



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño

GRADO EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA INDUSTRIAL Y AUTOMÁTICA

CONTROL DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS EN MINI-TURBIDOSTATOS

AUTOR: FERNANDO NÓBEL SANTOS NAVARRO

TUTOR: JESÚS ANDRÉS PICÓ I MARCO

ENRIC PICÓ I MARCO

JULIO - 2016

ÍNDICE

PARTE I MEMORIA	7
1. INTRODUCCIÓN	7
Antecedentes y Motivación	7
Objetivo.....	9
Alcance	10
Resumen.....	9
Perspectivas de Futuro.....	10
2. ESTADO DEL ARTE	11
Tipos de cultivos continuos.....	11
Quimiostatos.....	11
Turbidostatos	12
Comparación y Selección	12
Qué es un Turbidostato.....	12
Limitaciones	13
3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN HARDWARE DEL SISTEMA.....	15
Unidades Funcionales del Sistema	15
Estructura física.....	16
Sistema Electrónico.....	17
SISTEMA DE ALIMENTACIÓN DEL CULTIVO.....	25
4. CONTROL DEL TURBIDOSTATO.....	28
Modelado	28
Diseño del Observador.....	29
Diseño del Control.....	31
5. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN SOFTWARE DEL SISTEMA.....	34
Programa de Arduino	34
Interfaz en Matlab.....	37
6. RESULTADOS	43
Ensamblaje final del turbidostato	43
Repetibilidad de la medidas	44
Estabilidad de los sensores	48
Pruebas de calibrado.....	49
Pruebas de crecimiento bacteriano	54

Observador.....	57
Control.....	60
7. NORMATIVA	63
8. ANEXO	66
Comunicación serial con la bomba de jeringa	66
Comunicación serial con Arduino	67
9. BIBLIOGRAFÍA.....	68
PARTE II PLANOS	70
1. PLANOS.....	70
Introducción.....	70
2.....	71
3.....	71
PARTE III PRESUPUESTO.....	72
1. PRESUPUESTO	72
Introducción.....	72
Costes Parciales.....	72
Coste Total	75

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 - Esquema de funcionamiento global del turbidosato	13
Ilustración 2 - Cámara porta vasija.....	16
Ilustración 3 - Detalle de la cámara porta vasija	16
Ilustración 4 - Soporte para motor.....	17
Ilustración 5 - Soporte para imanes	17
Ilustración 6 - Gráfico relación absorbancia y concentración celular	18
Ilustración 7 - Principio de funcionamiento de medición de densidad óptica	20
Ilustración 8 - Circuito de conexión eléctrica para el TSL235	23
Ilustración 9 - Circuito de conexión eléctrica del motor paso a paso	24
Ilustración 10 - Bomba de jeringa NE-1000	25
Ilustración 11 - Bomba de aire aPUMP	26
Ilustración 12 - Tapón de silicona	27
Ilustración 13- Relación entre sustrato y tasa de crecimiento	28
Ilustración 14 - Interfaz programa Matlab.....	38
Ilustración 15 - Panel Conexión Arduino.....	38
Ilustración 16 - Panel Conexión Arduino con lista de puertos COM.....	38
Ilustración 17 - Detalle desplegable panel de conexión Arduino	39
Ilustración 18 - Panel Conexión Bomba	39
Ilustración 19 - Panel de opciones del temporizador	40
Ilustración 20 - Panel opciones de control.....	40
Ilustración 21 - Panel opciones de simulación	41
Ilustración 22 - Panel opciones de simulación activo	41
Ilustración 23 - Panel de calibrado.....	41
Ilustración 24 - Panel de opciones para guardar datos.....	42
Ilustración 25 - Cámara de cultivo	43
Ilustración 26 - Montaje final del turbidostato.....	44
Ilustración 27 - Gráfico medidas sensor 1 rotando el tubo de cultivo.....	45
Ilustración 28- Gráfico medidas sensor 2 rotando el tubo de cultivo.....	45
Ilustración 29 - Tabla resultados de medir rotando el tubo	45
Ilustración 30- Gráfico medidas sensor 1 rotando y recolocando el tubo de cultivo	46
Ilustración 31- Gráfico medidas sensor 2 rotando y recolocando el tubo de cultivo	46
Ilustración 32- Tabla resultados de medir rotando y recolocando el tubo.....	46
Ilustración 33 - Gráfico medidas sensor 1 sin mover el tubo de cultivo.....	47
Ilustración 34 - Gráfico medidas sensor 2 sin mover el tubo de cultivo	47
Ilustración 35 - Tabla resultados de medir sin mover el tubo	47
Ilustración 36 – Estabilidad del sensor 1 a lo largo del tiempo.....	48
Ilustración 37 - Estabilidad del sensor 2 a lo largo del tiempo	49
Ilustración 38 - Tabla resultados de la prueba de estabilidad	49
Ilustración 39 - Prueba calibrado mediante filtros ópticos.....	50
Ilustración 40 - Primer experimento de calibrado usando bacterias.....	51
Ilustración 41 - Segundo experimento de calibrado usando bacterias.....	52
Ilustración 42 - Fusión de resultados de ambos experimentos	52
Ilustración 43 - Eliminación de datos anómalos	53
Ilustración 44 - Calibrado final de OD	53

Ilustración 45 - Prueba de crecimiento bacteriano durante 1.2 horas.....	54
Ilustración 46 - Prueba crecimiento bacteriano durante 24 horas.....	55
Ilustración 47 - Medidas sensor 1 durante la prueba de crecimiento bacteriano durante 24 horas.....	56
Ilustración 48 - Medidas sensor 2 durante la prueba de crecimiento bacteriano durante 24 horas.....	56
Ilustración 49 - Tabla análisis medidas sensor 2 durante el desarrollo de la prueba de 24 horas.....	56
Ilustración 50 - Simulación del observador.....	58
Ilustración 51 - Datos de densidad óptica utilizados para el observador.....	59
Ilustración 52 - Observador trabajando con datos reales.....	59
Ilustración 53 - Reajuste de los parámetros y su efecto en el observador.....	60
Ilustración 54 - Simulación control proporcional.....	61
Ilustración 55 - Simulación control adaptativo.....	62

PARTE I MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN

Antecedentes y Motivación

El futuro económico de Europa descansa en gran medida en la denominada bioeconomía: la producción de recursos biológicos renovables y su conversión en alimentos, productos y bioenergía por medio del uso innovador y eficiente de tecnologías derivadas de la biotecnología industrial.

Las empresas industriales orientadas hacia esta economía hacen uso intensivo de microorganismos mejorados o modificados como fábricas celulares para producir metabolitos especializados de alto valor añadido (p. ej. aminoácidos, vitaminas y aditivos para alimentación, biofuel, biofilms y tejidos), siendo estos de capital importancia para el futuro de las industrias de la salud, química, alimentaria y otras industrias de proceso.

A efectos de maximizar el rendimiento y productividad de los bioprocesos, la biotecnología industrial actual ha de hacer frente a problemas críticos, como son el modelado, la estimación de variables clave, y el diseño de mecanismos de actuación (control) sobre el estado metabólico de los microorganismos.

Para realizar las tareas de caracterización, ampliación a escala y producción, se necesitan biorreactores de diferentes tamaños. Por lo tanto, el control por retroalimentación de biorreactores ha recibido mucha atención en los últimos años. Sin embargo, el control de biorreactores, especialmente en entornos industriales, es difícil debido a características de los procesos biológicos: (i) la falta de conocimiento sobre las variables claves del sistema, las cuales representan el estado fisiológico del cultivo, (ii) alta complejidad, derivada de la multitud de componentes existentes en un proceso, la dinámica del proceso no lineal, y (iii) gran variabilidad.

Dos ideas clave para abordar el diseño basado en modelos de controladores en este contexto son el uso de modelos simples basados en el balance de masas, y el desarrollo de unos controladores genéricos y robustos basados en el concepto de modelo mínimo.

Por un lado, los modelos basados de balance de masas limitan la incertidumbre en términos específicos; la cinética de la biorreacción, y los rendimientos de la biorreacción.

Por otro lado, los controladores robustos basados en modelos mínimos usan la estructura de los balances de masa en el biorreactor e información genérica sobre la estructura de la cinética asociada y sus cotas.

Las biorreacciones se pueden realizar en batch, fedbatch, o modo continuo. En el último caso, el volumen de cultivo dentro del biorreactor se mantiene constante mediante el establecimiento de la tasa de flujo de entrada igual a la tasa de flujo de salida. En biorreacciones continuas se tiene un mayor riesgo de contaminación y de mutación celular, esto ha favorecido el uso de

biorreactores tipo fedbatch. Dejando a las biorreacciones continuas para procesos que usen microorganismos con alta estabilidad frente a mutación.

Sin embargo, las biorreacciones continuas tienen algunas ventajas, como el aumento de la productividad de biomasa y de productos asociados al crecimiento celular, o la posibilidad de analizar los cultivos en condiciones específicas en estado estacionario.

