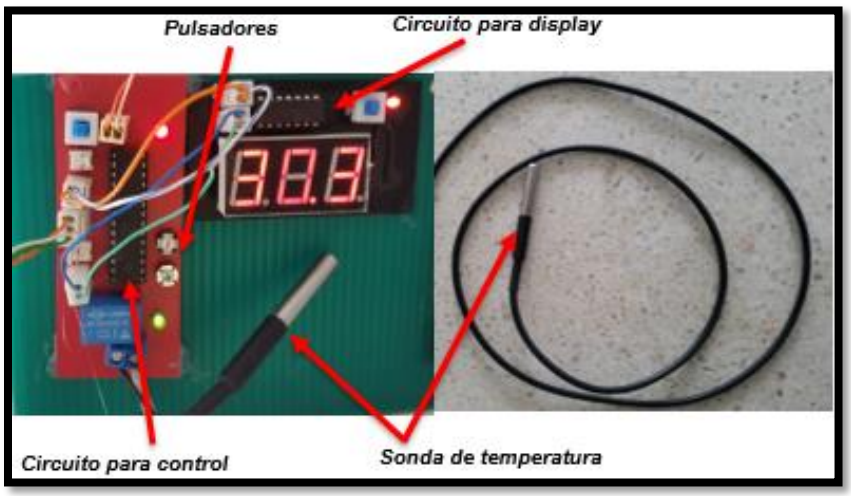


Figura 17 Circuito controlador de temperatura con la respectiva sonda

5.1.3.4. Control de flujo

El flujo era suministrado por bombas peristálticas diseñadas y construidas en el grupo GRESIA de la Universidad Antonio Nariño (UAN), las mismas corresponden a un motor paso a paso provisto de un armazón impreso en PLA, el armazón además tiene 4 cilindros metálicos que estrangulan una manguerilla de silicona Figura 18. En cuanto al componente electrónico: el motor paso a paso era controlado por un circuito provisto de pulsadores con los cuales era posible modificar la velocidad de giro del motor y así el flujo.

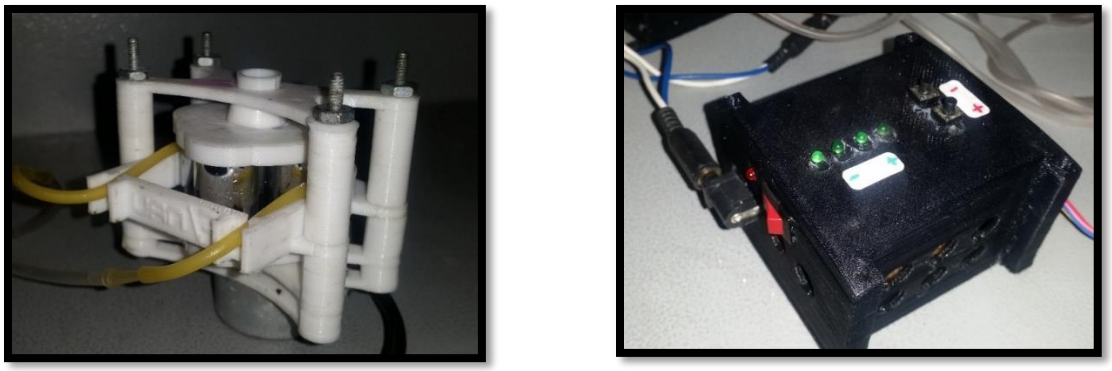


Figura 18 Bomba peristáltica y circuito controlador.

Todos los circuitos electrónicos a que se hace mención, fueron suministrados por el Ingeniero electrónico Andrés Valderrama y corresponden a diseños propios no comerciales.

5.1.4. Cepa utilizada y medio de cultivo

La cepa utilizada fue *E.coli MC4100*, y para su cultivo medio líquido LB (compuesto por 10g extracto de levadura, 5g cloruro de sodio, 5g peptona de caseína).

Tabla 3 Proveedor y reactivos.

Reactivo	***Proveedor***
Extracto de levadura	DIBICO
Cloruro de sodio	J.T.BAKER
Caseína Pancreática	SHARLAU

5.2. PROTOTIPADO

Para la obtención de prototipo se desarrollaron 4 de las fases contempladas en *"Diseño industrial: guía metodológica"* [33]: definición de los requerimientos de la innovación, diseño conceptual, diseño de detalle e ingeniería de producto.



Figura 19 Fases de diseño desarrolladas.
Modificado de: [33]

5.3. DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL SENSOR DE MEDIDA ÓPTICA DESARROLLADO

Con el fin de estimar el comportamiento de los sensores de medida desarrollados se prepararon soluciones coloreadas del colorante verde limón y se compararon las medidas de los sensores contra las medidas en un espectrofotómetro marca EMC LAB modelo EMC-11-UV.

5.3.1. Prueba de estabilidad

Los sensores se conectaron al circuito electrónico recolector de datos y se dejaron operando durante 12 horas. Esta prueba se realizó para estimar la estabilidad de las medidas. Los resultados obtenidos se muestran en forma gráfica en la Figura 33. Los datos en forma de tabla han sido anexados con el numeral 11.5.

5.3.2. Barrido en el espectro visible del colorante verde limón.

Se realizó un barrido en el espectro desde 300nm hasta 760nm de una solución de concentración 0,0737 g/L de colorante verde limón, los valores de la medición han sido anexados con el numeral 11.2.

5.3.3. Curvas de calibración para los sensores usando el colorante verde limón.

Se preparó una solución concentrada de colorante así:

- Se midió una masa de 1,0297 g en una balanza analítica marca Boeco, modelo BBL 32.
- Se completó a volumen de 1000mL en un balón aforado clase A.

- Se prepararon 6 diluciones seriadas con factor de dilución 0,4.
- De todas las diluciones se realizaron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 420nm, 630nm y 680nm.
- Las diluciones fueron medidas con el sensor de medida óptica desarrollado.
- Todos los datos obtenidos se ordenaron en forma de tabla y se muestran en la página 57 (Tabla 5).
- Para realizar la comparación entre las medidas de los sensores de medida óptica y los valores obtenidos en el espectrofotómetro, se graficaron los resultados mediante el software Microsoft Excel. Los resultados se muestran en la Figura 34, Figura 35 y Figura 36.
- La curva de calibración fue construida con los datos de la Tabla 5 y se muestran en la Figura 37.

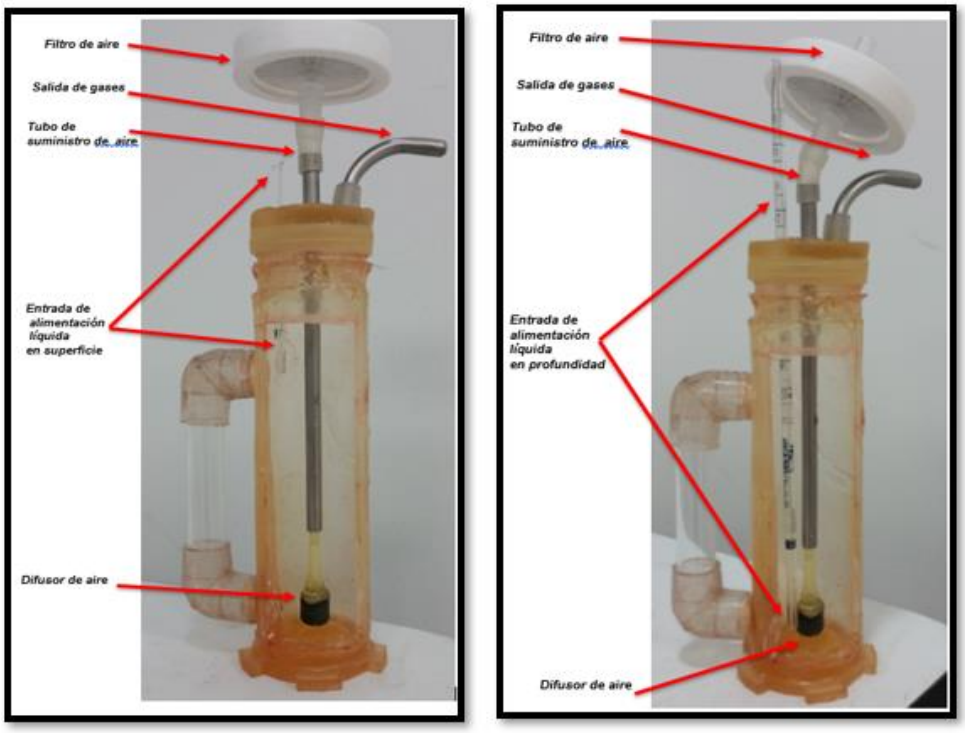
5.4. ENSAYO DE TRAZADORES

5.4.1. Modo de operación

El ensayo se desarrolló así:

- El flujo de caldo nutritivo para una operación en continuo fue simulado mediante bombas peristálticas, una por cada milibiorreactor, en total tres bombas que tomaban líquido de un contenedor amarillo (Figura 20) y lo dirigían a los reactores mediante manguerillas. El flujo de las bombas fue medido y registrado.

- Se conectaron los sistemas de aireación compuestos por dos bombas de aireación que dirigen un flujo a los humidificadores y estos finalmente estaban conectados a un tubo que atravesaba los milibiorreactores hasta el fondo. Al final había un difusor de burbujas, en



(A) (B)

- Figura 22 y Figura 30 se observa con claridad el tubo de aireación con un difusor al final.

- El líquido de alimentación tenía una salida inferior que se conectaba a los sensores de medida óptica para realizar el seguimiento del trazador. La totalidad del montaje se muestra en la Figura 20 y se esquematiza en la Figura 21.

- Cada ensayo se corrió por triplicado durante 24 horas, los datos fueron recolectados de manera automática mediante el circuito de recolección de datos.

- Pasadas las 24 horas se apagaba el sistema. A cada reactor se le midió el volumen de operación, se registró este valor en una tabla junto con el flujo de las bombas peristálticas.

- Una vez terminado el ensayo los datos se analizaron mediante el software Microsoft Excel con el fin de estimar los tiempos de residencia experimentales mediante integrales numéricas (conforme a lo tratado en los apartados 4.1.2.2.1 y 4.1.2.2.2. de este documento). Los resultados obtenidos se contrastaron con los valores teóricos.

El flujo en las bombas peristálticas fue estimado por medidas volumétricas contra el tiempo. El circuito controlador de las bombas permitía modificar la velocidad de rotación y por tanto del flujo. El flujo apropiado se estimó en 12mL por hora.

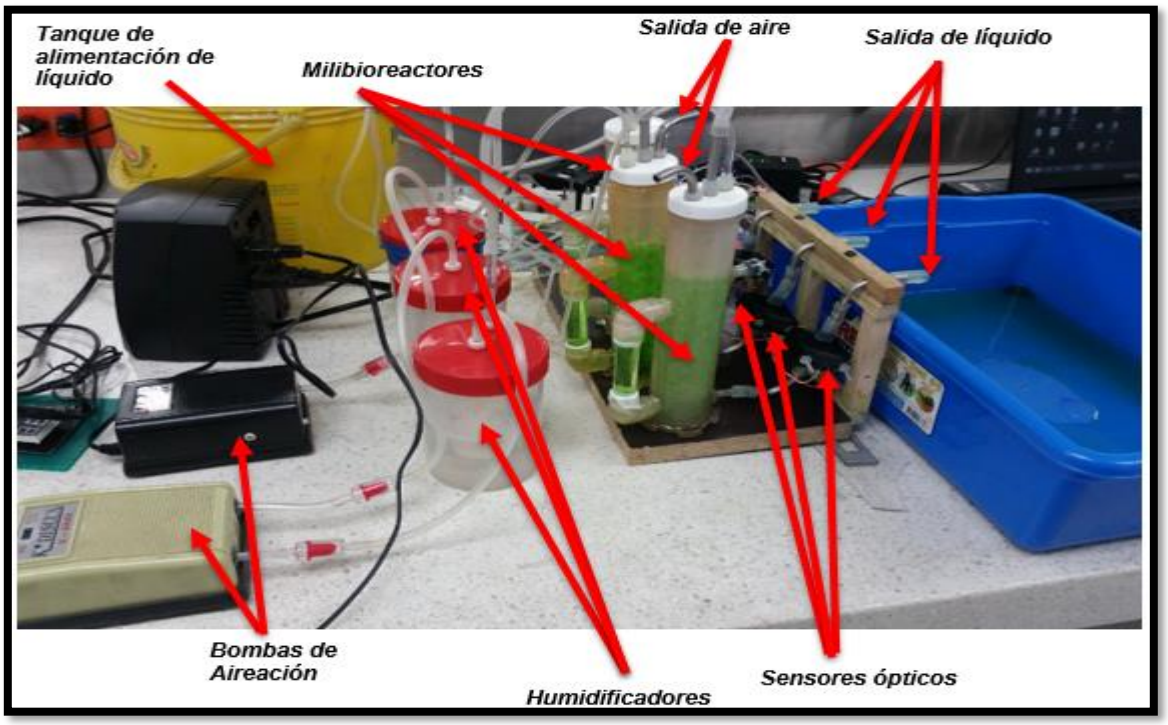


Figura 20 Ensayo de trazadores con tres milibiorreactores

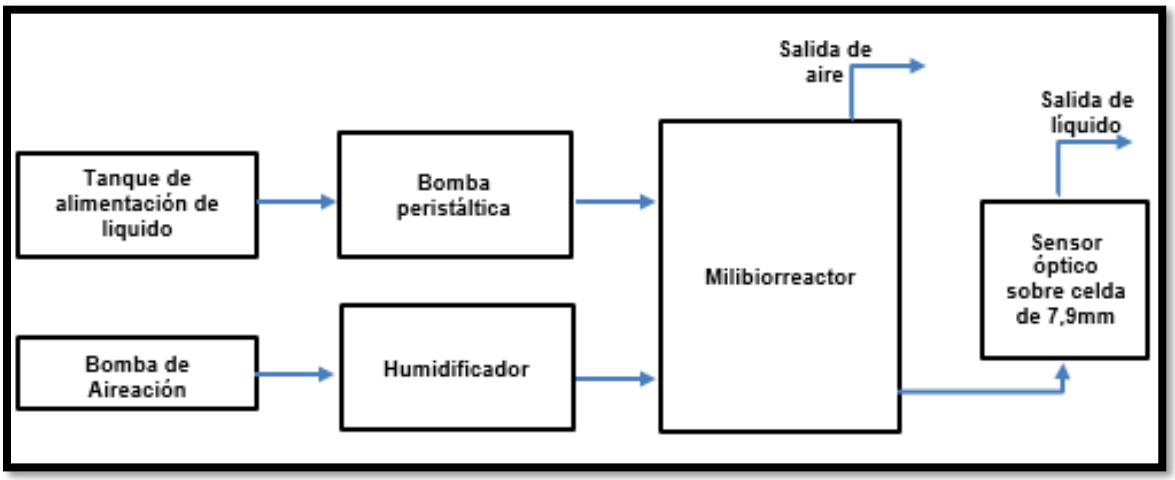


Figura 21 Ensayo de trazadores (esquema de flujos para un milibiorreactor)

5.4.2. Protocolo de introducción y seguimiento del trazador

- Se preparó solución concentrada de colorante comercial verde limón.
- Se inició el modo de operación descrito en el numeral 5.4.1.
- Se tomó con una jeringa 5mL y se inyectó en cada reactor 1mL de solución concentrada.
- El circuito recolector de datos tomó un dato cada minuto durante la totalidad

de la duración de los ensayos.

