

CONTADOR ÓPTICO DE CÉLULAS EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo técnico de la ingeniería y provee un dispositivo que comprende un sensor infrarrojo (IR) capaz de estimar la cantidad de células de microorganismos en medios de cultivo líquidos que de manera ventajosa realiza la estimación *in situ*, en tiempo real y sin necesidad de realizar tomas de muestras o detener el bioensayo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el campo técnico se han desarrollado diferentes sistemas y metodologías para facilitar la toma de muestras para conteo de células.

Por ejemplo, la patente US 9354155 B2 se refiere a un sistema automatizado que captura y analiza imágenes digitales obtenidas a partir de una muestra y que usa bajas concentraciones celulares. Sin embargo, este sistema requiere la toma de muestras y no permite realizar la estimación *in situ*.

La patente US 9535001 B2 se refiere a un sistema que calcula el número de células a partir de una imagen adquirida por una cámara, la cual se analiza en un computador. En este caso tal medición se hace *in situ*.

La patente US 9803170 B2, por su parte se refiere a un aparato de monitoreo para un cultivo celular, que consta de uno o más sensores IR y cámaras, una fuente de poder conectada a los sensores IR, un dispositivo de almacenamiento y de computo que

recibe y analiza la señal IR, y un transmisor que comunica la señal eléctrica con el dispositivo de computo, en donde, el aparato monitorea el patrón de calor producido en el cultivo celular.

Lidner et al., 2011¹, se refiere a un sistema de microscopia *in situ* con análisis de imágenes en tiempo real para monitorear la cantidad de células, morfología celular y distribución del tamaño celular. Los algoritmos de procesamiento de imágenes son ajustados para reconocer células de microalgas, porque cada tipo de células requiere un algoritmo específico.

No obstante, aún existe la necesidad de proveer un dispositivo que permita realizar una medida *in situ* y en tiempo real de la cantidad de células en el biorreactor, sin que sea necesario afectar las condiciones de reacción, que además permita su acople al biorreactor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente patente se entiende por "conteo" el método seguido para estimar el número de células presentes en un determinado volumen de cultivo y se expresa por células/μL.

Por "biorreactor" se entiende un contenedor que contiene las condiciones necesarias de nutrientes, temperatura, irradiancia, agitación y/o pH controladas para que bacterias, hongos y arqueas utilizadas en investigación puedan ser

¹ Lindner, P., Endres, C., Bluma, A., Höpfner, T., Glindkamp, A., Haake, C., Landgrebe, D., Riechers, D., Baumfalk, R., Hitzmann, B., Scheper, T., Reardon, K.F., 2011. Disposable sensor systems, in: Eibl, R., Eibl, D. (Eds.), *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. Wiley & Sons, pp. 67-81.

cultivadas en el laboratorio.

Por "tiempo real" se entiende aquel sistema que interactúa activamente con su entorno de acuerdo con un estímulo externo dentro de un tiempo especificado.

En la presente patente se entiende por "medio de cultivo" una solución o gel que contiene las condiciones necesarias de nutrientes para el cultivo de bacterias, hongos y arqueas.

En la presente patente se entiende por "*in situ*" realizar una medición continua en el biorreactor. Así, un dispositivo caracterizado por realizar la medición *in situ* evita la toma de muestras y su posterior conteo fuera de línea, así como detener el experimento y una menor contaminación.

Por "bioensayo" se entiende el proceso que permite establecer la eficacia de una sustancia o material a partir de la respuesta de un organismo. Algunos ejemplos de este tipo de sustancias son extractos, subfracciones, compuestos puros, medicamentos, hormonas, etc.

Las células de microorganismos como bacterias, hongos y arqueas utilizadas en investigación pueden ser cultivadas en el laboratorio en placas, microplacas, platos, incubadoras, biorreactores o fotobiorreactores, que contienen condiciones de nutrientes, temperatura, irradiancia y/o pH controladas.

Para determinar el grado de crecimiento de las células, éstas generalmente son monitoreadas visualmente por un humano, lo cual requiere operarios entrenados y también presenta un riesgo de contaminación para la muestra. Una desventaja adicional de

la toma de muestras de forma continua es la disminución del volumen de carga del reactor, lo que varía las condiciones al concentrar o disminuir los nutrientes presentes en el medio y demás características ligadas a la biomasa y el volumen de reacción. Adicionalmente, cuando las células requieren un ambiente anaeróbico estricto, inspeccionarlas visualmente implica exponerlas (aunque sea por un período de tiempo limitado) al aire, lo que puede retrasar su crecimiento o incluso causar su muerte.