Existen dos tipos de biorreactores continuos que se utilizan principalmente: los quimiostatos y los turbidostatos. En los quimiostatos, la velocidad a la que se añade medio fresco se controla de manera que se mantenga una tasa de crecimiento del microorganismo deseada.

En los últimos años, los turbidostatos de pequeña escala, que usan un circuito de realimentación para mantener constante la densidad celular, están empezando a estar disponibles en los laboratorios para realizar caracterización y escalado de sistemas biológicos sin restricciones de nutrientes. De esta forma, los turbidostatos son una herramienta prometedora para ser utilizada como paso intermedio entre el laboratorio y el biorreactor industrial.

En el marco de un proyecto anterior realizado en el Synthetic Biology and Biosystems Control Lab (SB2CL) del Instituto ai2 se desarrolló la estructura mecánica (el cuerpo) de un mini-biorreactor.

En este proyecto, se parte de la mencionada estructura mecánica y se tratará el problema de la medida y control de la concentración para la aplicación del mini-reactor como un turbidostato.

Resumen

A efectos de maximizar el rendimiento y productividad de los bioprocesos, la biotecnología industrial actual ha de hacer frente a problemas críticos, como son el modelado, la estimación de variables clave, y el diseño de mecanismos de actuación (control) sobre el estado metabólico de los microorganismos.

En los últimos años, los turbidostatos de pequeña escala, que usan un circuito de realimentación para mantener constante la densidad celular, están empezando a estar disponibles en los laboratorios para realizar caracterización y escalado de sistemas biológicos sin restricciones de nutrientes. De esta forma, los turbidostatos son una herramienta prometedora para ser utilizada como paso intermedio entre el laboratorio y el biorreactor industrial.

En el presente proyecto se ha diseñado e implementado un turbidostato, centrándose el proyecto en los aspectos de medida de concentración de biomasa, estimación de la tasa específica de crecimiento, y uso de ambos para el control en bucle cerrado de la concentración de biomasa. Además, se han conseguido realizar experimentos físicos probando su funcionamiento.

La tarea de construir un turbidostato es un proceso complejo que combina muchas ramas del conocimiento: biología, electrónica, teoría de control y óptica.

En primer lugar, se ha diseñado e implementado un sensor óptico de concentración de biomasa basado en medida de absorbancia. Este sensor óptico está compuesto por un módulo laser y dos fotodiodos colocados estratégicamente para poder medir la pérdida de intensidad del haz láser al atravesar el cultivo.

En segundo lugar, se ha tratado el problema de control en bucle cerrado de la concentración de biomasa a partir de medidas de la misma. Cabe destacar que el modelo matemático de un turbidostato es no-lineal y existen parámetros que no se pueden determinar. El control adaptativo no lineal implementado utiliza un modelo mínimo del proceso, pero, por contra, requiere la medida de la tasa específica de crecimiento del microorganismo. Esta señal no puede medirse directamente, por lo que se ha implementado un observador para su estimación. Se ha utilizado un observador discreto deslizante de segundo orden, que asegura convergencia de las estimaciones en tiempo finito, al mismo tiempo que estimaciones suaves.

Por otro lado, se ha desarrollado un programa en Matlab que permite la monitorización y control del estado del turbidostato. También se ha añadido un simulador para facilitar las tareas de diseño del controlador.

PLABRAS CLAVE: turbidostato, control no lineal, biorreactores, densidad óptica y observador deslizante.

Objetivo

El objetivo del presente proyecto es el diseño y la implementación, tanto hardware como software, de un sistema de cultivo continuo que sea capaz de controlar la concentración celular en un medio determinado a través de la turbidez.

Alcance

El alcance del proyecto consistirá en las siguientes partes:

Implementar el diseño mecánico proporcionado por el ai2.

Diseñar e implementar el sistema electrónico que permita el correcto funcionamiento del turbidostato. Esto incluye la sensorización de la concentración de biomasa, el agitador magnético y la programación del microcontrolador. Este microcontrolador deberá de ser capaz de comunicarse con un ordenador.

Diseñar e implementar un sistema de alimentación de medio fresco para el cultivo. Además, deberá mantener constante el volumen de cultivo. Este sistema deberá de poder ser accionado a través de un ordenador.

Diseñar e implementar el control del turbidostato. Este control incluirá el diseño de un observador para estimar la tasa de crecimiento. Este control deberá de ser implementado en un programa de ordenador, permitiendo que se pueda comunicar con el microcontrolador y el sistema de alimentación de cultivo.

Por último, se deberá realizar una prueba de funcionamiento global de sistema.

Perspectivas de Futuro

El diseño que se ha realizado en este proyecto solo permite la utilización de una cámara de cultivo. Pero debido a la naturaleza lenta de los procesos biológicos, sería una buena opción disponer de varias cámaras de cultivo trabajando en paralelo. Para ello, se podría utilizar una válvula de distribución que permita conmutar la acción de la bomba de jeringa entre los diferentes cultivos.

De esta forma se podría aumentar la cantidad de cultivos que se pueden realizar a la vez, evitando tener que utilizar distintas bombas para cada uno de ellos. Como se verá más adelante, la bomba de jeringa es un componente caro, por lo que poder utilizar una para muchos cultivos supondrá un ahorro económico considerable.

También sería interesante añadir un control de temperatura al sistema. Esto es debido a que los microorganismos crecen más rápido o lento dependiendo de la temperatura. Por lo que se podría conseguir una mejora en el tiempo de establecimiento del turbidostato. Por otro lado, podría ser de interés poder realizar pruebas para observar la influencia de la temperatura en microorganismos.

Por otro lado, se pretende utilizar este turbidostato para realizar pruebas en el laboratorio de biología del ai2. Sin duda, será de gran utilidad para los investigadores. Esta es una de las

razones que por la cual se ha realizado la interfaz en Matlab, para terceras personas puedan utilizarlo.

Actualmente, en el ai2 se está desarrollando una nueva ley de control no lineal adaptativa para turbidostato. Esta ley se ha probado de forma simulada y es más robusta y consigue estabilizar al turbidostato en un menor tiempo que el resto de leyes de controles. Esta ley de control es la que se ha implementado en el proyecto. Por tanto, este proyecto podrá verificar en futuros experimentos la validez de esta nueva ley de control.

2. ESTADO DEL ARTE

Tipos de cultivos continuos

El cultivo continuo es una técnica que permite estudiar el efecto en el proceso biológico de variables como el pH, la temperatura, la concentración de nutrientes, etc., manteniendo constante el valor de la tasa de crecimiento específica de los microorganismos, o bien, fijados los anteriores efectos, analizar el efecto de la tasa de crecimiento sobre el proceso.

De esta forma se puede separar los distintos efectos, para finalmente, obtener información que permita mejorar el proceso biológico u obtener modelos matemáticos más exactos.

El principio de funcionamiento de estos sistemas es el siguiente:

Se dispone de un volumen constante de cultivo. En este cultivo será donde los microorganismos residirán. Existe un flujo de medio fresco que alimenta el cultivo de forma continua, consiguiendo de esta forma un aporte de sustrato para que los microorganismos puedan crecer.

Debido a que el volumen de cultivo debe permanecer constante, también existe un flujo de salida de cultivo antiguo. En este flujo de salida eliminará los residuos generados, sin embargo, también extraerá parte de los microorganismos.

De esta forma, estableciendo un flujo constante, el sistema tenderá a estabilizarse en una tasa de crecimiento específica.

Dentro de los cultivos continuos, se pueden destacar el quimiostato y el turbidostato, siendo estos los más representativos.

Quimiostatos

Un quimiostato es un tipo de biorreactor en el cual se añade medio fresco de forma continua, a la misma velocidad que se elimina el medio del cultivo antiguo. El líquido que se extrae posee nutrientes, metabolitos e incluso parte de los microorganismos del cultivo. Ajustado la velocidad con la que se añade medio fresco, se puede ajustar la tasa de crecimiento específica del microorganismo dentro de unos límites.

Si se aumenta la velocidad de flujo, se produce un lavado de cultivo, con medio fresco; mientras que, si se disminuye, la inanición (o falta de nutrientes) provoca el fallecimiento de bacterias. Es decir, se puede controlar de modo independiente la densidad de población celular y la velocidad de crecimiento del cultivo. La primera se controla modificando el factor de dilución

cuando está en régimen permanente, y la segunda se controla ajustando la concentración de nutriente limitante en la cámara.

Los quimiostatos trabajan mejor para tasas de dilución pequeñas, en este caso es cuando se da una mayor estabilidad.

Turbidostatos

Un turbidostato es un dispositivo controlado por realimentación. Este dispositivo mide la densidad poblacional de células en el medio de cultivo. Mediante el control de un sistema de actuadores, un turbidostato es capaz de mantener una concentración celular bacteriana determinada de manera continua. En este tipo de cultivos, la velocidad de crecimiento viene determinada por la concentración bacteriana, a diferencia del quimiostato, donde venía fijada por la velocidad de flujo, o tasa de dilución.