5.4.3. Puntos de alimentación probados

Se realizaron en total dos ensayos, cada uno por triplicado. Para el primer ensayo se probó el comportamiento por inyección del trazador en la superficie del líquido y para el segundo la inyección del trazador en la zona más profunda del *riser.* Ambos ensayos se realizaron conforme al modo de operación y protocolo de introducción y seguimiento del trazador descritos en los numerales 5.4.1 y 5.4.2. Adjunto en forma digital se encuentra el anexo número 15 que muestra el comportamiento del reactor tras una inyección superficial.

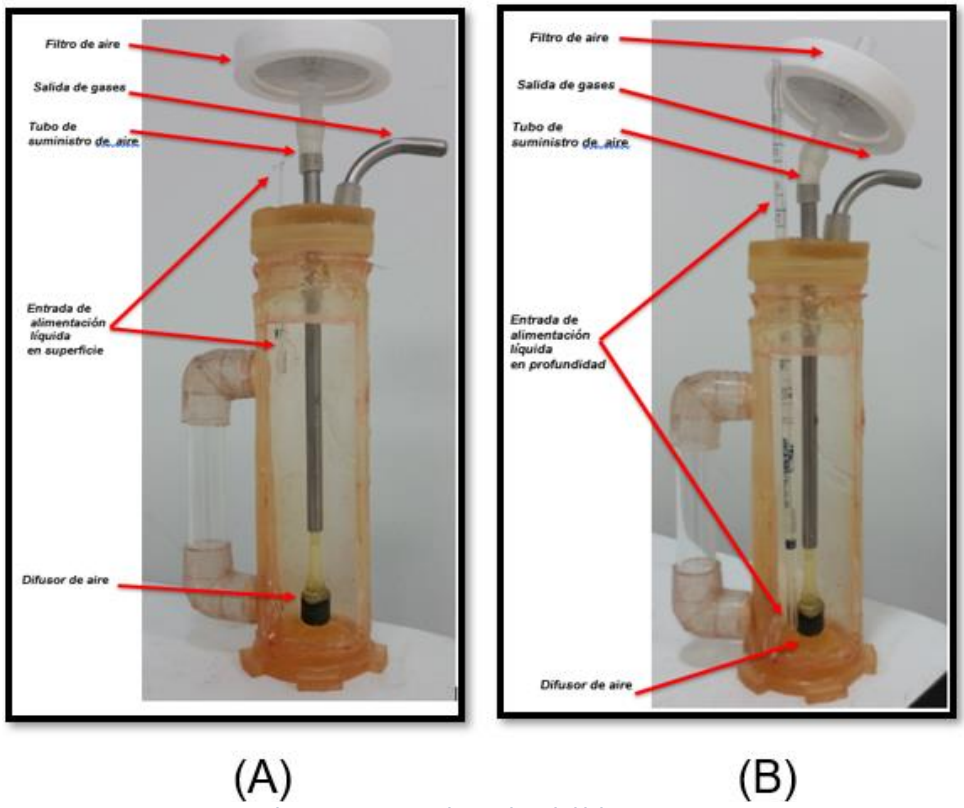


Figura 22 Cortes laterales del biorreactor.
(A)Modelo con corte lateral que permite observar punto de alimentación para la inyección del trazador en superficie. (B) Modelo con corte lateral que permite observar punto de alimentación para la inyección del trazador en profundidad.

Las gráficas del comportamiento de los reactores se muestran en el apartado Resultados bajo el numeral 7.4 mientras que las tablas de la totalidad de los datos recolectados se encuentran en el apartado anexos con los numerales 11.9 y 11.10.

5.5. CULTIVOS

5.5.1. Cultivo en milibiorreactor

Se utilizaron tres milibiorreactores fabricados conforme al prototipo funcional, el cual se compone de una unidad de medición óptica, un volumen de operación de

aproximadamente 150mL, un humidificador que saturaba el aire inyectado con agua para evitar la evaporación.

El control de temperatura se realizó mediante un sistema de incubación, una termorresistencia sumergida en el medio de cultivo permitía identificar por medio de un circuito electrónico la temperatura óptima. El control de temperatura operaba de manera automática.

5.5.2. Protocolos de cultivos

5.5.2.1. E.coli MC4100

La preparación del cultivo comenzó con la esterilización de los milibioreactores cargados con el medio de cultivo por autoclavado a 127°C y 27 PSI durante 45 min. Cuando el material ya se encontraba estéril, se llevó a cabina de flujo laminar donde se realizaron las siembras a partir de medio sólido de una colonia de *E.coliMC4100* en cada uno de los reactores. Se introdujo la sonda de control de temperatura en uno de los milibiorreactores. Los tres reactores fueron dispuestos en la cámara de incubación. El circuito controlador de temperatura se fijó a 37°C. Finalmente, sobre las celdas incorporadas en el milibiorreactor fueron colocados los dispositivos de medida óptica.

5.5.2.2. Chlorella sp.

Inició con la esterilización de los milibioreactores cargados con el medio de cultivo por autoclavado a 127°C y 27 PSI durante 45 min. Cuando el material ya se encontraba estéril, se llevó a cabina de flujo laminar donde se realizaron las siembras a partir de medio líquido de un cultivo líquido de *Chlorella sp. con absorbancia de 2.21.* Cada uno de los reactores fue inoculado con 2 mL. Se introdujo la sonda de control de temperatura en uno de los milibiorreactores. Los tres reactores fueron dispuestos en la cámara de incubación. El circuito controlador de temperatura para enfriamiento se fijó a 25°C. Finalmente, sobre las celdas incorporadas en el milibiorreactor fueron colocados los dispositivos de medida óptica.

5.5.3. Final de los ensayos

El cultivo de bacterias finalizó 24 horas después de la introducción de los milibioreactores inoculados en la cámara de incubación.

El cultivo de algas se analizó 134 horas después de la introducción de los milibioreactores inoculados en la cámara de incubación.

5.6. MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

Las medidas de crecimiento celular se realizaron de forma automática, mediante el sistema de lectura óptico desarrollado, se realizó una media cada minuto durante todo el tiempo de operación, para el ensayo de crecimiento de E.coli se obtuvo un total de 1440 datos, mientras que para Chlorella un total de 24105 datos para el ensayo por triplicado, la información se procesó con el software Microsoft Excel y se presenta en el apartado Resultados.

5.6.1. Curva de calibración E.coli MC4100

Las curvas de calibración fueron construidas para cada uno de los milibiorreactores. Pasadas las 24 horas de la inoculación, de cada uno de los cultivos se realizaron 5 diluciones seriadas con factor de dilución de 0,5. Las diluciones obtenidas fueron medidas en espectrofotómetro marca EMC LAB modelo EMC-11-UV. Cada una de las diluciones además fue valorada en los sensores de medida óptica desarrollados, finalmente con los datos obtenidos se realizaron las gráficas de lectura en el software Excel, se graficó Absorbancia contra las medidas de los sensores. Por método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta, la gráfica se encuentra en el apartado resultados.

5.6.2. Curva de calibración Chlorella sp.

La masa seca de algas contenidas en un litro de cultivo se determinó mediante el siguiente procedimiento:

- Se incubó algas por un periodo de 15 días en un Erlenmeyer, el mismo fue dispuesto en una incubadora marca memmert modelo VO200, con los sistemas de aireación y suministro de iluminación por cinta LED.
- Se secaron en horno 5 papeles filtro en fibra de vidrio de 47 mm marca Munktell durante 3hrs a temperatura de 110°C.
- Se realizaron varias medidas de la masa de los papeles filtro en balanza analítica marca Boeco modelo BBL32 hasta masa constante.
- Se extrajo un volumen de 500mL del cultivo de algas y se le midió la Absorbancia.
- Se prepararon 5 diluciones seriadas con factor de dilución 0,5.
- Un volumen determinado de cada una de las diluciones fue filtrado en cada uno de los papeles filtro.
- Se secaron en horno durante 3hrs a temperatura de 110°C.
- Se realizaron varias medidas de la masa de los papeles filtro en balanza analítica marca Boeco modelo BBL32 hasta masa constante.
- Se estimó por diferencia la masa seca de cada una de las muestras y con el volumen se determinó la masa seca por mililitro.

Una vez realizado el procedimiento con los datos obtenidos se realizaron las siguientes gráficas:

- Gráfica de masa seca por mililitro (g/mL) contra Absrobancia con el fin de verificar la relación de las medidas.

- Gráfica de medidas de los sensores ópticos desarrollados contra Absorbancia con el fin de observar el comportamiento de los sensores respecto al instrumento de laboratorio (espectrofotómetro).

- Gráfica de masa seca por mililitro (g/mL) contra las medidas de los sensores ópticos desarrollados, esto con el fin de obtener la ecuación de la recta y así convertir las medidas de los sensores de medida óptica a masa por mililitro.

6. DESARROLLO DE LA PROPUESTA

6.1. DEFINICIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DEL PROTOTIPO

Con el fin de delimitar los alcances de la innovación se establecieron las características deseables en el instrumento:

6.1.1. Características generales para el biorreactor

1. Operación en bajo volumen.
2. Integración de un sistema óptico de media.
3. Permitir el acceso de otros dispositivos de media.
4. Material transparente o semitransparente.
5. Funcionamiento aséptico.
6. Resistencia a procesos de autoclavado.

6.1.2. Factores generales para el cultivo de microorganismos

1. Suministro de nutrientes.
2. Agitación y mezcla.
3. Temperatura.
4. Transferencia de gases.
5. Iluminación.

6.1.3. Características generales para el dispositivo óptico de medida

1. Celdas de medida uniformes y fáciles de obtener en el mercado.
2. Precisión de las medidas.
3. Exactitud de las medidas.
4. Estructura desmontable que permita separarlo del recipiente de biorreactor.

6.2. DISEÑO CONCEPTUAL ASISTIDO POR SOFTWARE

El proceso de diseño, se dividió en cuatro componentes principales: biorreactor, celda de medida, armazón del sensor óptico y cámara de incubación. Para cada componente se definen a continuación los elementos propios de diseño:

6.2.1. Biorreactor

Conforme a la literatura el tipo de reactor que mejor cumple con las características de diseño y los factores de cultivo es un sistema cerrado tipo ALR (reactor tipo airlift) de bucles externos, las ventajas son:

- Sistema de incorporación de gases mediante inyección que provee el suministro de algunos nutrientes.
- El intercambio gaseoso es eficiente.
- En el *riser* el gas en ascenso genera un flujo con bajos niveles de esfuerzo cortante que además cumple la función de mezclar y homogenizar el medio de cultivo.
- En el *downcomer* el medio se encontrará homogéneo y libre de burbujas, en

flujo constante descendente.
- La configuración cerrada presenta ventajas de funcionamiento aséptico.

Se compró una estructura física cilíndrica en vidrio con las siguientes medidas: 40,3mm de diámetro interno y 160,0mm la altura del cilindro interior, la cual en fases posteriores de diseño operaría como molde, por este motivo los diseños asistidos por software se realizaron basados en esta pieza.

De manera arbitraria se estimó un volumen mínimo de llenado de 150mL, es decir al llenar este volumen en el contenedor el líquido debía llenar los dos compartimentos (*riser* y *downcomer*).

6.2.2. Celdas de medida

Se requerían dos diámetros para las celdas de medida:

6.2.1.1. Celda de medida incorporada en el reactor (downcomer)

Se determinó que la mejor ubicación de la celda de medida incorporada en el reactor es el *downcomer* (por las características descritas en el apartado 0).

Como material se seleccionó el vidrio por su transparencia, termoestabilidad, uniformidad de las paredes y fácil obtención en el mercado.

El diámetro del tubo de vidrio comercial fue de 16mm.

6.2.1.2. Celda de medida para la salida del reactor (para ensayo de trazadores)

El tamaño de la celda se determinó a partir del tubo de vidrio usado (pipeta de 5mL marca Brand tipo Silber Brand), el cual presentaba las siguientes medidas: 7.9mm de diámetro externo y 5.1mm de diámetro interno.

6.2.3. Armazón del sensor óptico

Componentes, tamaño y disposición geométrica:

El armazón debía contener el emisor de luz (LED) y un detector de intensidad luminosa (LDR), se tomaron las medidas del LED y de la LDR las cuales se tendrían en cuenta con el fin de realizar un prototipo que permitiera empotrar estos componentes electrónicos.

El diseño se propuso en forma de abrazadera para cumplir con la característica desmontable.

Geométricamente los dos componentes estarían enfrentados dejando entre ellos espacio suficiente para la celda de lectura.