Por lo tanto, existe la necesidad de proveer instrumentos que permitan realizar una medida *in situ* y en tiempo real de la cantidad de células en el biorreactor, sin afectar las condiciones de reacción o crecimiento.

Con el fin de atender tal necesidad, los inventores de la presente invención han diseñado un equipo que puede ser acoplado a biorreactores y que permite realizar la estimación celular *in situ*, en tiempo real y sin necesidad de realizar toma de muestras o detener el bioensayo.

A continuación, se describe la versión desarrollada por los inventores, no obstante, la protección no se limita a tales dimensiones, materiales o células mencionadas en los ejemplos.

El equipo de acuerdo con la presente invención es capaz de estimar la cantidad de células en medios de cultivo líquidos, y está diseñado para ser acoplado en biorreactores de superficies planas separadas hasta 5 cm.

La invención utiliza un sensor infrarrojo (IR) que permite estimar la cantidad de células que hay en un medio de cultivo

líquido, *in situ* y en tiempo real, por lo que no se requiere tomar muestras o detener el proceso para realizar la cuantificación celular. El sensor envía la señal a la tarjeta de adquisición de datos, la cual a su vez los envía al computador en el que se aloja el software.

El software procesa la señal y permite visualizarla y almacenarla en el computador, de tal manera que es posible consultar y graficar la información en el momento que se requiera y en línea. La conexión al computador permite monitorear todo el tiempo la información suministrada por el sensor y ver en tiempo real la evolución del crecimiento celular.

Estas características son convenientes en cuanto a que las tareas rutinarias de toma de muestras y datos pueden ser realizadas de forma automática, dando independencia al personal científico y permitiendo un monitoreo del proceso en todo momento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El dispositivo de acuerdo a la presente invención permite ejecutar los siguientes pasos:

1. Determinar la cantidad de células dentro del biorreactor (BR) de forma indirecta
2. Acondicionamiento electrónico de la señal obtenida por el sensor
3. Lectura de la señal eléctrica a través de una tarjeta de adquisición de datos
4. Conversión de la señal eléctrica a número de células

5. Visualización del dato por medio de una interfaz hombre-máquina (HMI) desarrollada a la medida

El dispositivo de acuerdo con la presente invención permite realizar la estimación *in situ* y en tiempo real, es portable, económico, de fácil instalación, y permite almacenar, visualizar y graficar los datos, gracias a la automatización del sistema, que permite la toma de datos de manera continua y en todo momento.

Adicionalmente, la novedad de la interfaz con el usuario le permite al usuario visualizar la información de la cantidad de células tanto en línea como fuera de línea.

La invención consta de hardware y software desarrollado a la medida.

El hardware (Fig. 1) que compone el dispositivo utiliza un sensor infrarrojo (IR) compuesto de emisor y receptor (1) ubicado en una agarradera cuadrada (2). Dicha agarradera se ubica sobre el biorreactor (BR), foto-biorreactor (FBR) o contenedor plano (3) en el que se encuentra el cultivo en medio líquido.

El contenedor (3) es plano con paredes (8) transparentes (policarbonato, acrílico o vidrio) de máximo 1 cm de espesor. Preferiblemente, las paredes del contenedor tienen menos de 1 cm espesor. La distancia entre las paredes puede ser de hasta 5 cm.

La agarradera (2) está fabricada en plástico, y tiene un área de 5 x 5 cm, aloja el sensor IR (1) y tiene un tornillo (9)

que le permite ajustarse al espesor del BR, FBR o contenedor plano (3).

El circuito electrónico (4) está conformado por: transistores, resistores, diodos, transformador, reguladores de voltaje, amplificador operacional, condensadores, y diodos emisores de luz (LED, light emitting diode). Este circuito entrega una señal de voltaje análoga que varía acorde a la cantidad de células estimadas.

Dicha señal de voltaje análoga suministrada por el circuito electrónico va a un dispositivo programable (5) que se conecta por puerto USB (6) al computador (10) en el que se aloja la parte principal del software desarrollado. La señal de voltaje análoga varía entre 0 y 10 V acorde a la cantidad de células detectadas en el medio de cultivo.