En los turbidostatos, la máxima estabilidad se consigue a velocidades de dilución altas, donde se producen grandes cambios en la concentración celular, es decir, en la biomasa, como consecuencia de la variación en la velocidad de dilución. Por lo tanto, los turbidostatos son ideales para la caracterización de sistemas biológicos sin limitación de nutrientes, que es cuando se desarrolla la máxima velocidad de crecimiento celular.

Además de mantener una concentración de células constante, la cantidad de sustrato, en régimen permanente, para cultivos continuos, permanece a niveles muy bajos de concentración. Esto es especialmente útil, por ejemplo, en estudios de regulación metabólica de sustrato limitante, así como en muchos otros.

Comparación y Selección

Se ha decidido realizar la construcción de un turbidostato. La principal razón es que en un quimiostato es un requisito conocer la concentración de sustrato existente en el cultivo, pues se utiliza para ajustar la velocidad de crecimiento de microorganismos en el medio.

La determinación de la concentración de sustrato no es un proceso trivial, con lleva realizar experimentos mucho más difíciles y caros que medir la concentración celular en el caso del turbidostato.

Además, un turbidostato es un sistema realimentado, que permite realizar un control sobre el mismo en función de la concentración celular. De esta forma se pueden atenuar errores de medida o de modelado.

Por tanto, el dispositivo seleccionado para su construcción es un Turbidostato.

Qué es un Turbidostato

Un Turbidostato es un dispositivo mecatrónico controlado por realimentación que mantiene una densidad de población celular constante en un volumen de control.

La cámara de cultivo está sensorizada, y permite realizar medidas de forma periódica del estado de la concentración de biomasa en su interior.

Según la concentración actual de biomasa se aplicará una tasa de dilución. La tasa de dilución se traduce a un flujo de medio fresco que depende del volumen de control.

El flujo es generado por la acción de una bomba de jeringa. Se eliminará el volumen de cultivo sobrante por la acción de una bomba de aire.

Una visión general del sistema completo se puede observar en la siguiente ilustración:

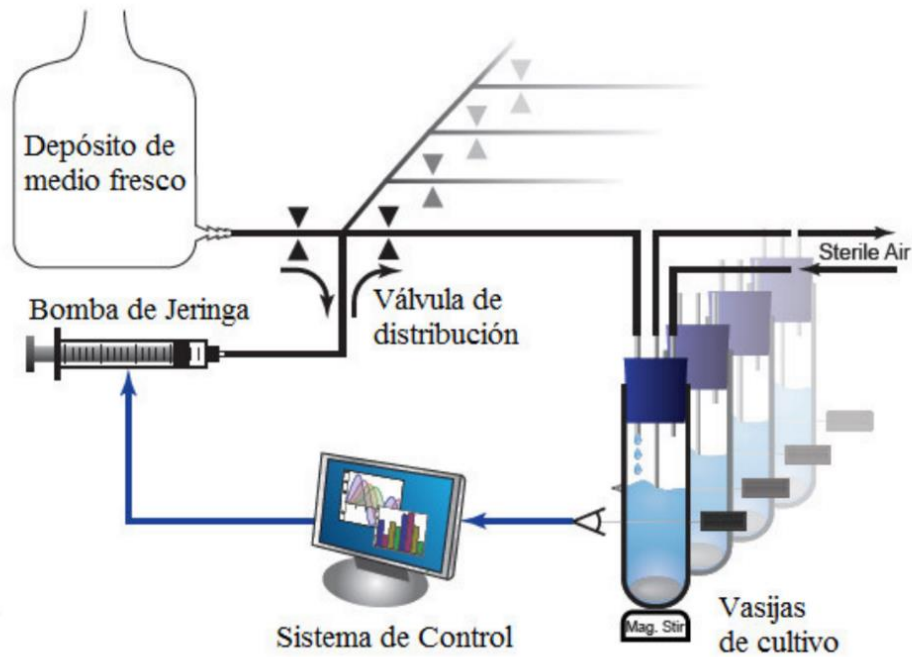


Ilustración 1 - Esquema de funcionamiento global del turbidostato

Limitaciones

En la actualidad existen biorreactores comerciales, pero estos no están enfocados a investigación. Por tanto, estos tienden a ser demasiado grandes y tienen software protegido que imposibilita su modificación. Además, estos biorreactores necesitan grandes cantidades de volumen para mantener las tasas de dilución y son excesivamente caros.

Algunos investigadores se decantan por diseñar por ellos mismos sus propios sistemas de cultivo continuo, los cuales varían notablemente entre ellos, según las necesidades del investigador. Esto lleva muchas veces a sistemas rígidos y poco robustos, debido a la complejidad de los sistemas de cultivo continuo.

En el caso de los turbidostatos, este hecho se acentúa aún más, debido a la necesidad de aplicar conceptos especializados de ingeniería electrónica y de control.

En cuanto a las limitaciones de medición de los parámetros característicos de un medio microbiano, se puede decir que son elevadas.

No se puede realizar mediciones de la cantidad de biomasa directamente, por tanto, se tiene que utilizar la relación existente entre densidad óptica y biomasa. Esta relación varía para cada tipo de microorganismo.

Por lo que típicamente se trabaja con densidades ópticas sin llegar a calcular la concentración de biomasa. Se puede hacer este cambio, debido a que, en definitiva, la densidad óptica es una medida de la concentración de biomasa.

La medición de concentración de sustrato queda totalmente descartada. Ya que, no existe ningún método que pueda medirla de forma on-line. Existen en la actualidad métodos para determinar la concentración de sustrato de forma off-line, pero estos no nos interesan ya que, en el turbidostato será necesario realizar un control de forma periódica. Además, estos procesos de medición son lentos y caros.

Por lo que es un parámetro al que no se tendrá acceso para efectuar el control.

La tasa de crecimiento tampoco se puede medir, pero esta sí que se puede estimar a partir de la evolución temporal de la concentración de biomasa (o usando la densidad óptica). En este proyecto se usará un observador deslizante de segundo orden que asegura converger en tiempo finito al valor real de tasa de crecimiento.

3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN HARDWARE DEL SISTEMA

Unidades Funcionales del Sistema

Un turbidostato está compuesto por las siguientes partes funcionales:

- Estructura física
- Sistema electrónico
- Sistema de alimentación del cultivo
- Sistema de control

Se procederá a continuación a realizar una breve descripción de cada una de las unidades funcionales del sistema. En esta se expondrá la función que desempeña y los problemas principales que se deberán resolver.

Estructura física:

La estructura física del turbidostato influirá en gran medida en el comportamiento final. Esto es debido a que la estructura deberá proporcionar una buena sujeción a los sensores y además deberá protegerlos de la luz exterior, para asegurar una medida sin ruido.

Sistema electrónico:

El sistema electrónico engloba todos los componentes electrónicos que se utilizan en el proyecto. La tarea más importante es la sensorización de la concentración celular. Ya que, disponer de unas medidas exactas facilitará la tarea de control. También se deberá de mantener homogéneo el cultivo, por lo que será necesario implementar un agitador magnético.

Se utilizará un microcontrolador para manejar los componentes electrónicos. Por último, el microcontrolador deberá poder comunicarse con el ordenador, que será el sistema de control, para pasarle la información de los sensores.

Sistema de alimentación del cultivo:

En este sistema realizará la tarea de alimentar al cultivo con medio fresco. Por otro lado, también se encargará de mantener constante el volumen de cultivo dentro de la cámara del turbidostato.

Sistema de control:

Este sistema se encargará de calcular la tasa de dilución necesaria para alcanzar a la referencia de concentración de biomasa. Estará implementado por un programa en Matlab. Este programa se ejecutará en un ordenador y se comunicará con los demás componentes a través del microcontrolador. También podrá comunicarse directamente con el sistema de alimentación de cultivo para enviar la acción de control calculada.

Por último, el programa en Matlab permitirá monitorizar el estado del turbidostato y permitirá tomar decisiones de alto nivel, como elegir el tipo de control, ajustar valores de referencia o guardar los datos del experimento.

Estructura física

Cámara porta-vasija

La cámara actúa como soporte para la vasija de vidrio, así como para la placa de medición de la biomasa. Tiene ranuras donde se insertarán los sensores de luz que medirán la intensidad recibida por parte del emisor de luz.

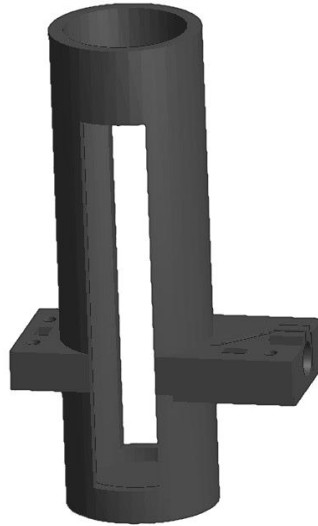


Ilustración 2 - Cámara porta vasija

Tiene un agujero pasante a través del voladizo, por el cual pasará el haz del láser emisor de luz



Ilustración 3 - Detalle de la cámara porta vasija

Soporte para motores

Se le adjuntará un soporte para el motor paso a paso, el cual moverá el agitador magnético del medio de cultivo, como se ha explicado anteriormente. El soporte para imanes (Véase apartado siguiente), se coloca en el interior de la pieza mostrada en la Ilustración 3.12, con los imanes colocados en su interior. El motor se colocará en la base de dicho elemento y será

atornillado a los agujeros roscados de los extremos. Si éstos no estuvieran roscados posteriormente a su impresión, se roscarían manualmente, con la herramienta adecuada. El ensamblaje de estos tres elementos se coloca en la base del soporte de la vasija de vidrio.