Se diseñaron dos armazones asistidos por software para los dos diámetros de celdas (16mm y 7,9mm), quedando así:

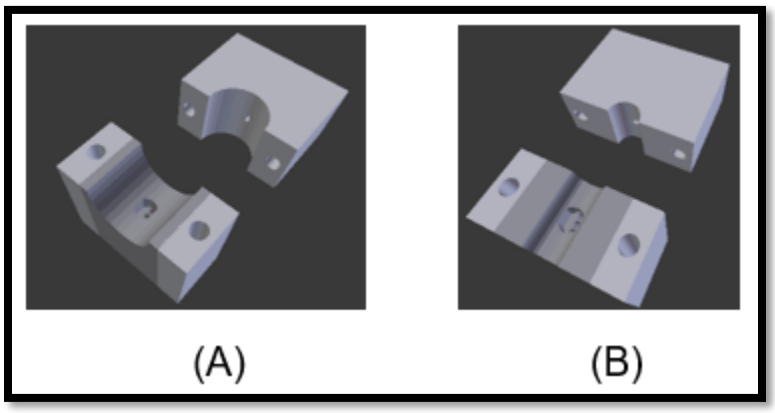


Figura 23 Armazones 3D diseñados en blender.
(A) Para celda de 16mm. (B) Para celda de 7,9mm.

6.2.4. Cámara de incubación

Para el sostenimiento de la temperatura y el suministro de iluminación, se estimó conveniente la fabricación de una cámara de incubación. El espacio estimado como suficiente para albergar en su interior 3 biorreactores con 3 humidificadores por software 3D fue: 30cm x 22cm con una altura de 40cm.

La cámara debía poseer dos circuitos para el sostenimiento de la temperatura: calentamiento y enfriamiento. El primero (calentamiento), se usaría en los cultivos bacterianos (37°C), mientras que el segundo (enfriamiento) para el sostenimiento de la temperatura de crecimiento de las algas (25°C).

6.3. PROTOTIPADO FUNCIONAL

6.3.1. Biorreactor (riser)

A partir de la pieza de vidrio obtenida comercialmente se obtuvo un molde negativo en caucho de silicona. El molde además estaba provisto de dos piezas de tubo de 15mm que servirían como conectores entre el *riser* y las celda de medición incorporada en el reactor (*downcomer*), en la parte superior el molde para generar un conector roscado para la tapa.

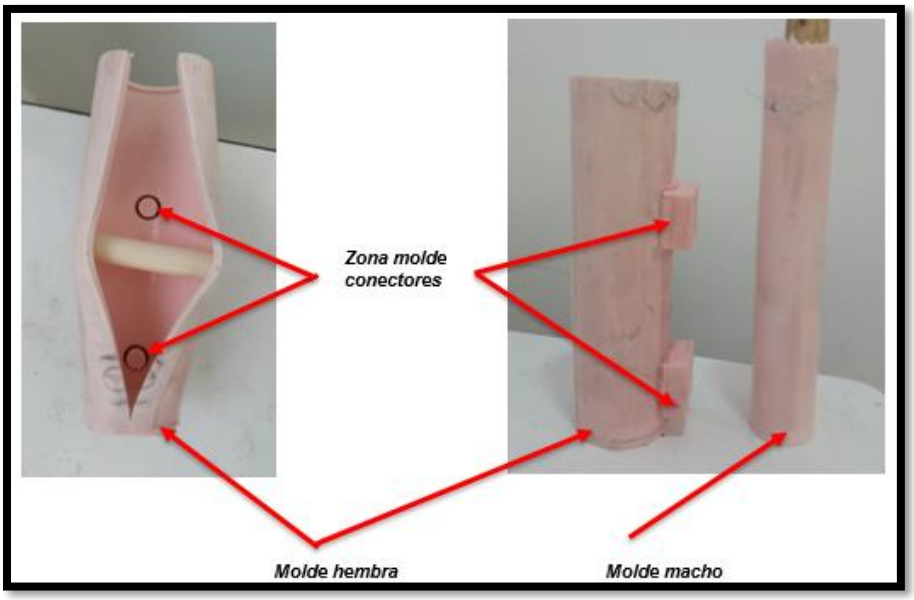


Figura 24 Molde para riser hecho en silicona (vistas laterales).

La tapa fue duplicada bajo la misma técnica de una tapa comercial previamente modificada con tres orificios para la inserción de la aireación, línea de alimentación y salida de aire.

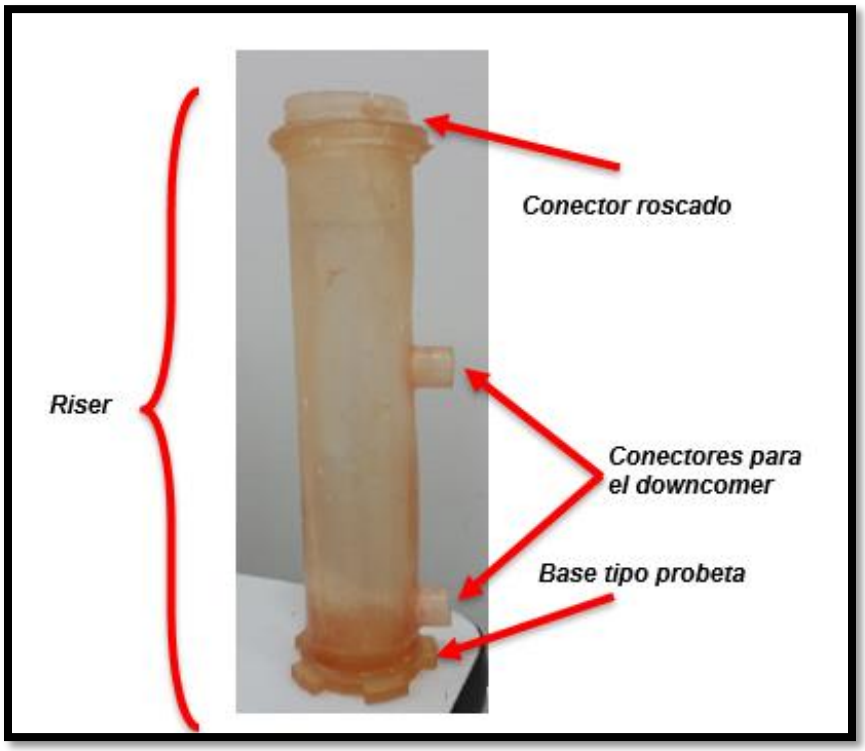


Figura 25 Riser obtenido en resina poliéster a partir del molde

6.3.2. Celdas de medición

6.3.2.1. Celdas incorporadas en el reactor (downcomer)

Para la construcción de las celdas incorporadas en el reactor se seleccionaron tubos de vidrio de 16mm de diámetro externo y 13mm de diámetro interno, los tubos de vidrio se cortaron en tres secciones con una longitud de 74mm.

Con el fin de soportar los tubos de vidrio anteriormente descritos se aumentó el diámetro interno de uno de los extremos de un codo de PVC de ½" usado comercialmente para instalaciones de agua, una vez modificado se realizó un molde de silicona de este codo modificado.

Mediante el molde de silicona anteriormente construido se obtuvo seis piezas en resina poliester. Quedando entonces seis codos en resina poliéster con salida circular de diámetro 15mm por un extremo y de 16mm por el otro extremo.

Los codos finalmente se ensamblaron en parejas sobre las celdas quedando una pieza en forma de corchete " ["con 117mm de longitud, así:

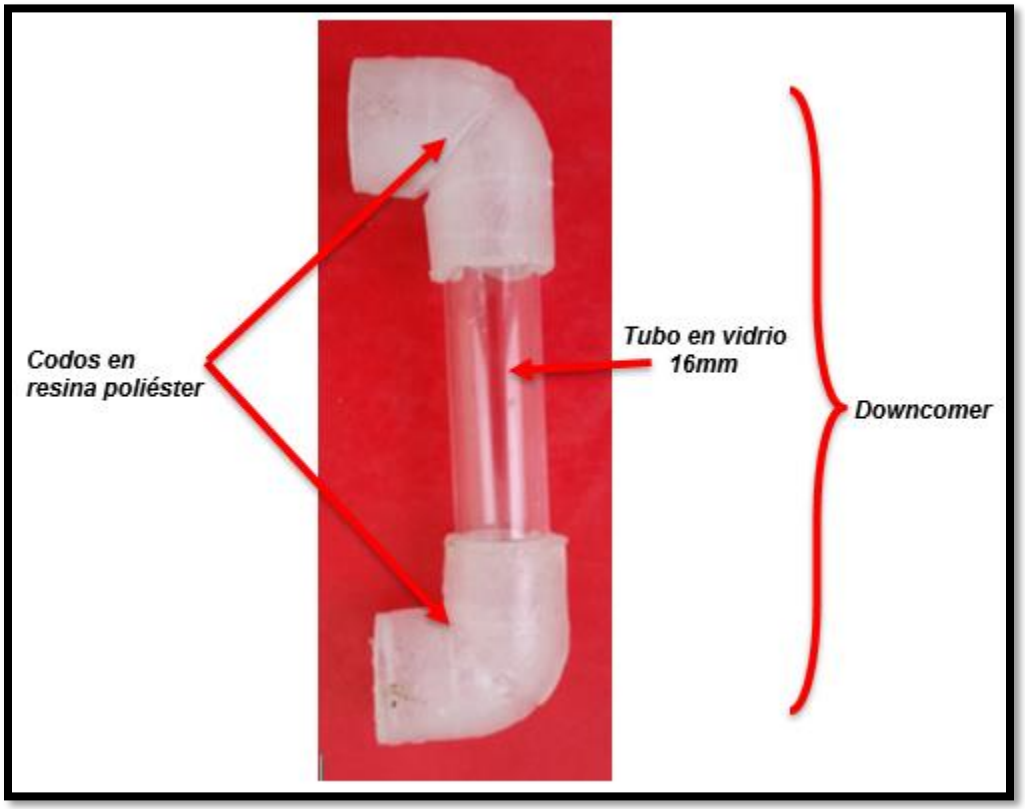


Figura 26 Celda de para milibioreactor

6.3.2.2. Celdas para la salida del reactor (para ensayo de trazadores)

Tubo de acero inoxidable (usado ampliamente en instalación de gases en laboratorios) con un diámetro externo de 6,3mm y diámetro interno de 4.2mm, fue cortado en secciones de 70mm (6 secciones en total).

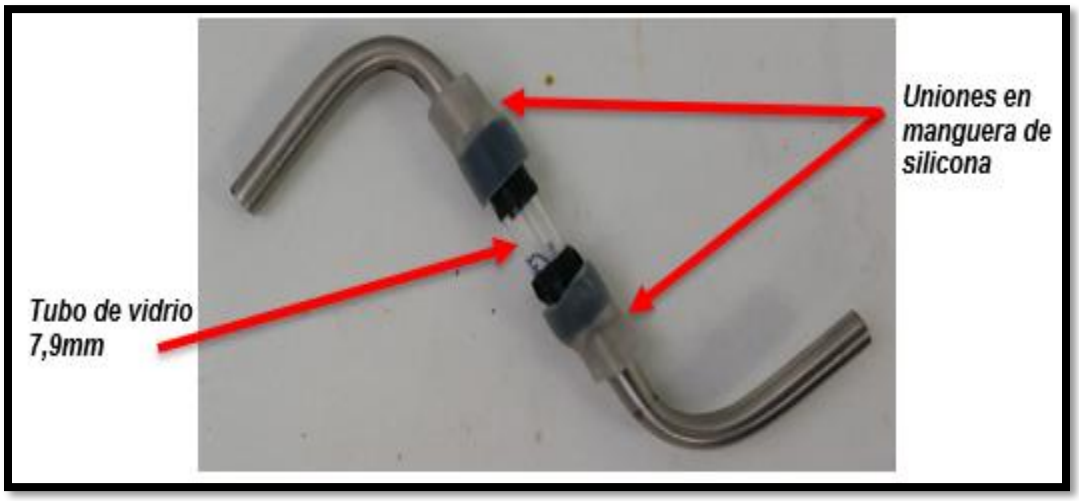


Figura 27 Celda para la salida del reactor

Las secciones de tubo de acero inoxidable fueron ensambladas a los tubos de vidrio con trozos de manguera de silicona de diámetro externo 9,8mm y 5,6mm de diámetro interno, y longitud de 20mmm.

Se construyó una celda por cada reactor y finalmente se ubicaron en un soporte.

6.3.3. Armazón de los sensores de medida

Los armazones de los sistemas de lectura ópticos diseñados en 3D fueron impresos en ácido poliláctico (PLA) y se empotraron los componentes electrónicos (LED y LDR), se puede observar en la Figura 28.

Los armazones destinados a cumplir su función en la salida del reactor se ensamblaron sobre las celdas previamente construidas y ubicadas en un soporte de tal manera que se tenían tres sensores de medida óptica totalmente operativos, conectados a un sistema recolector de datos.