El dispositivo programable (5) tiene una salida que va al puerto USB (6) del computador (10). En el computador se aloja el software que almacena y manipula los datos obtenidos del dispositivo programable (5). Además, el software es la interfaz que permite la interacción entre el usuario y el computador (10).

Es importante garantizar: A) línea de vista entre el emisor y el receptor IR para no perturbar la señal de voltaje análoga (se debe evitar burbujeo en la línea de vista), y B) agitación homogénea del medio de cultivo sin perturbar la línea de medición.

Con la señal de voltaje obtenida, se realiza un procesamiento básico de la información. Esta información se prepara para ser

enviada al computador (10), haciendo uso del protocolo de comunicación previamente diseñado a través del puerto USB (6).

El software (7) fue desarrollado usando lenguaje de programación Java en el entorno NeatBeans y lenguaje de programación C++.

El computador (10) recibe la información través del puerto USB (6) al hacer uso de la librería de comunicación, esta permite que los datos sean accesibles para el programa principal.

El software (7) fue diseñado bajo la estructura programación orientada a objetos y hace uso de la arquitectura de software Modelo-Vista-Controlador. El programa principal (alojado en el computador) tiene implementada una función de escucha constante del puerto USB (6) para determinar si se ha enviado información a través de este, cuando detecta información válida con el protocolo de comunicación implementado y de esa manera si la información viene desde la tarjeta de adquisición de datos, el programa es capaz de comprenderla para poder realizar el procesamiento y visualización de ésta.

La visualización de la información se realiza a través de una interfaz hombre-máquina (HMI). En el diagrama de flujo mostrado en la Fig. 2, se muestra la secuencia de pasos del algoritmo programado, observándose que el software le permite al usuario ingresar los datos del experimento (nombre del investigador, microorganismo, ingresar ecuación de calibración o utilizar alguna ecuación ya almacenada. (Ver credenciales del sistema, Fig. 2)), visualizar la información correspondiente a la estimación de la cantidad de células que hay en el cultivo, y ver de forma gráfica la evolución del crecimiento celular.

Es posible aplicar esta tecnología a otras células, como bacterias, hongos y arqueas.

EJEMPLO 1.

MEDICIÓN DE BIOMASA EN CULTIVO DE MICROALGAS

La microalga *Acutodesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus* UTEX 393) fue inoculada a 1.00×10^4 cel/mL en un medio modificado Bold 3N de acuerdo a los protocolos establecidos por UTEX. El medio contiene en g/L: NaNO_3 , 0.75; K_2HPO_4 , 0.075; KH_2PO_4 , 0.175; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025; NaCl , 0.025. Las microalgas fueron cultivadas en presencia de CO_2 y aire.

El experimento fue desarrollado en un biorreactor plano de 25 cm de alto x 25 cm de ancho x 5 cm de profundidad, con volumen de crecimiento de 2.5 L. El sistema fue controlado para mantener una temperatura de 25°C , burbujeo de aire y de CO_2 constante, pH 6.7, ciclos luz-oscuridad 18:6 y 24:0. El tiempo de cultivo fue 235 horas (9.8 días).

La Fig. 3 muestra en tiempo real la cantidad de células por mL obtenidas en el biorreactor, la cual fue realizada cada hora utilizando el contador óptico de células presentado en esta solicitud de patente, previa calibración del contador utilizando esta microalga.

Como puede verse en la gráfica, hay tres fases de crecimiento, la primera es una fase lack en la cual ocurre la adaptación de la microalga a las condiciones de crecimiento previamente establecidas (0 h -100 h); la segunda fase es exponencial, en la cual se da la proliferación celular por el aumento de la

tasa de crecimiento (μ), el cual permite estimar el crecimiento celular (101 h - 175 h); finalmente, la tercera fase es estacionaria, en la cual, se ha alcanzado el $\mu_{\max}$ (176 h- 185 h) debido a que se han consumido todos los nutrientes presentes en el medio de cultivo. Adicionalmente, se observa una fase de muerte celular (186 h- 235 h) debido a la falta de nutrientes y cantidad de células en el medio.

Adicionalmente, se desarrollaron dos etapas complementarias: La primera fue el proceso de extracción de los lípidos mediante el uso de microondas, utilizando una mezcla ternaria de solventes y la segunda la trans-esterificación de los lípidos obtenidos para obtener los ésteres metílicos, los cuales fueron analizados mediante FTIR y GC-MS para identificar el perfil de ácidos grasos.