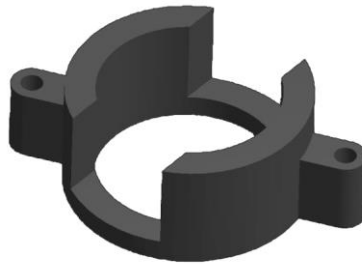


Ilustración 4 - Soporte para motor

Soporte para imanes

Se colocarán dos imanes en el soporte para imanes. Este elemento se insertará en el eje del motor paso a paso, que cuando gire, moverá las barritas de imanes colocadas en el cultivo, provocando agitación en el medio.

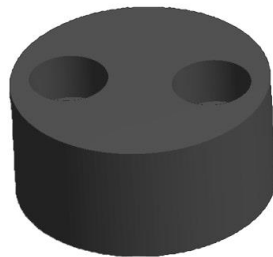


Ilustración 5 - Soporte para imanes

Sistema Electrónico

Microcontrolador

Será necesario la utilización de un microcontrolador que maneje todos los componentes electrónicos del sistema y que se comunique con el ordenador.

Un microcontrolador es un circuito integrado programable que ejecuta las órdenes que tiene almacenadas en su memoria. Existen gran diversidad de microcontroladores, por ejemplo, PIC, Arduino o ARM.

Para este proyecto se ha tenido en cuenta las siguientes características para elegir qué microcontrolador utilizar.

Debido a la naturaleza de prototipo del proyecto, es recomendable usar un microcontrolador que facilite las operaciones de debug (corrección de errores de programación). Además, se necesita que pueda manejar como mínimo dos entradas de interrupciones externas debido al tipo de sensores que se van a utilizar, esto se explicará en más profundidad en el apartado de captación de potencia lumínica.

También deberá de poder comunicarse a través del puerto COM de ordenador.

Por tanto, teniendo en cuenta estas necesidades se ha elegido el microcontrolador Arduino UNO.

Arduino es un microcontrolador de código abierto, fácil de usar tanto a nivel de hardware y software. Es ampliamente utilizado para realizar prototipos o incluso proyectos de ingeniería. Existe una gran cantidad de información en Internet, lo cual hace que sea una buena plataforma para desarrollar proyectos.

Arduino Uno, dispone de un regulador de tensión y puede ser alimentado vía USB. Se usará el propio regulador de tensión de Arduino para alimentar a los demás componentes electrónicos.

Se deberán tener en cuenta son que Arduino Uno tiene una tensión de trabajo de +5 V. Esto será crucial para el uso de los demás componentes electrónicos.

Relación de la Espectrofotometría con la Biomasa

La finalidad de medir la densidad óptica del cultivo es estimar la cantidad de bacterias presentes en éste. Existe una relación entre la densidad óptica y la concentración de bacterias, esta relación varía según el tipo de bacteria, debido a parámetros como: el tamaño de la bacteria o su densidad.

Esta relación entre densidad óptica y concentración celular deja de ser lineal para cantidades grandes de células (más de 10^7 cels/ml). Normalmente se trabajará con concentraciones celulares inferiores a este límite por lo que no supondrá un problema, y se podrá suponer que existe una relación proporcional entre densidad óptica y concentración celular.

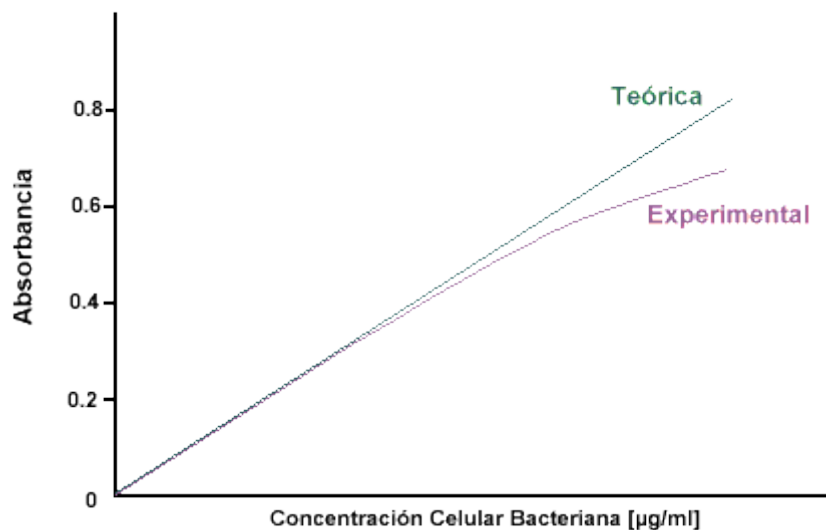


Ilustración 6 - Gráfico relación absorbancia y concentración celular

En bibliografía especializada existen datos experimentales que permiten determinar esta relación.

Más adelante, en el apartado de control del turbidostato, se comprobará que no será necesario calcular la concentración de biomasa. Se podrá utilizar directamente el valor de

densidad óptica para realizar el control, fijando como referencia a alcanzar un valor de densidad óptica.

Medición de densidad óptica

La densidad óptica es una magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda específica. Cuanto mayor sea la densidad óptica de una sustancia, más difícil será que un haz de luz atraviese a la misma.

Se calcula de la siguiente forma:

$$DO = \frac{1}{L} \cdot \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Siendo:

L : grosor de la muestra medido en cm.

I_0 : Intensidad del rayo que atraviesa a la muestra.

I : Intensidad del rayo sin que atraviese a la muestra.

En los espectrofotómetros comerciales, L , está normalizado a 1 centímetro. En el presente proyecto, L coincidirá con el diámetro interior del tubo de cultivo (1.5 centímetros).

Además, en los espectrofotómetros es necesario realizar una calibración antes de realizar una medida de densidad óptica. Esta calibración se realiza para evitar el error de pérdida de intensidad debido a la interacción de la cubeta o el solvente. Para evitar este error se hace una primera medida con una solución de referencia ("blanco"), que contenga todos los componentes que influyen en la medida, menos el que se pretende medir.

Posteriormente todas las medias que se realicen, se harán referidas a esta medida inicial. Este proceso se denomina comúnmente con "fijar el blanco".

Este proceso se traduce en que, para medir densidad óptica, será necesario realizar una medida inicial para determinar el valor de I . En esta medida inicial, sólo se colocará el tubo de cultivo con el medio fresco que se vaya a utilizar para hacer crecer a las bacterias. Este valor se guardará y se hará referencia a él en las futuras medidas. De forma que se puede estimar con gran exactitud cuánta intensidad se ha perdido al atravesar el cultivo con bacterias.

Este parámetro es de vital importancia, ya que todas las medidas dependen de este. Este parámetro puede variar de forma significativa, haciendo que el sistema mida de forma errónea. Esta variación es debida a diversos factores, se explicarán a continuación, de mayor a menor influencia, estos factores y cómo prevenir su efecto.

El primer factor es el tubo de cultivo de vidrio. Normalmente se utilizan cubetas cuadradas y siempre se colocan orientadas de la misma forma para medir. Esto se hace, porque cada cara de la cubeta, debido a que no es perfecta, tiene una refracción óptica distinta. El problema es que en el caso del turbidostato, el tubo es cilíndrico. Por tanto, cuando se manipula el tubo de vidrio, es difícil mantener la orientación inicial. Se probó en el laboratorio a realizar pequeños giros para observar su influencia en la medida y resultó ser nefasta, obteniendo desviaciones en la medida superiores al 50%. La solución es que una vez que se haya insertado el tubo de vidrio, evitar toda manipulación una vez que se haya realizado el calibrado.

Se ha tenido en consideración que en el futuro puede que sea necesario realizar alguna manipulación del turbidostato mientras esté en funcionamiento. Por tanto, se probó a marcar el tubo de vidrio con una línea negra, de esta forma sí que se podía mantener la orientación del tubo de vidrio. En este caso, se probó a mover el tubo y a reorientarlo, obteniendo una desviación de 3% en las medidas. Se redujo notablemente la desviación, por tanto, usando esta técnica se puede manipular el tubo del turbidostato, no obstante, es conveniente evitar toda manipulación para asegurar una medida correcta

El segundo factor es la influencia de la luz exterior. A pesar de que se ha aislado los sensores, la luz sigue afectando a las medidas. Por tanto, lo que se ha propuesto es reducir la abertura que existe en el porta-vasijas, ya que esta es muy grande. En los biorreactores comerciales, existen una rendija para poder observar el interior directamente, pero estas en relación con el tamaño son mucho más pequeñas que la que se tiene con el diseño actual. Por tanto, la solución es evitar en la medida de lo posible variaciones en la luz ambiental, cubriendo el turbidostato con una caja, por ejemplo. Aun así, sería recomendable en el próximo diseño reducir aún más el tamaño de las rendijas para evitar este efecto. Se han realizado pruebas, y manteniendo una luz ambiental estable sí que se pueden realizar medidas con un alto nivel de repetitividad.