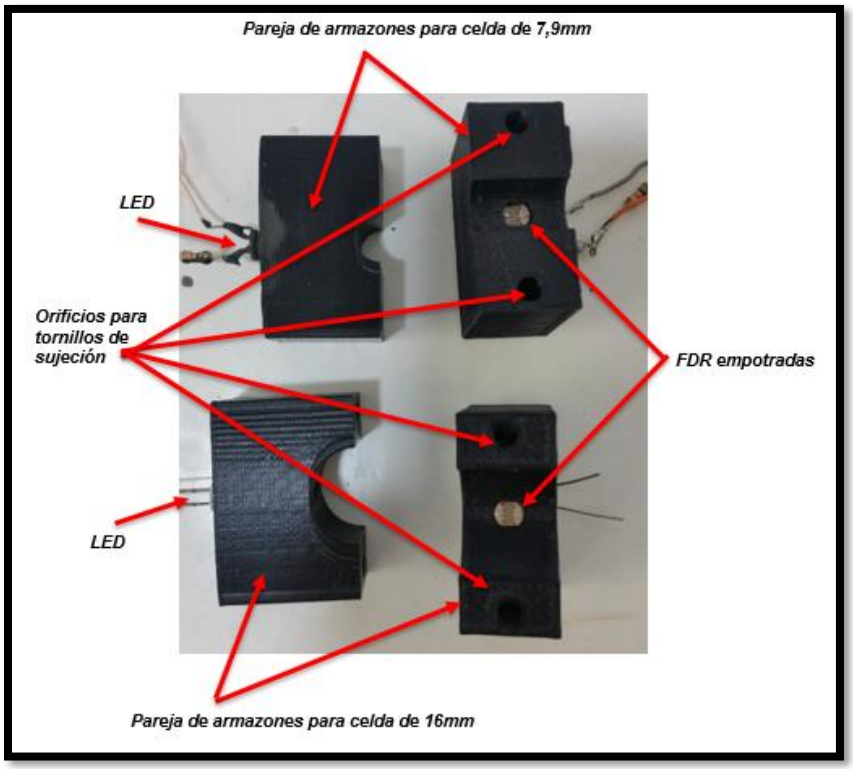


Figura 28 Armazones impresos con componentes electrónicos empotrados

Los armazones destinados a realizar las lecturas sobre las celdas incorporadas al reactor se ensamblaron y dejaron operativos, así:

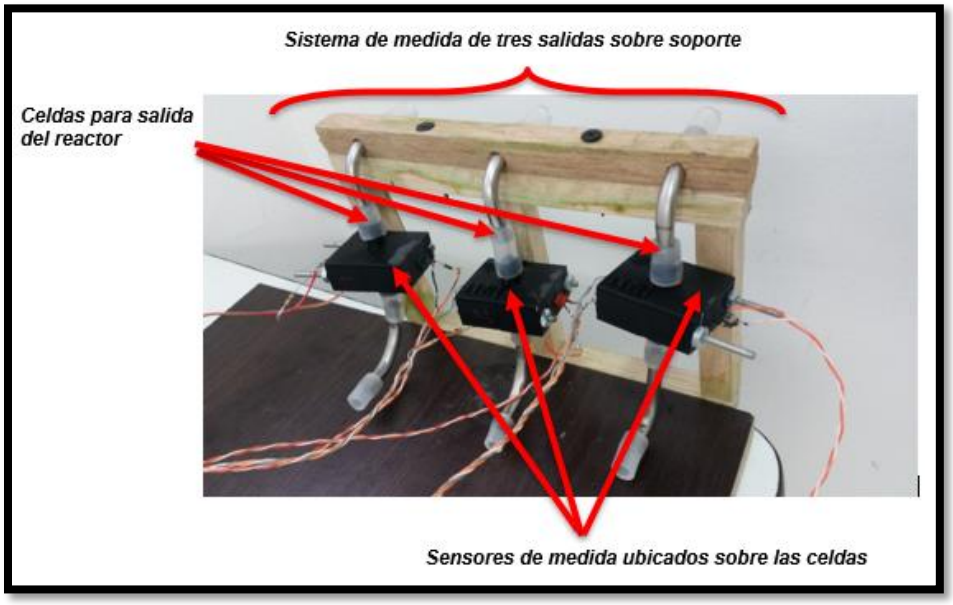


Figura 29 Celdas para salida de 3 milibioreactores con sistema de medida óptico ensamblado

6.3.4. Ensamble sistema de aireación

El sistema de aireación se ensambló uniendo un segmento de tubo de acero inoxidable de 150mm de longitud con un difusor, se adicionó una rejilla cuya función era realizar la separación de gases en la parte superior del *riser*.

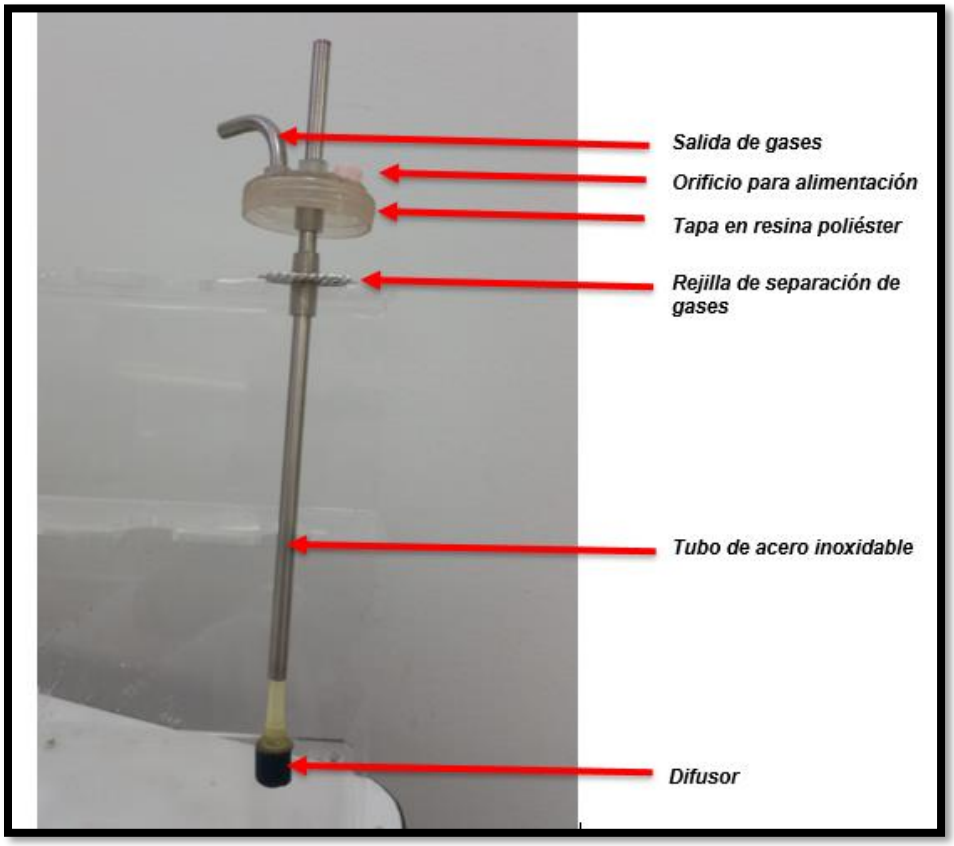


Figura 30 Tubo de aireación para milibioreactores

6.3.5. Cámara de incubación

Conforme a las medidas establecidas, la cámara de incubación fue construida en madera, se colocó termo resistencia en las paredes para realizar el calentamiento.

En la parte superior se instaló un ventilador para extraer aire caliente y permitir el enfriamiento. Dos circuitos independientes se usaron para el control automático de la temperatura.

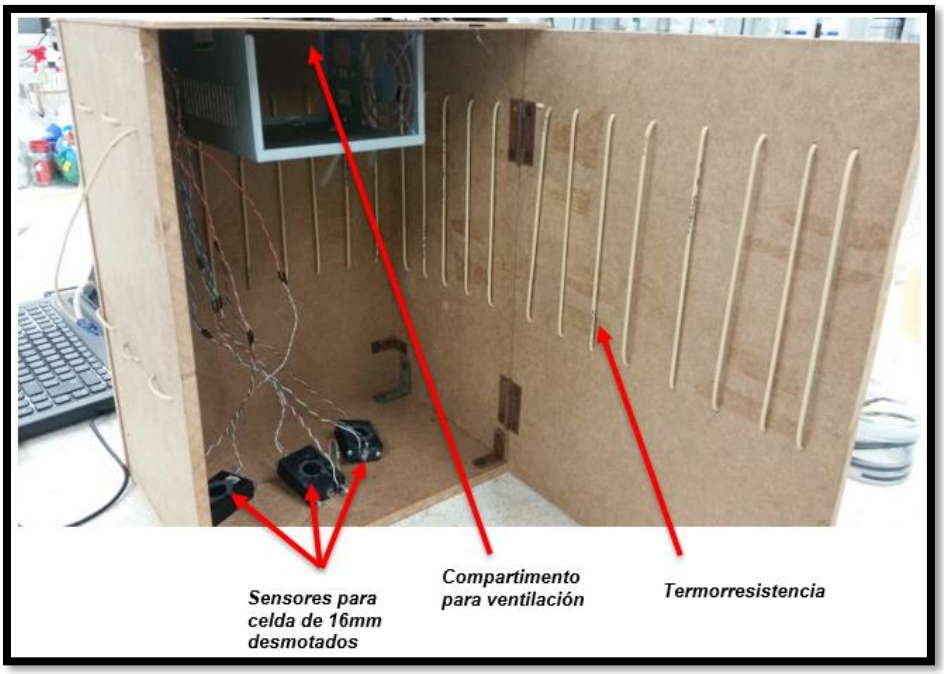


Figura 31 Cámara de incubación

6.3.6. Ensamble riser, downcomer y sistema de aireación.

Una vez obtenidos todos los segmentos se ensamblaron con el fin de completar el biorreactor cerrado tipo ARL de bucles externos.

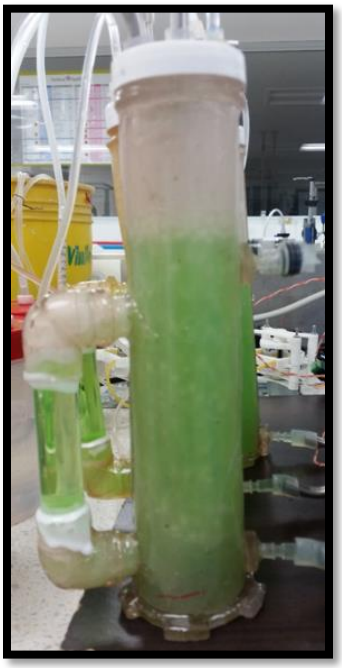


Figura 32 Milibiorreactor

6.4. PRUEBAS ELEMENTALES DE FUNCIONAMIENTO

Se realizaron las siguientes pruebas de funcionamiento:

Autoclavado de los tres biorreactores con carga de 150 mL de agua destilada, esto para descartar posibles fugas producto de la dilatación y contracción del material, posteriormente se realizaron más procesos de autoclavado para los ensayos de crecimiento.

La evidencia de agitación y mezcla se probó cargando los milibiorreactores con 150 mL de agua destila y adicionando colorante, el flujo se verificó visualmente, mientras que la mezcla y agitación se verificó de manera preliminar midiendo el tiempo que tarda el sensor de medida óptica para estabilizarse desde la adición de colorante hasta que se estabiliza la medida.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO

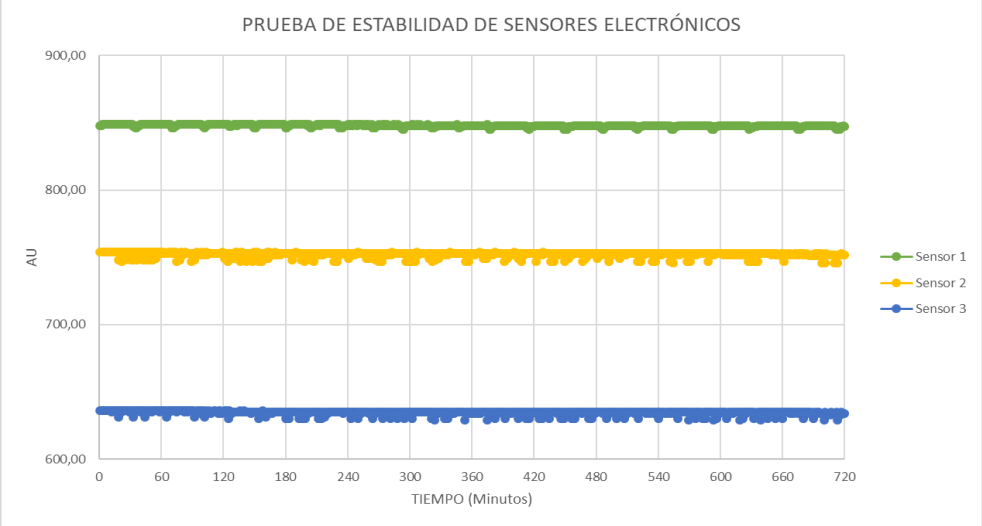


Figura 33 Prueba de estabilidad de sensores electrónicos

En la Figura 33 se observan algunas fluctuaciones en las medidas. Particularmente el sensor 1 en color verde muestra una mayor estabilidad que los otros dos. A partir de los datos contenidos en el apartado anexos 11.5 a continuación se realiza un análisis matemático (Tabla 4) en la cual se registran los valores tomados por cada sensor y además el porcentaje de veces que se encuentra cada valor (El total de datos fue 720 por cada sensor).

Tabla 4 Valores tomados por cada sensor y porcentaje (%) de veces que aparece cada valor en los 720 datos tomados (12horas).

	Valor 1	Valor 2	Valor 3	Valor 4	Valor 5	Valor 6	Valor 7	Valor 8	Valor 9	$\bar{X}$ ponderado
Sensor 1	845	846	847	848	849	-	-	-	-	848
	3,1%	5,7%	7,4%	53,6%	30,3%					
Sensor 2	629	630	631	633	634	635	636	-	-	635
	1,3%	7,2%	1,1%	0,4%	11,8%	65,1%	13,1%			
Sensor 3	746	747	748	749	750	751	752	753	754	752
	0,7%	6,0%	2,5%	3,1%	0,3%	0,7%	13,3%	63,1%	10,4%	

Se corrobora lo observado, el sensor 1 de color verde en la Figura 33, es el más estable de los tres puesto, presenta la menor fluctuación, 5 valores ((Fila 2 de la Tabla 4). El 91% de las medidas se encuentran en un rango de tres valores (847 a 849).

El sensor 2 de color amarillo fluctúa entre 7 valores (Fila 4 de la Tabla 4), el 90% de

sus datos se encuentra en un rango de tres valores (634 a 636).

Finalmente, el sensor 3 de color azul fluctúa en un rango de 9 valores (Fila 6 de la Tabla 4) y el 87% de los valores se encuentra en un rango de 3 valores (752 a 754).

Los sensores mostraron fluctuaciones en rangos de mínimo 5 valores y hasta 9 valores, lo que significa que, para las condiciones del ensayo, la fluctuación en los tres sensores está entre 0,5% y 0,9% del total de los posibles valores que pueden tomar. (Los sensores pueden tomar valores entre 0 a 999).

Los promedios ponderados arrojan información sobre el comportamiento de los sensores, teniendo en cuenta que la prueba se realizó a temperatura estable (dentro de la cámara de incubación) con ausencia total de iluminación exterior y sobre la misma muestra, se observa que los valores obtenidos son diferentes entre sí, esta situación será discutida en párrafos posteriores a la luz de las pruebas adicionales realizadas.