El dispositivo de acuerdo a la presente invención está siendo ajustado con cultivos de microalgas. Se continuará haciendo experimentación en cultivos cerrados de microalgas para continuar con el ajuste respectivo que permita darle más precisión a la estimación de células. Para lo anterior, se deben realizar conteos adicionales con cámara de Neubauer y comparar el resultado con lo que indica la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema del equipo de conteo de células

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso llevado a cabo por el equipo de acuerdo a la presente invención.

Figura 3. Figura que representa la cantidad de células por mL en tiempo real obtenidas en el biorreactor

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de medición de biomasa en un reactor caracterizado porque comprende un sensor infrarrojo (IR) compuesto de emisor y receptor (1) ubicado en una agarradera cuadrada (2) la cual agarradera cuadrada (2) se ubica sobre el biorreactor (BR), foto-biorreactor (FBR) o contenedor plano (3) en el que se encuentra el cultivo en medio líquido.
2. El dispositivo de la reivindicación 1 caracterizado porque además comprende un contenedor (3) con paredes (8) transparentes.
3. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2 en donde la agarradera (2) se caracteriza por estar fabricada en plástico, un sensor IR (1) y un tornillo (9) de ajustarse al espesor del BR, FBR o contenedor plano (3).
4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque comprende un circuito electrónico (4) conformado por: transistores, resistores, diodos, transformador, reguladores de voltaje, amplificador operacional, condensadores, y diodos emisores de luz (LED, light emitting diode) en donde dicho circuito electrónico (4) suministra una señal de voltaje análoga.
5. El dispositivo de la reivindicación 4 caracterizado porque la señal de voltaje análoga va a un dispositivo programable (5) que se conecta por puerto USB (6) al computador en el que se aloja la parte principal del

software desarrollado

6. El dispositivo de la reivindicación 5 caracterizado porque el dispositivo programable (5) comprende una salida que va al puerto USB (6) del computador.
7. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 caracterizado porque ejecuta los siguientes pasos:
 - a. Sensar la cantidad de células dentro del BR de forma indirecta
 - b. Acondicionar electrónicamente de la señal obtenida por el sensor
 - c. Leer la señal eléctrica a través de una tarjeta de adquisición de datos
 - d. Convertir la señal eléctrica a número de células
 - e. Visualizar el dato por medio de una interfaz hombre-máquina desarrollada a la medida

RESUMEN DE LA INVENCION

Un dispositivo útil para realizar la estimación celular *in situ* y en tiempo real de un cultivo de células como bacterias, hongos y arqueas sin afectar las condiciones de reacción o crecimiento.