El último factor que influye es el calentamiento de los sensores y el módulo láser. A pesar que se eligió un módulo láser que ofreciera una potencia lumínica de salida estable, existe un periodo de calentamiento en el que la potencia de salida varía. Es recomendable esperar que el láser trabaje en el estado estacionario para realizar medidas más robustas. Se han realizado pruebas y típicamente las medidas tardan en estabilizarse por la acción del calentamiento, unos treinta segundos. La solución es activar el láser un minuto antes de cuando se requiera realizar una medida, esto no suponen ningún problema ya que el tiempo de muestreo típico es de 3 minutos. Otra solución sería mantener el láser siempre encendido, el inconveniente es que de esta forma la vida útil del láser se reduciría. Por otra parte, puede que someter a las bacterias a radiación constante afecte al desarrollo de las mismas.

Aparte de estas consideraciones para evitar que I varíe durante el desarrollo de una prueba se ha diseñado un sistema para estimar su valor de forma online.

Este consiste en tener un segundo sensor, al que le llegará una fracción de la potencia lumínica emitida. Disponiendo de este valor se podrá estimar la potencia lumínica que se está emitiendo en el instante.

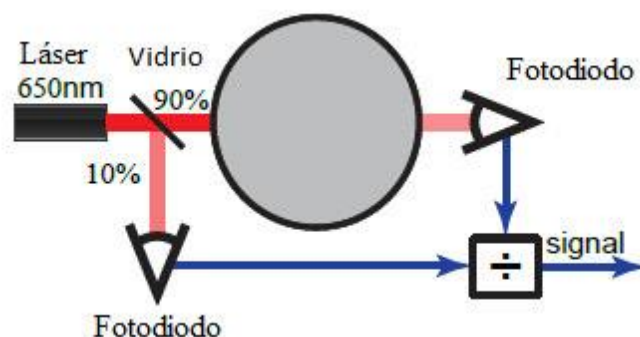


Ilustración 7 - Principio de funcionamiento de medición de densidad óptica

El haz láser se refracta en dos debido a la existencia de una placa de vidrio orientada a 45 grados. La mayor parte de la potencia lumínica emitida atravesará la placa de vidrio, llegando al

tubo de cultivo. El resto de la potencia lumínica será reflejado directamente sin pasar por el cultivo.

La relación, entre la cantidad de potencia que atraviesa y la que es reflejada, se calculará a partir del calibrado realizado inicialmente.

Finalmente, una vez obtenida esta relación, a través de la medida de los dos sensores podremos determinar I_o e I , obteniendo de esta forma la densidad óptica.

Emisión de Potencia Lumínica

Para poder medir la densidad óptica en el turbidostato es necesario disponer de una fuente de radiación. Existen varios componentes que pueden cumplir esta función, como: diodos LED o lámparas halógenas.

El objetivo de emitir una radiación es poder cuantificar cuánta potencia lumínica se pierde al atravesar el cultivo.

Por tanto, será necesario una fuente emisora de relativa potencia para poder observar este fenómeno. Por supuesto, no deberá comprometer la integridad de los demás componentes del turbidostato, como pueden ser las piezas de impresión en tres dimensiones o incluso el propio cultivo de bacterias.

Además, deberá disponer de una gran precisión y estabilidad. Esto es debido a que el turbidostato trabajará de forma continua durante largos periodos de tiempo (llegando a trabajar durante días incluso).

Considerando estas dos necesidades, tanto potencia y precisión, se tomó la decisión de utilizar un módulo láser. Concretamente se utilizó el VLM-650-03-LPA.

Un módulo láser está compuesto por diferentes componentes.

El primero es un diodo láser cuya función es la de generar la emisión. El diodo emite a 650 nm de longitud de onda (λ), con una potencia de 1mW. Se eligió esta longitud de onda porque es visible por el ojo humano, lo cual facilitará su correcta instalación y detección de errores. La potencia elegida cumple con el objetivo de emisión sin ser demasiado grande como para provocar saturaciones en los sensores.

El segundo componente es una lente que concentra toda la potencia lumínica en un punto, obteniendo de esta forma el haz láser. El punto láser generado tendrá un diámetro de 6 ± 1 mm a una distancia de cinco metros según especificaciones del fabricante. Es necesario tener un haz concentrado debido a que se tendrá que reflejar el haz en dos sensores distintos para poder calcular la densidad óptica del cultivo. Esto se explica en más profundidad en el apartado de captación lumínica.

Y el último componente es una etapa de potencia permitirá que la potencia de salida del láser sea constante y segura. El módulo láser necesita ser alimentado entre +2.6 V y +5 V, demandando como máximo 50 mA.

En el funcionamiento del turbidostato, el láser deberá estar encendido cuando se requiera realizar una medida, por tanto, el módulo láser deberá de ser controlable a través del microcontrolador Arduino.

Debido a que el Arduino deberá controlar varios componentes electrónicos (sensores y motores) se ha considerado usar un transistor BC547 para reducir la demanda de intensidad a la que serán sometidas las salidas digitales. Este transistor trabajará en saturación y el circuito será alimentado a +5 V que proporciona el Arduino. Debido a la caída de tensión entre el emisor y el colector (+0.6 V como máximo) la tensión con la que se alimentará al módulo láser será de +4.4 V cumpliendo con las especificaciones de alimentación.

Captación de Potencia Lumínica

En este apartado se tratará todo lo relacionado con la captación de potencia lumínica, cuya finalidad será en última instancia determinar la cantidad de biomasa en el cultivo a través de la absorbancia medida.

Existen diversos sensores que reaccionan a la luz, como los fotodiodos o los LDR (light dependent resistor). Se ha optado por utilizar fotodiodos debido a que son sensibles a un rango pequeño de longitudes de onda.

La longitud de onda que se eligió para el emisor de potencia lumínica es de 650 nm. Por tanto, el sensor que se elija deberá tener máxima sensibilidad en esta longitud de onda y rechazar, en la medida de lo posible, la influencia de otras.

Debido a que se está utilizando una longitud de onda que está dentro de la radiación solar, será indispensable mantener a los fotodiodos aislados de la luz exterior. Por esta razón, los dos sensores se encuentran dentro de la estructura del turbidostato, reduciendo al máximo la entrada de luz exterior.

Dentro de los fotodiodos comerciales, existen de diferentes tipos: fotodiodos luz-a-frecuencia, fotodiodos luz-a-corriente, fotodiodos luz-a-voltaje, etcétera. Inicialmente se eligió el fotodiodo TSL253R.

El sensor TSL253 es un fotodiodo luz-a-voltaje de alta sensibilidad alrededor de 650nm de longitud de onda (λ). Trabaja adecuadamente ante alimentaciones entre [2,7 V-5,5 V], con lo que no necesita de un circuito de adaptación de alimentación, y, además, lleva su propio circuito integrado de amplificación de señal, lo que la respuesta medida puede ser directamente traducida a irradiancia incidente.

Sin embargo, cuando se implementó en físico, el sensor siempre saturaba. Esto es debido a que la potencia lumínica que emite el módulo láser es superior a la que es capaz de medir el fotodiodo. La irradiancia máxima que puede medir el TSL253 es de unos 90 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Por tanto, se eligió un nuevo fotodiodo, cuyo valor máximo de medida fuese superior.

Se eligió el sensor TSL235, se trata de un fotodiodo luz-a-frecuencia con características similares al anteriormente usado. Sin embargo, el sensor TSL235 es capaz de medir irradiancia de 1000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

El circuito implementado en su montaje es el siguiente:

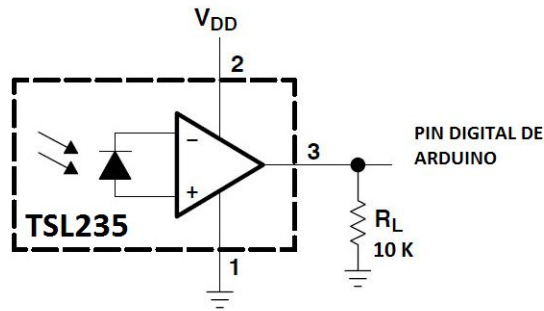


Ilustración 8 - Circuito de conexión eléctrica para el TSL235

El sensor convierte la luz a frecuencia, por tanto, es necesario ser capaz de medir esta frecuencia a través del microcontrolador. Para ello, se ha implementado una rutina de interrupciones que se encarga de contar los pulsos que produce el sensor durante un determinado tiempo.