Cabe señalar que los componentes electrónicos que cumplen la función de emisión de luz (LED) y sensibilidad a la iluminación (LDR) son los más baratos encontrados en el mercado por tanto, la estabilidad alcanzada se considera exitosa (según apreciaciones del equipo de trabajo).

7.2. CURVAS DE COMPARACIÓN CONTRA ESPECTROFOTÓMETRO

Tabla 5 Datos de medidas para las soluciones seriadas en espectrofotómetro y en sensores de medida óptica.

		Absorbancia a diferentes longitudes de onda			Medida de cada sensor		
Dilución	Concentraciones g/L	A (420nm)	A (630nm)	A (680nm)	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3
madre	1,0297	--	--	--	--	--	--
1	0,4119	2,22	0,859	0,022	255	232	157
2	0,1648	0,889	0,345	0,008	338	312	226
3	0,0659	0,361	0,138	0,004	375	349	257
4	0,0264	0,142	0,055	0,002	391	362	269
5	0,0105	0,055	0,021	--	397	369	274
6	0,0042	0,021	0,008	--	402	372	277

En la Tabla 5 se registran las medidas hechas sobre las diluciones seriadas de colorante, tanto en el espectrofotómetro como en los sensores de medida óptica. Así, por ejemplo, la dilución 3 con una concentración de 0,0659g/mL mostró una absorbancia de 0,361 a 420nm; de 0,138 a 630nm y así sucesivamente.

Los tres sensores estudiados, a pesar de haber sido fabricados con componentes electrónicos iguales (de la misma referencia), para una misma solución arrojan valores diferentes por ejemplo la dilución 3 en la Tabla 5 (fila 6, columnas 6, 7 y 8) muestra los valores 375, 349 y 257, tal y como ya se había observado en la prueba de estabilidad.

No significa el anterior análisis que el nuevo sensor fracasa en la obtención de datos exactos sobre la absorción de luz de una solución coloreada, sino muy por el

contrario que cada conjunto electrónico opera y posiblemente operará sobre rangos particulares, por tanto: ***los sensores requieren una calibración.***

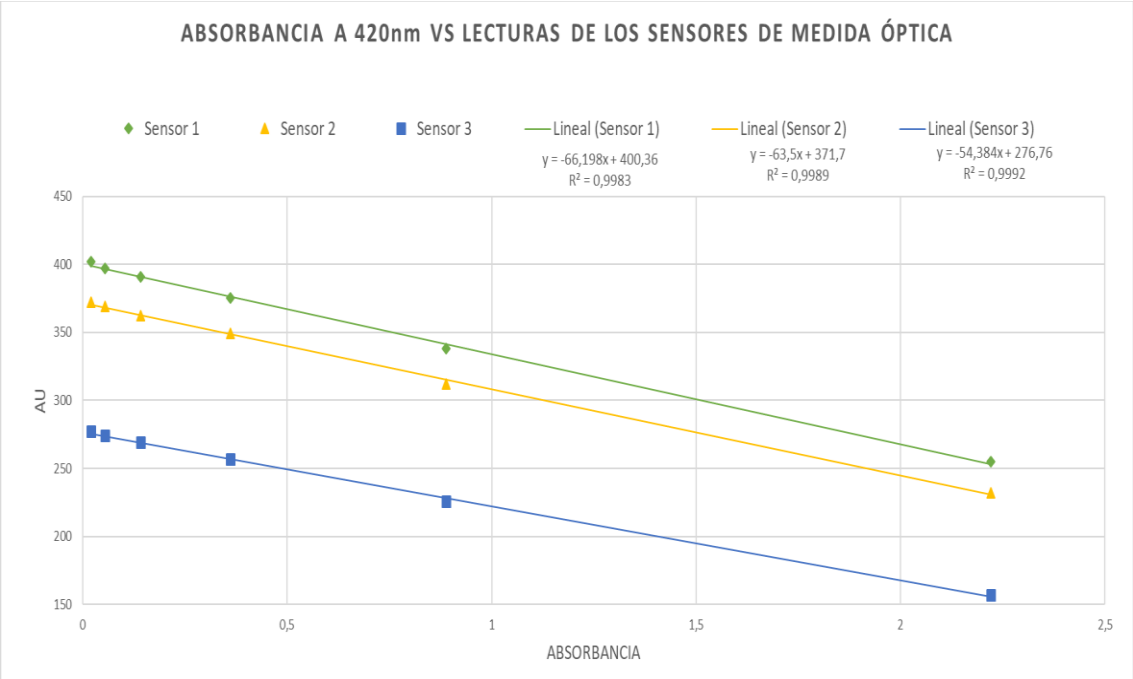


Figura 34 Correlaciones espectrofotómetro a 420nm y sensores electrónicos

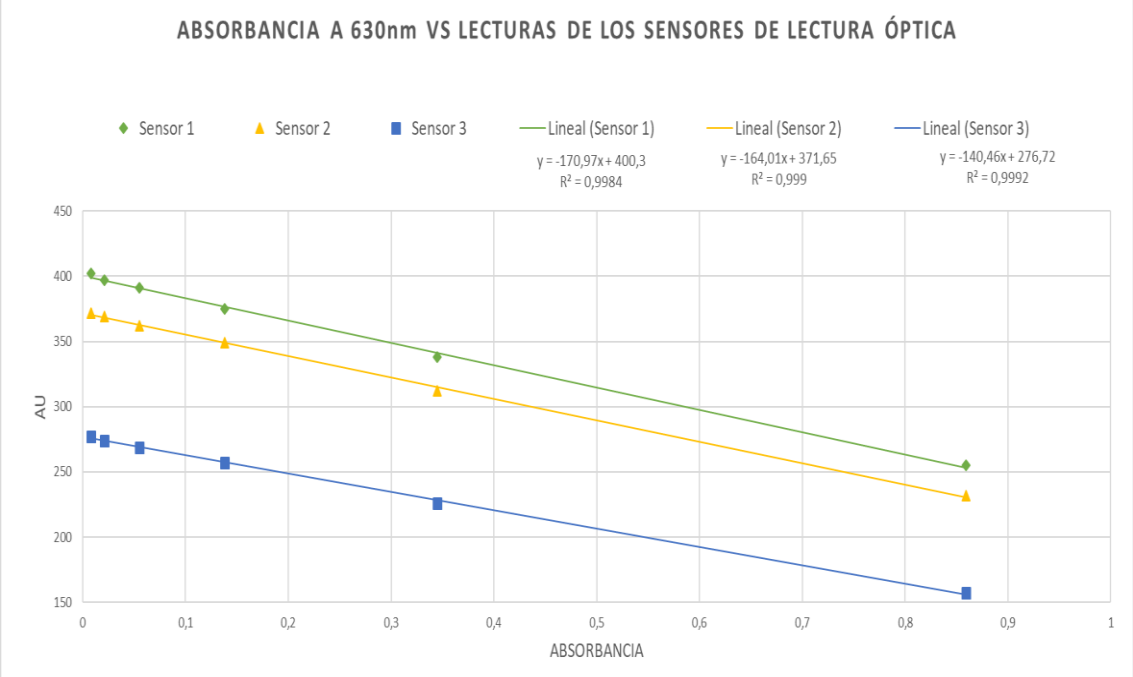


Figura 35 Correlaciones espectrofotómetro a 630nm y sensores electrónicos

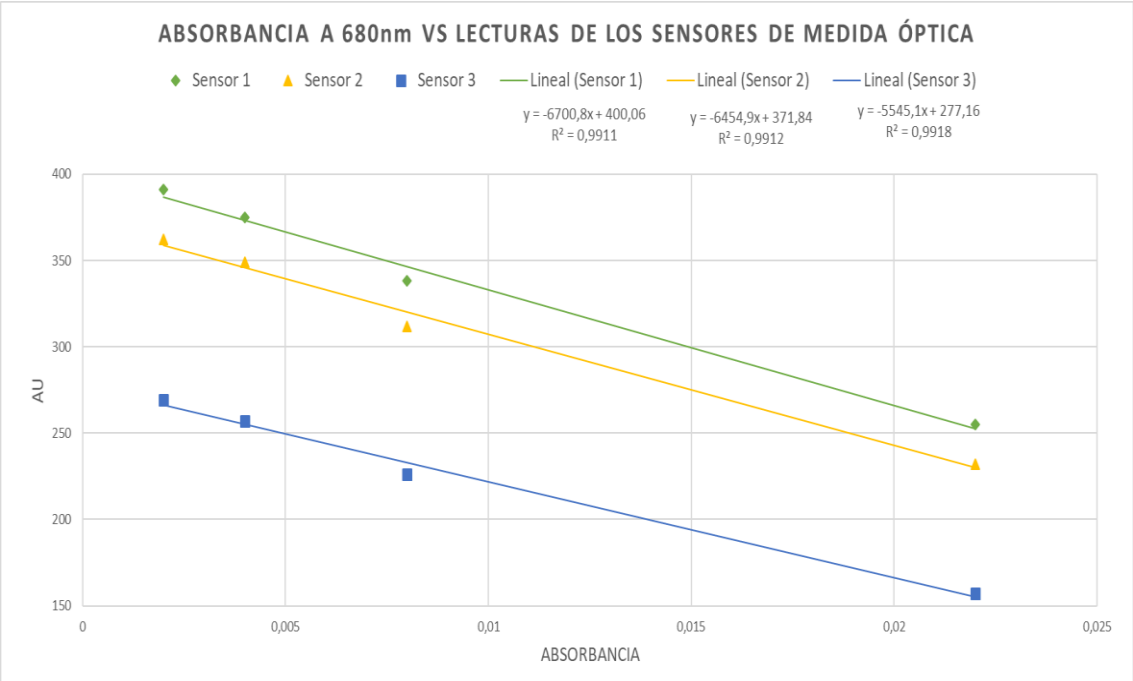


Figura 36 Correlaciones espectrofotómetro a 680nm y sensores electrónicos

Para las diferentes soluciones seriadas de colorante verde limón se observa que: ***las correlaciones establecidas entre los sensores de medida óptica con los valores del espectrofotómetro son lineales***, esto es válido al menos, en las longitudes de onda estudiadas 420nm, 630nm y 680nm.

Tabla 6 Valores de las ecuaciones de la recta de Figura 34, Figura 35 y Figura 36.

	420 nm			630 nm			680nm		
	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3
pendiente	-66,198	-63,500	-54,384	-170,97	-164,01	-140,46	-6700,8	-6454,9	-5545,1
intercepto	400,36	371,7	276,76	400,3	371,65	276,72	400,06	371,84	277,16
R2	0,9983	0,9989	0,9992	0,9984	0,9990	0,9992	0,9911	0,9912	0,9918

Como se puede observar en la
Figura 45 las zonas de máxima absorción del colorante verde limón, se encuentran en las longitudes de onda cercanas a 420nm y 630nm mientras que a 680nm los valores de absorción en el espectrofotómetro son bajos. Ahora bien, conforme a lo contenido en la Tabla 6 se puede deducir que los coeficientes de correlación lineal (R^2) más próximos a la unidad, corresponden al conjunto de rectas correlacionadas a 630nm, mientras que los R^2 más bajos son los obtenidos en la correlación a 680nm, esto es posiblemente debido a la pobre absorción registrada en el espectrofotómetro que se pueden observar en la quinta columna de la Tabla 5.

Una situación mucho más llamativa corresponde al valor de las pendientes, el ensayo a 630nm (y por extensión los otros ensayos), muestra tres valores de pendiente, una situación reveladora, puesto que ***se esperaba que el***

comportamiento de los sensores, se pudiese representar como familias de curvas con la misma pendiente, pero no es así.

Nuevamente, esto no pone en entredicho la exactitud de los sensores, sino corrobora lo conjeturado: se requiere una calibración inicial para cada conjunto (circuito controlador y componentes electrónicos responsables de la medida).

7.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN COLORANTE VERDE LIMÓN

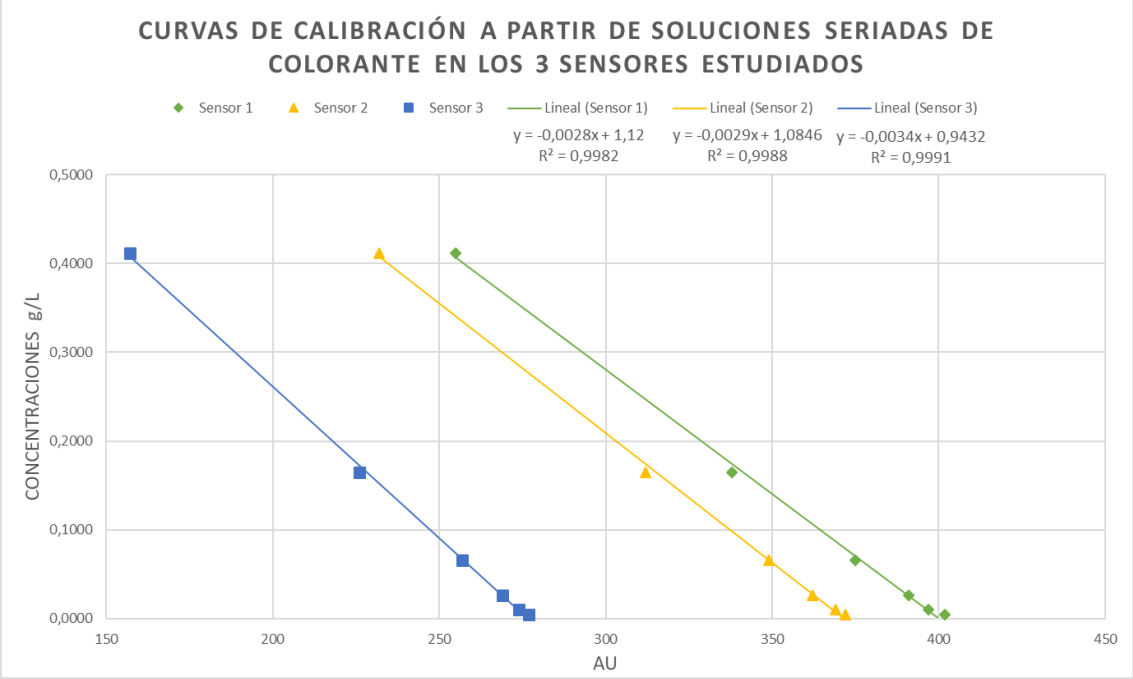


Figura 37 Curva de calibración para los sensores de medida óptica.