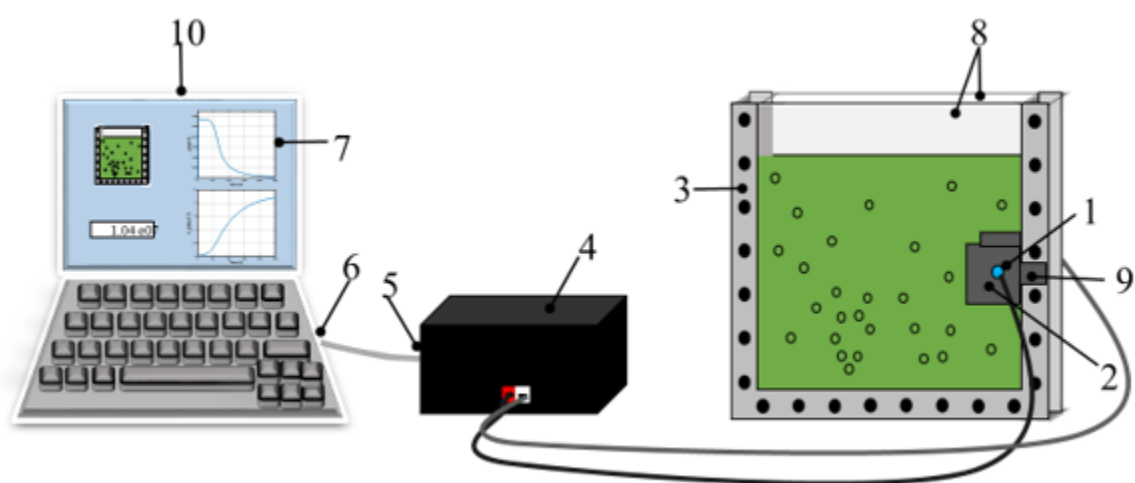


FIG. 1

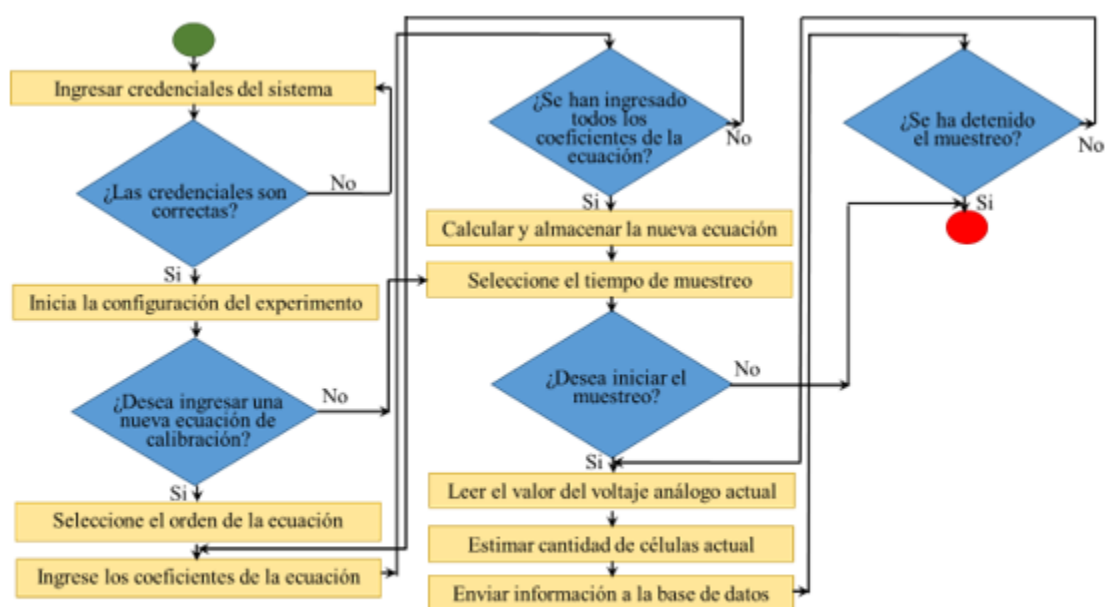


FIG. 2

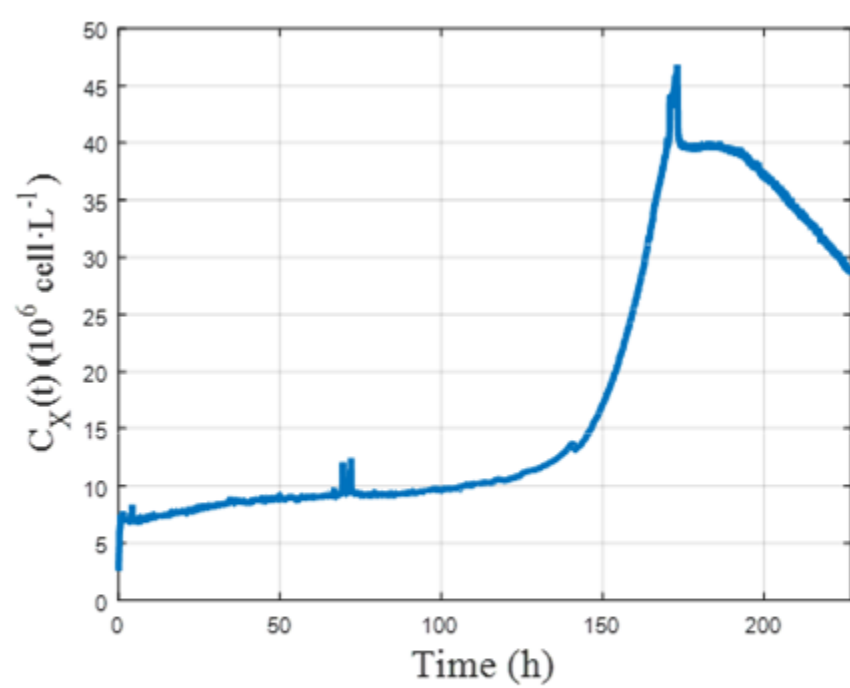


FIG. 3