Esta metodología tiene dos principales problemas.

El primero es que se necesita tener en el microcontrolador entradas digitales que se puedan asociar a una interrupción. En este proyecto se está usando Arduino, y este sólo posee dos entradas de interrupciones. Por tanto, solo se pueden usar dos de estos sensores. En microcontroladores más potentes esto deja de ser un problema ya que permiten usar más entradas digitales como interrupciones.

El segundo problema es que medir frecuencia genera gran cantidad de interrupciones en frecuencias altas. Todos los microcontroladores tienen una capacidad máxima de procesamiento, por tanto, si superamos ese límite, el microcontrolador se quedará paralizado mientras que la fuente de interrupciones siga activa.

Este último problema no ha aparecido usando el sensor TSL235, pero aún así genera demasiadas interrupciones que pueden llegar a afectar el funcionamiento de otras tareas.

La solución a este problema sería utilizar un divisor de frecuencia. Por ejemplo, se podría utilizar un contador de 8 bits. En este caso, la señal del fotodiodo se usaría como la señal de reloj para el contador. De esta forma se reduciría en 256 veces la frecuencia del fotodiodo.

Agitador Magnético

Será necesario mantener una mezcla homogénea en el cultivo de bacterias para que las medidas que se realicen sean representativas del cultivo en su totalidad.

Se ha añadido un agitador magnético en la base de la cámara del turbidostato. Este agitador se ha diseñado mediante impresión en tres dimensiones y será movido a través de un motor paso a paso.

Se colocará una barra magnética dentro del medio de cultivo, y esta tenderá a seguir el movimiento circular del agitador magnético, ya que este posee dos imanes orientados con distinta polaridad. El movimiento de la barra magnética provocará que el líquido dentro de la vasija de vidrio se mezcle.

Se ha utilizado un motor paso a paso debido a su precisión. Un motor paso a paso permite programar su velocidad sin la necesidad de una realimentación. Esto supone una ventaja frente a motores de continua, que sí que necesitan de una realimentación para controlar la velocidad.

Los motores paso a paso no alcanzan velocidades angulares elevadas, pero esto no supone un problema ya que el agitador se deberá mover a velocidades bajas (unos 60 rpm). Por otro lado, se deberá evitar velocidades angulares grandes, ya que provocarán que la barra magnética sea incapaz de seguir al agitador magnético.

El motor seleccionado ha sido el 26M048B1U. Se trata de un motor paso a paso que se puede alimentar a +5 V, lo cual facilitará el diseño del circuito de electrónico ya que todos los componentes electrónicos se alimentan a esa misma tensión.

La intensidad que circulará a través del motor es superior a la que Arduino es capaz de ofrecer por sus pines digitales. Por tanto, será necesario utilizar un circuito intermedio que se encargue de manejar la potencia del motor. Este circuito es comúnmente denominado como “driver”, y permitirá convertir las señales eléctricas de baja potencia del Arduino, en señales eléctricas con suficiente potencia para actuar sobre el motor paso a paso.

Se ha seleccionado el circuito integrado ULN2003a como driver de motor. Este circuito es ampliamente utilizado en aplicaciones industriales para mover motores paso a paso de hasta +12 V.

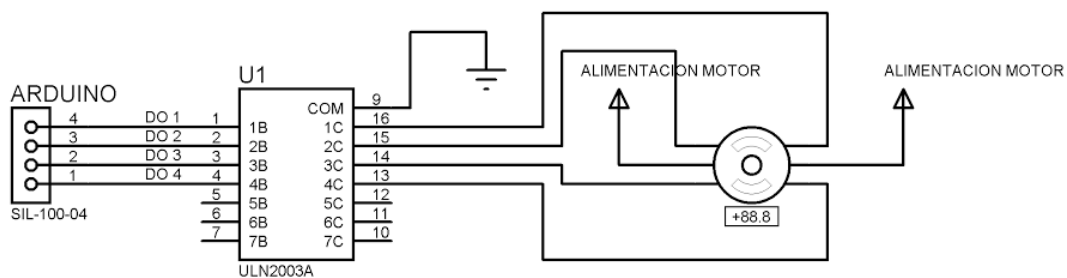


Ilustración 9 - Circuito de conexión eléctrica del motor paso a paso

Placa de medición de biomasa

En este apartado se diseñará la placa de medición de biomasa. La función de esta placa será la de sujetar a los sensores en la posición correcta y también será donde se colocará todos los componentes electrónicos a excepción del microcontrolador Arduino y el motor paso a paso.

Esta placa dispondrá de un agujero que coincidirá con el diámetro exterior de la vasija porta cultivos. De esta forma se podrá colocar la placa justo encima del soporte y quedará fija.

Inicialmente se propuso realizar esta placa en una placa perforada de todos de fibra de vidrio. Normalmente se utilizan estas placas para realizar prototipos, ya que es un proceso menos elaborado que la fabricación de una placa de circuito impreso.

Se implementó la placa de medición de biomasa y se comprobó que toda la electrónica funcionaba correctamente.

Sistema de alimentación del cultivo

Bomba de Jeringa

Las bombas de jeringa son utilizadas normalmente para fines médicos. En estos casos se encargan de suministrar de forma intravenosa al paciente líquidos, tales como antibióticos, anestesia o medicamentos. Las bombas de jeringa están diseñadas para trabajar con volúmenes pequeños (50mL) y disponen de una gran exactitud, consiguiendo ajuste de flujo de 0.5 a 10 mL/h.

En el presente proyecto, su función será la de suministrar medio fresco a los cultivos de bacterias. Las características más importantes son que la bomba sea capaz de trabajar con volúmenes pequeños (1mL) y que ejerza la suficiente presión para mover el medio fresco a través del circuito.

Se propuso inicialmente fabricar una bomba de jeringa mediante impresión 3D. Con esta propuesta se conseguiría reducir el coste del proyecto ya que las bombas de jeringas comerciales cuestan sobre 700 a 1000 euros.

Debido a que en el laboratorio ya se disponía de una bomba de jeringa se decidió finalmente usar esta bomba comercial. Pero en el futuro, esta bomba de jeringa podrá ser sustituida por una más económica.

El modelo de bomba que se ha utilizado es el NE-1000. Este modelo permite suministrar flujos desde 0.73 μ L/h (jeringa de 1 mL) hasta 2100mL/h (jeringa de 60mL). Dispone de comunicación serie RS-232. Se explicará en el Anexo 1, el protocolo de comunicación serial con la bomba de jeringa.



Ilustración 10 - Bomba de jeringa NE-1000

Bomba de Aire

La bomba de aire cumplirá una doble función en el turbidostato.

La primera será la de suministrar oxígeno al cultivo de bacterias. Se ha de tener en consideración que se tendrá que utilizar aire esterilizado para evitar posibles contaminaciones en el cultivo bacteriano. El aire esterilizado se puede obtener haciendo pasar el aire por un filtro.

El objetivo de utilizar aire estéril es evitar que se introduzcan bacterias presentes en el aire dentro de la cámara de cultivo.

Por otro lado, también permitirá mantener constante el volumen en el tubo de cultivo del turbidostato. Esto se explica más afondo en el apartado de tapón para el cultivo.

Las características que se tuvieron en cuenta en la selección de la bomba de aire fueron: potencia y ruido. Es necesaria una bomba que sea capaz de mover el líquido por el circuito de alimentación de cultivo, pero esta potencia no deberá ser demasiado excesiva como para poner en peligro la integridad propia del circuito de alimentación.

El turbidostato deberá permanecer encendido durante largos períodos, además este se encontrará típicamente en un laboratorio donde habrá más gente trabajando. Por tanto, es recomendable reducir al máximo el ruido que generará el turbidostato, para evitar contaminación acústica dentro del propio laboratorio.

Se ha seleccionado la bomba aPUMP, se trata de una bomba diseñada para airear acuarios de peces de hasta 100 litros. Las características más destacables de esta bomba son su pequeño tamaño, bajo consumo (1.5W) y es silenciosa (el ruido que genera es inferior a 35 dB). La presión de aire que genera es la adecuada para cumplir su función en el turbidostato. Por último, la bomba se tiene su propia fuente de alimentación por tanto permite ser alimentada directamente de la red eléctrica.



Ilustración 11 - Bomba de aire aPUMP

Tapón para el cultivo

El tapón del turbidostato posee tres tubos, siendo uno de ellos 2 centímetros más largo que los otros dos. Los tubos cortos se usarán para introducir aire y medio fresco, y el tubo más largo se permitirá que el aire salga al exterior, permitiendo de esta forma la aireación del cultivo.

Según se vaya alimentando el cultivo con medio fresco, el nivel de líquido en el tubo de cultivo subirá. Cuando este nivel llegue a la altura del tubo largo, el aire no podrá circular hacia al exterior. Por tanto, el aire ejercerá una presión que empujará el líquido de cultivo por el tubo largo hasta que el aire pueda volver a circular con normalidad, manteniendo de esta forma el volumen constante en el tubo de cultivo.