Hasta el momento se ha demostrado la linealidad del comportamiento de los sensores respecto al espectrofotómetro (Figura 34, Figura 35 y Figura 36). La Figura 37 muestra que ***la correlación de valores entre las concentraciones de las diluciones y las lecturas de los sensores de medida óptica son lineales.***

La Figura 46 muestra la curva de calibración de las diluciones realizada en el espectrofotómetro, observando que los coeficientes de correlación son 1 o muy próximos a la unidad quedando así demostrado que el colorante fue adecuado para la calibración y para los ensayos de trazadores, descartando así una fuente de error.

Tabla 7 Valores de concentración de colorante verde limón a partir de la ecuación de la recta obtenida para cada sensor y errores relativos porcentuales de cada cálculo.

		Sensor 1		Sensor 2		Sensor 3	
Dilución	Valor esperado Concentraciones g/L	Concentracion g/L por ecuación	Error relativo porcentual	Concentracion g/L por ecuación	Error relativo porcentual	Concentracion g/L por ecuación	Error relativo porcentual
1	0,4119	0,4060	1,4%	0,4118	0,02%	0,4094	0,6%
2	0,1648	0,1736	5,4%	0,1798	9,1%	0,1748	6,1%
3	0,0659	0,0700	6,2%	0,0725	10,0%	0,0694	5,3%
4	0,0264	0,0252	4,4%	0,0348	32,0%	0,0286	8,5%
5	0,0105	0,0084	20,3%	0,0145	37,5%	0,0116	10,0%
6	0,0042	-0,0056	232,8%	0,0058	37,5%	0,0014	66,8%

Queda finalmente evaluar la relación que tiene el valor esperado de las concentraciones con el valor obtenido a partir de la ecuación de la recta (Figura 37), los resultados se presentan en la Tabla 7.

Los sensores 1 y 3 muestran pequeños valores de error hasta la cuarta dilución, a partir de la dilución 5 dilución el porcentaje de error aumenta con rapidez. El sensor 2 inicia en 0,02% y alcanza un 10% de error en la 3 dilución.

Es común que la absorbancia para sustancias coloreadas a bajas concentraciones (particularmente bajo 0,1 de absorbancia) no presenten un comportamiento lineal respecto a los valores que se puedan medir entre 0,1 y 1 de absorbancia, de allí se entiende el porqué los errores relativos de los cálculos son bastante grandes en los sensores, el espectrofotómetro se comporta del mismo modo para estas diluciones.

7.4. ENSAYO DE TRAZADORES

En total se registraron 8640 datos para cada ensayo (2880 por cada uno de los reactores), los datos que sustentan la
Figura 38 y la
Figura 39 se encuentran en el apartado anexos en la Tabla 16 y la Tabla 17 respectivamente.

Tabla 8 Cálculos RTD para inyección en superficie

Reactor	V (mL)	v (mL/min)	RTD Teorico (min)	RTD exp (min)	Error relativo
1	144	0,20	720	674	6,4%
2	148	0,21	694	702	1,2%
3	148	0,21	716	713	0,4%

Tabla 9 Cálculos RTD para inyección en profundidad

Reactor	V (mL)	v (mL/min)	RTD Teorico (min)	RTD exp (min)	Error relativo
1	145	0,21	702	635	9,5%
2	143	0,20	698	704	0,9%
3	148	0,21	716	676	5,6%

La

Figura 38 y la
Figura 39 muestran la tendencia del comportamiento del trazador, comparando estos datos con la Figura 3 y la Figura 4 se constata que ***el modelo de operación corresponde a biorreactor continuo de mezcla completa y que la operación es perfecta sin cortocircuitos ni zonas muertas.***

Según lo consignado en la Tabla 8 y Tabla 9 los errores relativos de los RTD para los dos ensayos no supera el 9,5%, constatando que el comportamiento es muy cercano al ideal.

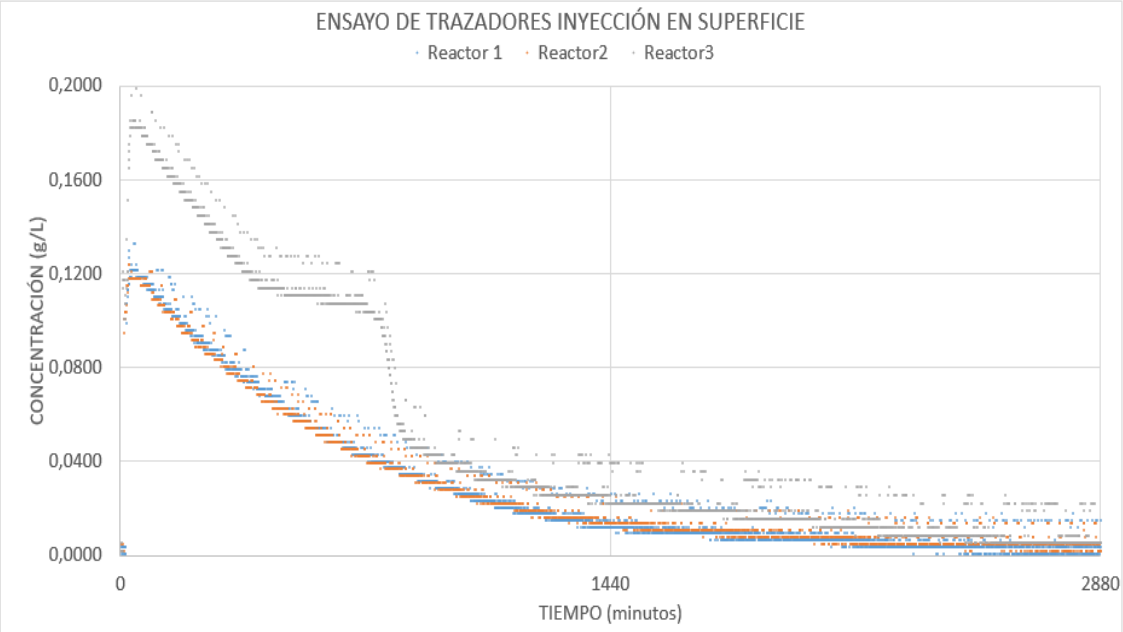


Figura 38 Gráfico ensayo de trazadores inyección en superficie

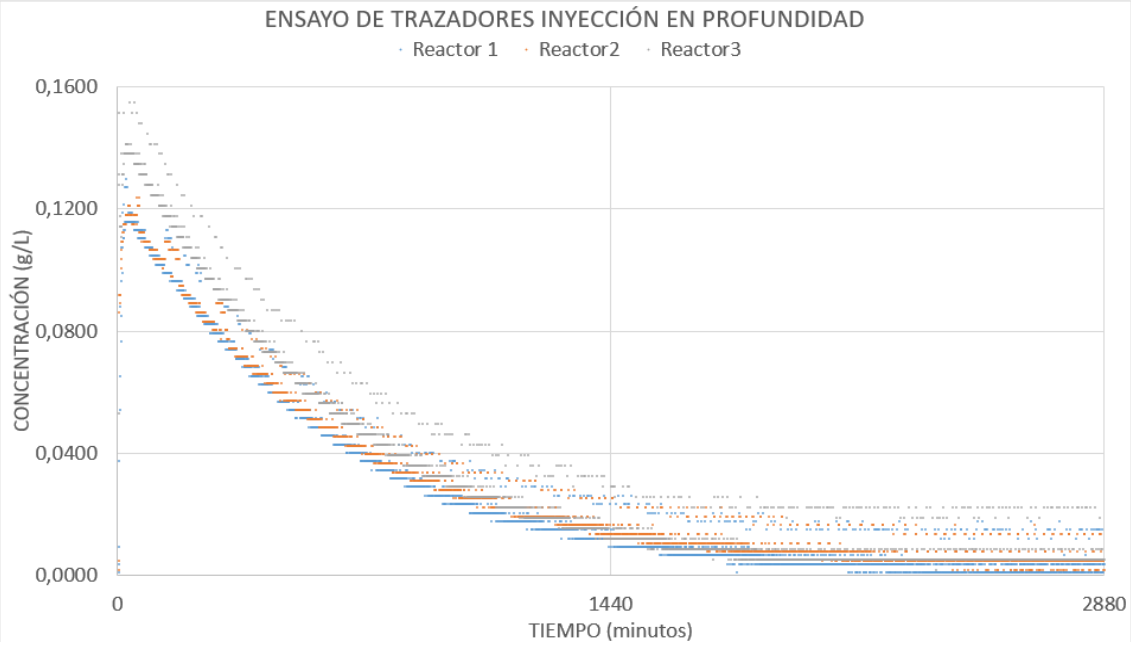


Figura 39 Gráfico ensayo de traz adores inyección en profundidad

7.5. PRUEBAS DE CRECIMIENTO CON MICROORGANISMOS

7.5.1. Ensayo con cultivo E. coli MC4100

7.5.1.1. Curva De Calibración

Tabla 10 Datos medidas de las diluciones seriadas en espectrofotómetro y en los sensores de medida óptica

	Sensor 1		Sensor 2		Sensor 3	
Dilución	A	AU	A	AU	A	AU
1	0,428	583,7	1,322	612,7	1,225	413,7
2	0,206	642	0,803	712	0,715	564
3	0,092	672	0,421	785,7	0,369	688,7
4	0,031	685,3	0,203	809	0,179	734,7
5	-	-	0,094	827,3	0,072	749,7

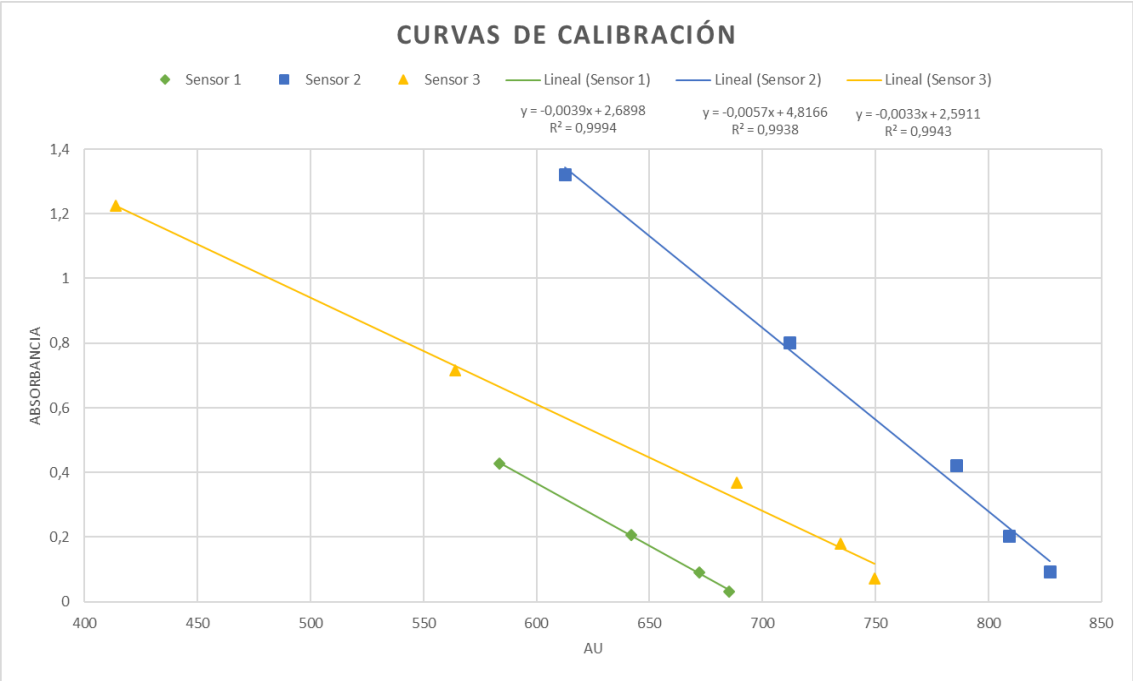


Figura 40 Curva de calibración para E. coli MC4100 en los sensores de medida óptica.

7.5.1.2. Curvas de crecimiento

A partir de las curva de calibración (Figura 40) y de los datos obtenidos por el sensor de medida óptica (Tabla 14 y Tabla 15) se calcularon los valores de absorbancia, se aplicó el logaritmo base 10 y se obtuvo las siguientes curvas de crecimiento:

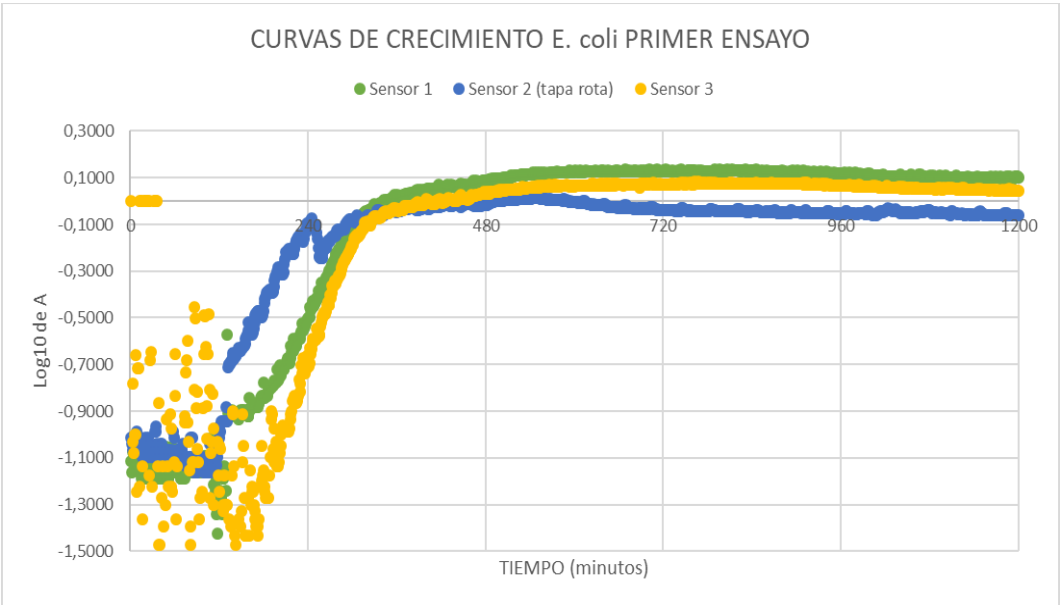


Figura 41 Primer ensayo de crecimiento E. coli MC4100

El primer ensayo de crecimiento mostró grandes fluctuaciones en las medidas, contrario a lo que ya se había evaluado. Durante el montaje algunos LED quedaron enfrentados, la primera etapa del experimento (primeros 240 minutos), muestran gran inestabilidad en las lecturas (Figura 41). Una vez observada la causa del problema, se recubrieron los LED y se continuó con el ensayo, se observa en la misma figura que a partir de la corrección realizada en el montaje los sensores mostraron gran estabilidad.