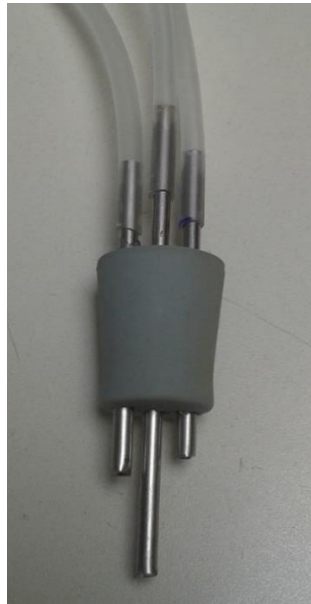


Ilustración 12 - Tapón de silicona

4. CONTROL DEL TURBIDOSTATO

Modelado

En problemas de control, tener un modelo del sistema que se pretende controlar es de vital importancia. Ya que de esta forma se llega a entender mejor cuales son las causas de su comportamiento.

Además, tener un modelo del sistema permite realizar simulaciones para observar cómo afecta cada parámetro al comportamiento global.

Por último, permite reducir en gran medida la cantidad de pruebas físicas que se deben realizar (ya que se pueden hacer de forma simulada), esto se traduce en un ahorro en el coste de diseño.

Un turbidostato es un sistema de cultivo continuo, en el cual unos microorganismos crecen dentro de un cultivo debido a la existencia de un sustrato que utilizan de alimento. Es un sistema de cultivo continuo debido a que existe un flujo de medio fresco y un flujo de salida que es igual al de entrada. De esta forma se mantiene un volumen constante de cultivo.

Conforme los microorganismos crecen, la cantidad sustrato va disminuyendo. Existe una relación de rendimiento entre el crecimiento de microorganismos y el consumo de sustrato.

Además, existe una relación entre la cantidad de sustrato y la tasa de crecimiento, esta puede ser de dos tipos: monod o haldane.

En el caso de la monod, al aumentar la cantidad de sustrato se aumenta la tasa de crecimiento. Pero en el caso de la haldane, un aumento excesivo del sustrato puede provocar que se vuelva tóxico para los microorganismos, haciendo que se reduzca la tasa de crecimiento.

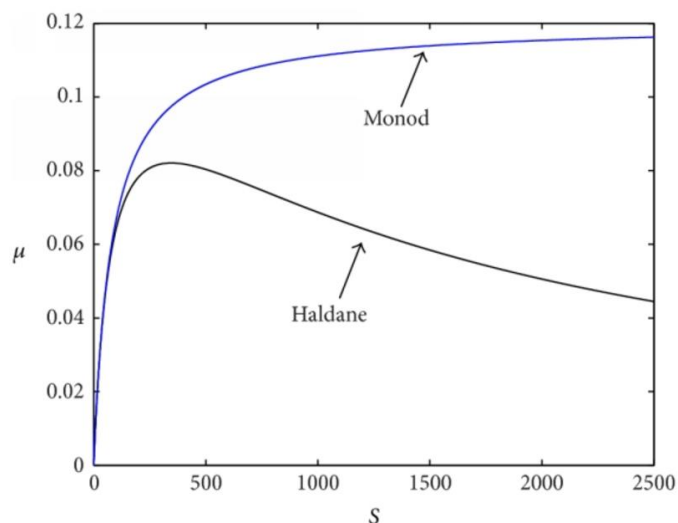


Ilustración 13- Relación entre sustrato y tasa de crecimiento

El flujo de entrada se normaliza en función del volumen de cultivo dando lugar a la tasa de dilución.

Las ecuaciones matemáticas que representan el modelo del turbidostato son las siguientes:

$$\begin{aligned}\dot{x} &= \mu(x, s)x - Dx \\ \dot{s} &= -y \cdot \mu(x, s)s + D(s_i - s) \\ D &= \frac{F}{V}\end{aligned}$$

Donde:

x : concentración de microorganismos

s : concentración de sustrato

s_i : concentración del sustrato en el medio fresco

V : volumen del turbidostato

D : tasa de dilución

F : flujo

$\mu(x, s)$: tasa de crecimiento específica. Esta función depende casi exclusivamente de s .

y : rendimiento, cantidad de sustrato para producir una unidad de biomateria.

En este modelo, se puede observar que al aplicar una tasa de dilución (D) superior a cero, se traduce en una disminución instantánea de la cantidad de microorganismos. Esto es debido a que cuando se introduce medio fresco, también se extrae esa misma cantidad líquido de cultivo, llevándose este último, microorganismos con él.

Por tanto, el incremento de cantidad de microorganismos es debido exclusivamente a la tasa de crecimiento.

Por último cabe destacar que se trata de un modelo no-lineal debido a que aparece el término $\mu(x, s)x$. Por esta razón, no se podrá aplicar estrategias de control clásicas como el lugar de las raíces o la transformada de Laplace. Este hecho se traducirá en un aumento de la complejidad del control de forma significativa.

Diseño del Observador

En esta sección se explicará todo lo relacionado con el observador.

Un observador es una herramienta matemática cuya utilidad es estimar variables que son difíciles de medir. Pueden ser difíciles de medir por dos razones. La primera es que no exista ningún (o no se tenga acceso) sensor que sea capaz de medir esa variable física. La segunda causa es que esa variable sea medible, pero exista ruido o perturbaciones que dificulten su correcta sensorización.

La idea de funcionamiento de un observador consiste en que mediante las señales de entrada y de salida del sistema, se puede estimar el estado de sistema.

En este proyecto las variables de interés para poder aplicar el control son la concentración de bacterias y la tasa de crecimiento.

La concentración de bacterias en el cultivo se puede calcular a través de la densidad óptica. La tasa de crecimiento no se puede medir directamente. Por tanto, el observador que se ha diseñado permitirá estimar el valor de la tasa de crecimiento.

La tasa de crecimiento es afectada por la evolución de la concentración de bacterias y el flujo que se esté aplicando en el turbidostato. Estos dos parámetros serán los que se utilicen como entrada para el observador.

Existen diversos tipos de observadores, pero en este caso se ha tomado la decisión de usar un observador discreto deslizante de segundo orden.

Este observador asegura convergencia de la variable estimada en tiempo finito, además es robusto frente a incertidumbres del modelo y parámetros, debido a que el observador está basado en las mínimas suposiciones en dinámicas de bioprocesos.

Las ecuaciones que forman este observador son las siguientes:

$$\begin{aligned} \dot{z}_1 &= (-D + pz_2 + 2p\beta|\sigma|^2 \text{sign}(\sigma))z_1 \\ \dot{z}_2 &= \alpha \text{sign}(\sigma) \\ \sigma &= p^{-1} \ln\left(\frac{x}{z_1}\right) \\ \hat{\mu} &= pz_2 \end{aligned}$$

Donde z_1 es la biomasa estimada y $\hat{\mu}$ es la tasa de crecimiento estimada.

Donde α , β y p son parámetros que se pueden ajustar para configurar la dinámica del observador. El parámetro p limita derivada máxima de la tasa de crecimiento.

En el ajuste de los valores de estos parámetros se ha de tener un compromiso entre sensibilidad y convergencia. La sensibilidad consiste en con qué exactitud se conseguirá estimar el valor de la tasa de crecimiento. Y la convergencia consiste en cuánto tardará el observador en estabilizarse. Hasta que el observador no se estabilice, todos los valores que proporcione serán erróneos.

Sin embargo, el parámetro más significativo será p . Valores de p pequeños darán lugar a sensibilidades altas, pero tendrá convergencias lentas. Sin embargo, valores elevados de p resultará en una convergencia más rápida, pero se obtendrá una estimación con menor exactitud y además será más sensible al ruido.

El ajuste de estos parámetros resulta finalmente en un proceso iterativo donde se va variando el valor de cada uno de ellos hasta que se obtiene un comportamiento adecuado.

Debido a la naturaleza de los procesos biológicos, los observadores pueden llegar a tardar horas hasta llegar a converger en un valor. Por tanto, en el ajuste de los parámetros se deberá de tener en cuenta que una hora de tiempo de convergencia es un resultado aceptable.

Cuando se pretende realizar un control de un turbidostato se necesita el valor de la tasa de crecimiento. Por tanto, hasta que no se estabilice el observador no se podría controlar el turbidostato. Lo que se hace en la práctica es controlar el turbidostato en bucle abierto durante

una o dos horas, y una vez que el observador se ha estabilizado se pasa a realizar control en bucle cerrado.

El último aspecto que se debe destacar sobre el observador es la inicialización del estado del propio observador. El estado inicial consiste en la información con de la que parte del observador para empezar a estimar.

Por tanto, si se elige un estado inicial más próximo al que tiene el propio turbidostato, el tiempo de convergencia será menor que si se parte de un punto más alejado. Existen dos valores que se deben inicializar, z_1 y z_2 .

El parámetro z_1 es la concentración bacteriana directamente, por tanto, se puede inicializar este parámetro al valor inicial de concentración bacteriana.