Por la razón antes expuesta se repitió el ensayo, obteniendo las siguientes curvas de crecimiento.

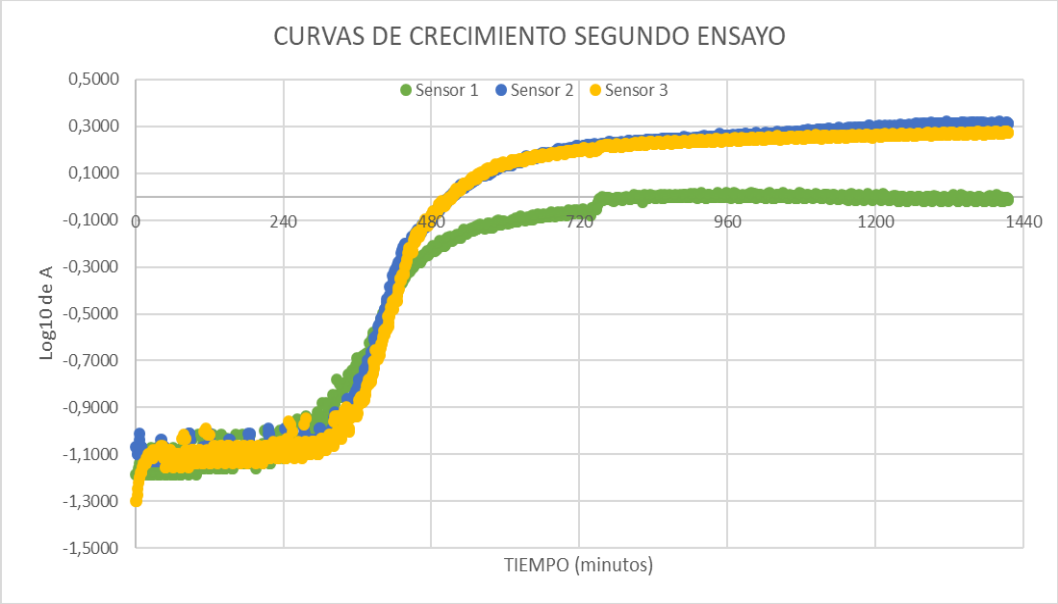


Figura 42 Primer ensayo de crecimiento E. coli MC4100

Como se puede observar en la Figura 42 dos de las curvas de crecimiento presentan comportamiento casi idéntico, un tercer sensor registró menores valores. Este hecho se debió a un acontecimiento fortuito: producto de la falla del sistema de aireación del milibiorreactor 1 y muestra, al menos de manera intuitiva, que bajo el diseño airlift el sistema de aireación cumple funciones fundamentales para el crecimiento bacteriano; en la literatura, particularmente se trataron las siguientes: el intercambio gaseoso, la generación del flujo interno, el sostenimiento de condiciones homogéneas, la agitación y bajos niveles de cizallamiento. Teniendo en cuenta la avería en el reactor y a partir de la gran similitud entre los valores obtenidos con los sensores 2 y 3, en la Figura 42 podrían descartarse la curva anómala.

Cabe aclarar que la intencionalidad de este trabajo no es la determinación de los factores que afectan el crecimiento, sino establecer la viabilidad del nuevo diseño de milibiorreactor, razón por la cual el análisis de la incidencia comentada en el párrafo anterior se deja para trabajos posteriores que permitan realizar un análisis estadístico extenso y riguroso.

Los comportamientos obtenidos para las curvas de crecimiento en la Figura 42 se ajustan en forma y proporción a los comportamientos reportados en la literatura para la bacteria *E.coli,* como se puede constatar en la página 32, concretamente en la Figura 12.

Las diferentes fases (latencia, exponencial y estacionaria) muestran desarrollarse en los mismos tiempos (aún para el milibiorreactor 1 al que le falló el sistema de aireación). Teniendo en cuenta que la bacteria usada es un modelo biológico, se espera que otros organismos cuyo modelo biológico más cercano sea *E. coli* puedan ser estudiados en los nuevos diseños de milibioreactores, por tanto: ***la evidencia muestra que el diseño de milibiorreactor cumple con las características suficientes para el sostenimiento y estudio de algunos cultivos microbianos.***

Algunos hechos recalcables del presente ensayo son:

- El seguimiento del crecimiento se realizó de manera automatizada, lo que permitió prescindir de la dedicación de un operario en el muestreo.

- Los bajos volúmenes de operación permitieron el uso de pequeñas cantidades de reactivos.

- Gracias a que se tenían dos circuitos independientes para el seguimiento de la temperatura se logró observar que la temperatura en el cultivo permanece entre 1,5 y 2 grados por debajo de la temperatura del aire dentro de la cámara de incubación (por ejemplo: para el cultivo de *E.coli* se observaron temperaturas del aire entre 38,4°C y 39,2°).

- El uso de una cámara de incubación bajo el diseño planteado permitió el sostenimiento de la temperatura de los cultivos líquidos en pequeños rangos, se observaron fluctuaciones de 36,9°C a 37,3°, un hecho muy deseable conforme a lo indicado en la literatura.

- El sistema de seguimiento para el caso de *E. coli* se calibró contra las lecturas de espectrofotometría, puesto que la literatura relacionada con dicha bacteria es basta y se acostumbra reportar los crecimientos en absorbancia. No obstante, la evidencia producto de los ensayos hechos con el colorante sugiere que: para otro tipo de microorganismos puede unirse el seguimiento automatizado con métodos de calibración habituales, esto con el fin de prescindir del uso del espectrofotómetro en los estudios de crecimientos bacterianos.

7.5.2. Ensayo con cultivo Chlorella

7.5.2.1. Curvas de calibración

Tabla 11 Masa seca y medidas de las soluciones seriadas en espectrofotómetro y en los sensores de medida

óptica.

			Medida de cada lector		
Solución	masa seca (g/L)	A (680nm)	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3
madre	1,0297	2,263	-	-	-
1	0,6957	1,284	323	657	435
2	0,3746	0,686	497	760	620
3	0,1964	0,354	600	807,5	712
4	0,1046	0,183	645	825	746
5	0,0579	0,096	668	836	772

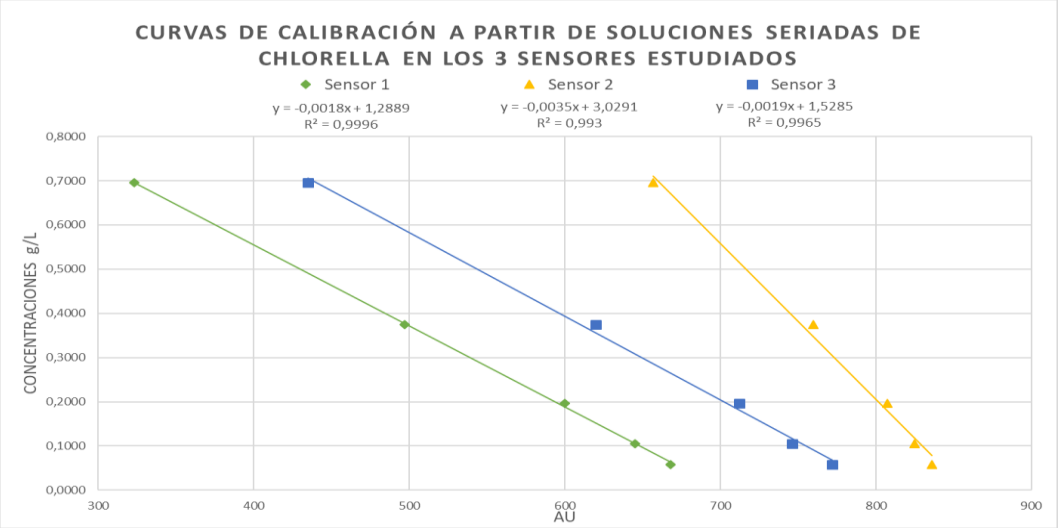


Figura 43 Curva de calibración para Chlorella sp. para los sensores de medida óptica.

Las curvas de calibración de los sensores en diluciones seriadas de *Chlorella sp.* muestran un comportamiento lineal, una extensión de lo ya observado con el colorante, luego los sensores pueden usarse para el seguimiento del crecimiento de este microorganismo de manera similar al seguimiento del crecimiento del cultivo de *E.coli*. Aún más, en el caso del alga, debido a que la calibración se realizó respecto a la masa seca se podría prescindir del uso de otros instrumentos de laboratorio como el espectrofotómetro.

7.5.2.2. Curva de crecimiento

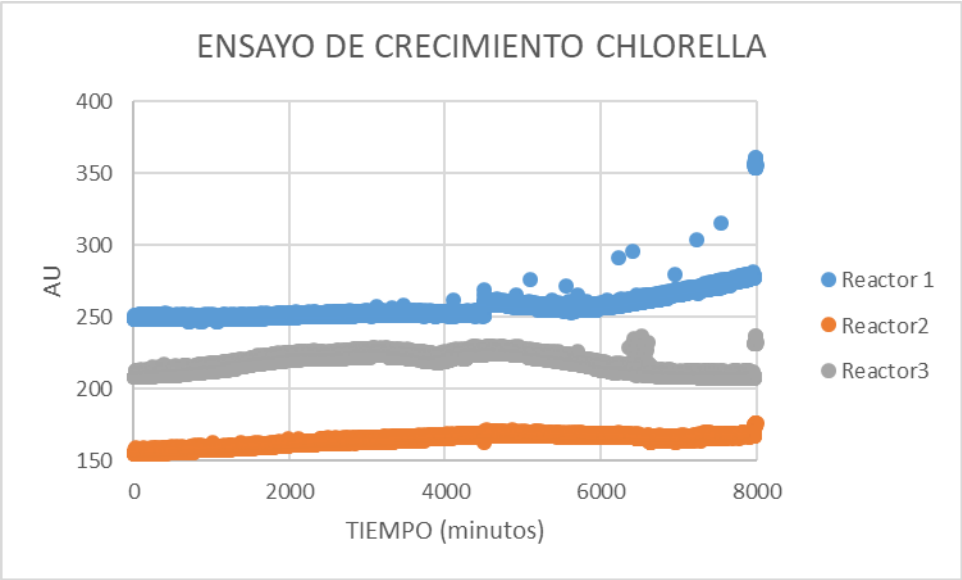


Figura 44 Cultivo de Chlorella sp. primeros 8000 minutos

Tras 7990 minutos de haber iniciado el cultivo del alga en los nuevos milibiorreactores se observó un tono verdoso en los cultivos (los datos han sido consignados en la Tabla 18), sin embargo las variaciones en los sensores no eran significativas, se procedió a apagar la iluminación del interior de la cámara de incubación y se observó una diferencia de hasta 82 unidades en las medidas. El reactor 1 muestra la tendencia del crecimiento sin embargo se encuentra enmascarada por la alta iluminación.

Los dos hechos observados (el tono verdoso y el comportamiento sensor 1) muestran que en efecto las algas se encuentran creciendo dentro de los milibiorreactores, pero la intensidad de luz exterior satura los lectores e impide la toma de medidas.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. CONCLUSIONES

Se diseñó a partir de la literatura un biorreactor con las siguientes características: cerrado tipo airlift de bucles externos, con una columna principal (*riser*) para el mezclado eficiente y el intercambio de gases. Con una columna secundaria de

menor diámetro (downcomer) en vidrio apropiada para el dispositivo de medida óptica para el seguimiento automatizado del crecimiento.

El costo de construcción de los tres reactores con sus respectivos sistemas de control correspondió al 3% del costo del recipiente de un reactor comercial para el cultivo de microorganismos. Los tres prototipos funcionales de biorreactores construidos operaron con volumen aproximados de 150 mL, los recipientes mostraron resistencia a la esterilización por autoclavado. El sensor desarrollado se imprimió mediante tecnología 3D, usa componentes electrónicos básicos y mide la absorción de luz directamente en el cultivo prescindiendo así del muestreo (algo que comercialmente no se encuentra).

La caracterización hidrodinámica por trazadores mostró que los biorreactores funcionan bajo un modo de operación de tanque continuo de mezcla completa, la anterior afirmación se sustenta en que los tiempos de residencia experimentales presentan una desviación entre el 0,4% y el 9,5% respecto a los valores teóricos, Indica esto que el sistema no debería presentar cortocircuitos ni zonas muertas. Esta caracterización muestra además que

Los resultados de los ensayos de crecimiento con *E.coli* fueron totalmente satisfactorios, las curvas de crecimiento obtenidas se asemejan en forma y proporción a las reportadas en la literatura.

8.2. CONCLUSIONES ADICIONALES Y RECOMENDACIONES

Como se puede observar en la Figura 41 y conforme a lo comentado en la discusión se concluye que: los sensores se ven afectados por fuentes de iluminación externa, y por tanto interferencias ocasionales de pequeñas fuentes de iluminación pueden afectar considerablemente las medidas, se recomienda confinar el conjunto (biorreactores y sensores) en cámaras oscuras.

En el caso particular del cultivo de algas se recomienda apagar de manera periódica la iluminación con el fin de permitir que el circuito recolector de datos almacene las suficientes medidas en oscuridad como para construir con éxito las curvas de crecimiento algal.

Se comprobó que el comportamiento de los sensores de medida óptica en soluciones muy diluidas de colorante (absorbancias inferiores a 0,1 a 630nm) no se puede realizar con exactitud mediante aproximaciones lineales, sin embargo, el instrumento aún no había llegado a sus límites de detección, se recomienda evaluar otro tipo de aproximaciones matemáticas cuando se desee trabajar con diluciones bajo estas condiciones. Los límites superiores de linealidad no se establecieron. En general se recomienda verificar estos límites para cada analito en particular.

Para las diferentes soluciones seriadas de colorante verde limón: el comportamiento

de los sensores de medida óptica respecto a los valores del espectrofotómetro es lineal, esto es válido al menos, en las longitudes de onda estudiadas 420nm, 630nm y 680nm, luego se podría aseverar que la correlación de las medidas de los sensores respecto a las medidas del espectro se puede realizar a diferentes longitudes de onda, aun cuando el sensor solo usa una longitud de onda.

Las medidas de los sensores presentan comportamientos lineales respecto a características como la masa seca o la concentración de colorante, de manera intuitiva se puede concluir que: es posible que con el uso del sensor de medida óptica desarrollado se pueda prescindir del uso de equipos de laboratorio como el espectrofotómetro, sin embargo se recomienda realizar estudios exhaustivos y rigurosos que permitan establecer mediante métodos estadísticos la fiabilidad del nuevo equipo desarrollado.

La calibración de los sensores de medida óptica debe realizarse con al menos dos puntos, puesto que el comportamiento de los sensores entre sí no corresponde a una familia de rectas.

Los microchips en los circuitos controladores de los sensores de medida óptica pueden eventualmente ser configurados en el código fuente de tal manera que arrojen siempre los mismos valores para una misma solución coloreada, conforme a lo que sucede con los espectrofotómetros, generando en el usuario final facilidades de manejo y confianza.

Se observó en los datos recolectados y en los análisis estadísticos que las medidas de los sensores tienden a permanecer alrededor del 90% en rangos pequeños por tanto se recomienda implementar métodos estadísticos para el descarte de datos atípicos directamente en el código fuente con que opera el microchip controlador, mejorando así la precisión de las medidas.

Se recomienda la ampliación de las características electrónicas actuales de circuitos controladores de los sensores de tal manera que la calibración a que se ha hecho mención en los dos párrafos anteriores pueda ser realizada por el usuario mediante soluciones patrón en cualquier momento, similar a lo que en la actualidad se hace con otros equipos de laboratorio como los colorímetros y los pHmetros.

Habrá de evaluarse en ensayos posteriores la razón por la cual uno de los sensores muestra mayores fluctuaciones que los otros dos, para el presente ensayo se señala que las condiciones de temperatura se mantuvieron estables y que los sensores permanecieron en total oscuridad por tanto puede suponerse que no han sido estos dos factores el origen de las fluctuaciones.

Puede suceder que una pequeña variación en uno de los componentes electrónicos (por ejemplo: pequeñas diferencias en los voltajes o las resistencias) desencadene variaciones significativas en el comportamiento macro. En el presente ensayo se procuró usar LED y LDR del mismo lote, no obstante los componentes con que

fueron fabricados los circuitos controladores son idénticos en referencia pero no en lote, por tanto, se recomienda realizar un análisis electrónico sobre los circuitos con el fin de estimar o descartar el origen de las variaciones observadas.

Se observó que al suministrar energía de una fuente regulada de voltaje los sensores de medida óptica arrojaron medidas con menores fluctuaciones, se recomienda usar este tipo de fuentes.

El comportamiento de la resina poliéster a los procesos de autoclavado fue estable, pero en configuraciones de paredes delgadas se observó termoelasticidad. En el primer diseño de tapa se presentaron constantes rupturas debido a las paredes delgadas, situación que solucionó aumentando el grosor de las mismas.

9. RECONOCIMIENTOS

El desarrollo de la investigación se realizó el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Antonio Nariño sede circunvalar (Bogotá), los equipos con que se contó se han descrito a lo largo del texto.

Además de los docentes directores y del grupo GRESIA de la UAN esta investigación contó con la valiosa asesoría y colaboración de los Ingenieros electrónicos Andrés Joaquin Valderrama con maestría en telecomunicaciones y Helbert Arturo López Amaris con maestría en electrónica de potencia, control y automatización.

10. BIBLIOGRAFÍA

[1] A. P. Carvalho, L. A. Meireles, and F. X. Malcata, “Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances.,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 6, pp. 1490–1506, 2006.

[2] M. Olaizola, “Commercial production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis using 25,000-liter outdoor photobioreactors,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 12, no. 3, pp. 499–506, Oct. 2000.

[3] H. Znad, G. Naderi, H. M. Ang, and M. O. Tade, “CO2 Biomitigation and Biofuel Production Using Microalgae: Photobioreactors Developments and Future Directions,” *Adv. Chem. Eng.*, 2012.
[4] J. C. Merchuk and X. Wu, “Modeling of photobioreactors: Application to bubble column simulation,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 15, no. 2–3, pp. 163–169, 2003.
[5] E. Molina Grima, J. A. Sánchez Pérez, F. García Camacho, J. L. García Sánchez, F. G. Acién Fernández, and D. López Alonso, “Outdoor culture of Isochrysis galbana ALII-4 in a closed tubular photobioreactor,” *J. Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 159–166, Sep. 1994.
[6] G. Vunjak-Novakovic, Y. Kim, X. Wu, I. Berzin, and J. C. Merchuk, “Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas: Mathematical Modeling and Pilot-Plant Studies,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 44, no. 16, pp. 6154–6163, Aug. 2005.
[7] I. Laing and E. Jones, “A turbidostat vessel for the continuous culture of marine microalgae,” *Aquac. Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 89–96, 1988.
[8] H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, and K. Miyashita, “Dietary Combination of Fucoxanthin and Fish Oil Attenuates the Weight Gain of White Adipose Tissue and Decreases Blood Glucose in Obese/Diabetic KK-A y Mice,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 19, pp. 7701–7706, Sep. 2007.
[9] L. Martin, “Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment,” *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 8, pp. 4784–4798, Jul. 2015.
[10] Y. Satomi, “Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid,” *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 4, pp. 1557–1562, Apr. 2017.
[11] E. Rodríguez, M. D. M. Gamboa, C. Quesada, and C. Rodríguez, *Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio*, 2da ed. Editorial de la Universidad de Costa Rica, 2016.
[12] M. A. Borowitzka, “Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters,” *Prog. Ind. Microbiol.*, 1999.
[13] E. Cohen and S. (Malis) Arad, “A closed system for outdoor cultivation of Porphyridium,” *Biomass*, vol. 18, no. 1, pp. 59–67, 1989.
[14] G. Torzillo, B. Pushparaj, F. Bocci, W. Balloni, R. Materassi, and G. Florenzano, “Production of Spirulina biomass in closed photobioreactors,” *Biomass*, vol. 11, no. 1, pp. 61–74, Jan. 1986.
[15] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae beats bioethanol,” *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 3, pp. 126–131, 2008.
[16] P. O., “Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 57, no. 3, pp. 287–293, Oct. 2001.
[17] A. P. Carvalho, L. A. Meireles, and F. X. Malcata, “Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances,” *Biotechnology Progress*. 2006.
[18] I. López and L. Borzacconi, *Introducción al Diseño de Reactores*. Universidad de la República, 2009.
[19] A. L. Quiroga, “Optimización del cultivo de Escherichia coli para la

producción de cutinasas recombinantes," 2010.
[20] H. S. Fogler, *Elements of Chemical Reaction Engineering*, 4th ed. Prentice Hall PTR, 2006.
[21] C. Santacruz, "Aplicación de modelos para la evaluación hidrodinámica de un sedimentador de alta tasa," Universidad Nacional Autónoma de Mexico, 2005.
[22] A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture*. 2003.
[23] E. Molina Grima, J. M. Fernández Sevilla, J. A. Sánchez Pérez, and F. García Camacho, "A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances," *J. Biotechnol.*, vol. 45, no. 1, pp. 59–69, 1996.
[24] S. J. Pirt, Y. K. Lee, M. R. Walach, M. W. Pirt, H. H. M. Balyuzi, and M. J. Bazin, "A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: Design and performance," *J. Chem. Technol. Biotechnol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 1, pp. 35–58, 1983.
[25] J. C. Ogbonna, T. Soejima, and H. Tanaka, "An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors," in *Marine Bioprocess Engineering*, vol. 35, R. Osinga, J. Tramper, J. G. Burgess, and R. H. Wijffels, Eds. Elsevier, 1999, pp. 289–297.
[26] L. F. Robinson, A. W. Morrison, and M. R. Bamforth, "Improvements relating to biosynthesis," EP19870308216, 1988.
[27] F. Espinosa-Chávez and F. Martínez-Jerónimo, "A laboratory-scale system for mass culture of freshwater microalgae in polyethylene bags," *J. Appl. Phycol.*, vol. 6, no. 4, pp. 423–425, 1994.
[28] P. Trotta, "A simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae," *Aquaculture*, vol. 22, pp. 383–387, Jan. 1981.
[29] M. Tredici and L. Rodolfi, "Reactor For Industrial Culture Of Photosynthetic Micro-organisms," 2004.
[30] T. Zhang, C. We, Y. Ren, C. Feng, and H. Wu, "Advances in airlift reactors: modified design and optimization of operation conditions," *Rev. Chem. Eng.*, vol. 33, no. 2, Jan. 2017.
[31] J. C. Merchuk and M. Gluz, "Bioreactors, Air-lift Reactors," *Encycl. Bioprocess Technol.*, pp. 320–394, 2002.
[32] J. L. C. López, *Producción de lovastatina a partir de Aspergillus terreus en un reactor de lecho fluidizado*. Editorial Universidad de Almería, 2005.
[33] J. F. García, V. L. García, and S. Santacoloma, *Diseño Industrial: Guia metodológica*. Asturias: Fundación Prodintec, 2006.
[34] E. B. Ibáñez, *La excelencia en el proceso de desarrollo de nuevos productos: un plan de innovación basado en la "ingeniería simultánea."* Barcelona: Gestión 2000, 1995.
[35] H. A. Ruíz-Leza, R. M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez-Herrera, J. C. Contreras-Esquivel, and C. N. Aguilar, "Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido (Bio-reactors desing for solid state fermentation)," 2007.
[36] B. Kelleher, C. Nori, K. Voll, K. Siddiquee, and M. Sha, "Evaluation of the BioFlo 320 Process Capabilities," p. 2014, 2014.
[37] A. Richmond, S. Boussiba, A. Vonshak, and R. Kopel, "A new tubular reactor

for mass production of microalgae outdoors," *J. Appl. Phycol.*, vol. 5, no. 3, pp. 327–332, Jun. 1993.
[38] A. Dos Santos, "Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos," Universidad Autónoma de Barcelona, 2007.
[39] G. Chini Zittelli, F. Lavista, A. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincenzini, and M. R. Tredici, "Production of eicosapentaenoic acid by Nannochloropsis sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors," *J. Biotechnol.*, vol. 70, no. 1–3, pp. 299–312, Apr. 1999.
[40] A. Sánchez Mirón, A. Contreras Gómez, F. García Camacho, E. Molina Grima, and Y. Chisti, "Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae," *J. Biotechnol.*, vol. 70, no. 1–3, pp. 249–270, Apr. 1999.
[41] M. Negroni, *Microbiología Estomatológica*. Ed. Médica Panamericana, 2009.
[42] J. L. Ingraham, O. Maaløe, and F. C. Neidhardt, *Growth of the bacterial cell*. Sinauer Associates, 1983.
[43] R. G. Pérez and M. C. V Peris, *Microbiología*. Thomson-Paraninfo, 1997.
[44] J. Ramírez Santos, G. Contreras Ferrat, and M. C. Gómez Eichelmann, "La fase estacionaria en la bacteria Escherichia coli," *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, no. 3–4, pp. 92–101, 2005.
[45] A. L. Quiroga, "Modelamiento del cultivo de E. coli para la optimización de la producción de cutinasas recombinantes : operación batch y fed-batch," Universidad de Chile, 2012.
[46] J. Monod, "The Growth of Bacterial Cultures," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 371–394, Oct. 1949.
[47] L. C. Reimer *et al.*, "BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis," *Nucleic Acids Research*, 26-Sep-2018. [Online]. Available: https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gky879/5106998.

11. ANEXOS

11.1. COTIZACIÓN BIOFLO120®

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-1

11.2. BARRIDO EN EL ESPECTRO PARA COLORANTE VERDE LIMÓN

Figura 45 Barrido en el espectro para el colorante verde limón

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-2

11.3. DATOS BARRIDO EN EL ESPECTRO PARA COLORANTE VERDE LIMÓN

Tabla 12 Datos barrido en el espectro para colorante verde limón.

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-2

11.4. CURVAS DE CALIBRACIÓN COLORANTE VERDE LIMÓN A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA EN ESPECTROFOTÓMETRO

Figura 46 Curvas de calibración a partir de soluciones seriadas de colorante a diferentes longitudes de onda

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-3

11.5. PRUEBA DE ESTABILIDAD DE SENSORES

Tabla 13 Datos prueba de estabilidad de sensores por 12 horas

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-4

11.6. DATOS ENSAYOS DE CRECIMIENTO *E.COLI MC4100*

Tabla 14 Primer ensayo de crecimiento

Tabla 15 Segundo ensayo de crecimiento

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-5

11.7. CURVA DE CALIBRACIÓN EN ESPECTROFOTÓMETRO DE *CHLORELLA SPP*

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-6

11.8. CURVAS DE COMPARACIÓN PARA *CHLORELLA SPP* ESPECTROFOTÓMETRO CONTRA LOS SENSORES DE MEDIDA ÓPTICA

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-7

11.9. DATOS ENSAYO DE TRAZADORES INYECCIÓN SUPERFICIAL

Tabla 16 Datos ensayo de trazadores inyección superficial

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-8

11.10. DATOS ENSAYO DE TRAZADORES INYECCIÓN EN PROFUNDIDAD

Tabla 17 Datos ensayo de trazadores inyección en profundidad

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-9

11.11. DATOS ENSAYOS DE CRECIMIENTO *CHLORELLA SPP*

Tabla 18 Primer ensayo de crecimiento

Conforme al formato de incorporación de documentos adoptado por el RIUT esta información se encuentra en la carpeta Anexos en el documento MarroquinFandiñoJorgeEduardoAnexo-10