El segundo, z_2 , tiene relación proporcional con la tasa de crecimiento, pero debido a que no se sabe a priori cual es la tasa de crecimiento inicial del sistema se inicializa este valor en cero.

Diseño del Control

En este apartado se tratará todos los aspectos relacionados con el control del turbidostato. El objetivo del control es mantener la concentración de bacterias en el valor deseado.

Para ello se tiene el valor de la densidad óptica del cultivo, que es un parámetro relacionado con la concentración celular, y la tasa de crecimiento obtenida a través del observador. Estos dos parámetros serán la entrada para todos los controladores que se utilizarán. Por otro lado, el flujo de medio fresco será la acción de control que permitirá controlar al sistema.

La acción de control que se calculará con será D y corresponde al flujo normalizado con el volumen de la cámara del turbidostato.

$$D = \frac{F}{V}$$

Donde:

D : tasa de dilución

F : flujo de medio fresco

V : volumen de la cámara de cultivo

Al introducir medio fresco dentro de la cámara del turbidostato, provocará un aumento del volumen del cultivo. Pero debido a la acción de la bomba de aire, se extraerá líquido hasta volver al volumen inicial. Por tanto, al añadir medio fresco permitirá la introducción de sustrato, necesario para que las bacterias se desarrollen, pero también parte de las bacterias serán expulsadas al extraer el volumen sobrante.

A la hora de diseñar un controlador se ha de tener en cuenta que cumpla con dos condiciones: “no-wash out” y “no-bach”.

La condición de “no-wash out” se aplica en concentraciones de biomasa muy pequeñas. En esta situación, si se aplica una acción de control superior a la tasa de crecimiento, lo que se conseguirá será reducir la concentración celular, hasta llegar al extremo de hacerla cero. Esto

significa que no habrá ninguna bacteria en el cultivo por lo que será físicamente imposible salir de este estado.

La condición de “no-bach” se da cuando deja de haber sustrato en la cámara del turbidostato. La tasa de crecimiento depende del sustrato, por tanto, para concentraciones de sustratos pequeños la tasa de crecimiento será pequeña. Llegando incluso a detenerse todo crecimiento.

El control de un turbidostato se puede enfocar de diversas formas. Se puede realizar un control proporcional a la tasa de crecimiento y la concentración celular.

$$D = \gamma\mu x$$

$$\gamma = \frac{1}{x^*}$$

Donde:

D : tasa de dilución

γ : parámetro de ganancia adaptativa

μ : tasa de crecimiento del sistema

x : concentración de biomasa

x^* : referencia de concentración de biomasa

Con este controlador se consigue que el sistema sea estable y tienda hacia el valor de referencia de biomasa. Sin embargo, en la práctica este control es demasiado lento ya que conforme se acerca a la referencia de biomasa la acción de control es más grande haciendo que la biomasa crezca cada vez más despacio.

Además, este controlador no cumple con la condición de “no-bach”.

Estudiando con detenimiento este control se puede observar en la acción de control que la concentración de biomasa se divide entre la referencia de concentración de biomasa. De esta forma se elimina sus unidades, lo importante es la proporción entre estos dos valores. Por esta razón se puede utilizar la medida de densidad óptica para calcular la acción de control.

$$OD = kx$$

$$OD^* = kx^*$$

Donde:

OD : densidad óptica del cultivo

OD^* : referencia de densidad óptica del cultivo

k : relación proporcional entre densidad óptica y concentración celular

Sustituyendo en la ley de control se obtiene:

$$D = \gamma\mu x$$

$$D = \frac{1}{k OD^*} x kOD$$

$$D = \frac{1}{OD^*} x OD$$

Es indiferente utilizar concentración celular y densidad óptica, siempre y cuando la relación entre estos sea proporcional. Cabe recordar que esta relación depende del tipo de microorganismo y deja de ser proporcional para concentraciones celulares elevadas. Utilizar densidad óptica en vez de concentración celular, también será aplicable para el siguiente control que se estudiará.

El instituto de Automática Industrial e Informática (ai2) ha diseñado un controlador que soluciona los problemas del controlador proporcional. Este nuevo controlador consigue que el sistema alcance a la referencia en un menor tiempo y es más robusto frente errores de parámetros y ruido.

Este controlador consiste en adaptar el valor de γ conforme el sistema evoluciona. Obteniendo finalmente un regulador que dispone de una acción proporcional e integral.

$$D = \gamma \mu x$$

$$\dot{\gamma} = -\gamma^2 D \left[(1-a) \left(\frac{1}{\gamma} - x \right) - b(x - x^*) \right] f(\gamma)$$

Donde $f(\gamma)$ es una función que limita los valores máximos y mínimos que puede tomar gamma, limitando en última instancia a la acción de control.

[Mirar como es la ecuación de esta función y poner la gráfica]

Donde a y b son los parámetros que permitirán ajustar la dinámica del sistema. Estos parámetros deberán cumplir una condición para asegurar estabilidad y convergencia.

$$b > a - 1 > 0$$

5. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN SOFTWARE DEL SISTEMA

Programa de Arduino

En esta sección se tratará todo lo relacionado con la programación del microcontrolador Arduino.

Tal y como se ha planteado el proyecto, el microcontrolador deberá realizar las siguientes tareas:

- Manejar el motor paso a paso para la agitación magnética.
- Encender el módulo láser
- Medir con los fotodiodos
- Comunicarse con el ordenador

El motor paso a paso deberá permanecer girando todo el tiempo que el turbidostato esté encendido. El problema es que para que el motor paso a paso gire será necesario generar una serie de impulsos eléctricos de forma periódica. Por tanto, a nivel de programación se utilizará un temporizador que se ejecute cada 10 milisegundos y actualice las salidas digitales asociadas al motor para que gire.

Se utilizará la librería "TimerOne.h" para manejar uno de los temporizadores de Arduino. Las instrucciones que se usarán son las siguientes:

```
Timer1.initialize(10000);
```

Inicializa el temporizador y ajusta su periodo a 10 milisegundos.

```
Timer1.attachInterrupt(stepMotor);
```

Asocia una función llamada "stepMotor" a la interrupción del temporizador. De esta forma, cada 10 milisegundos se llamará a la función "stepMotor" que moverá un paso al motor.

Arduino posee una librería (Stepper.h) para manejar motores paso a paso. Las instrucciones más importantes son las siguientes:

```
Stepper myStepper(stepsPerRevolution, 8, 9, 10, 11);
```

Con esta instrucción se crea un objeto del tipo Stepper (motor paso a paso), asociado a las salidas digitales 8,9,10 y 11. "stepsPerRevolution" es una variable del tipo "int" que representa la cantidad de paso que debe dar el motor para dar una vuelta completa. Esta variable se utiliza para poder fijar la velocidad angular del motor.

```
myStepper.setSpeed(motorSpeed);
```

Esta función fija la velocidad angular en revoluciones por minuto. El parámetro "motorSpeed" es la velocidad angular que se fijará, y debe ser una variable del tipo "long". Esta función sólo fija la velocidad, no hace que se mueva el motor.

```
myStepper.step(stepsPerRevolution / 100);
```

Esta función hace girar al motor el número de pasos especificados. Este comando es el que se encontrará dentro de "stepMotor".

El módulo láser necesita ser conectado a una salida digital. Por tanto, se conectará el módulo láser al pin digital 4.

Será necesario inicializar ese pin como salida usando el siguiente comando:

```
pinMode( 4 , OUTPUT);
```

Por último, el módulo láser se activará cuando se le aplique una tensión de +5 V, por tanto, usaremos el siguiente comando para activarlo:

```
digitalWrite( 4 , HIGH);
```

Y el siguiente comando para apagarlo:

```
digitalWrite( 4 , LOW);
```

Debido a que los fotodiodos convierten la irradiancia medida en frecuencia será utilizar interrupciones.

Una interrupción es una señal que interrumpe la actividad normal del microprocesador y entonces se pasa a atenderla. Existen tres eventos que pueden disparar una interrupción:

- Un evento hardware, como pasar de tener un nivel bajo a un nivel alto en una entrada.
- Un evento programado, o temporizador
- Una llamada por software

En este caso se trata de una interrupción por hardware. Las salidas de los fotodiodos están conectadas a los pines digitales del Arduino. Por tanto, cada vez que estas pasen de 0 V a +5 V se producirá una interrupción. De esta forma se podrá contar cuantos cambios se producen en un determinado tiempo y calcular finalmente la frecuencia de la señal.

La rutina que se deberá ejecutar para medir en pseudocódigo será la siguiente:

1. Asociar el pin del fotodiodo a utilizar a una interrupción
2. Esperar durante 1 segundo. Durante este tiempo se contará el número de interrupciones que ocurren.
3. Liberar la interrupción del pin seleccionado para parar la generación de interrupciones.
4. El número de interrupciones contadas equivale a la frecuencia en Hz (esto es debido a que se ha estado un segundo contando).

A continuación, se mostrará las funciones que se deberán utilizar en Arduino para crear esta rutina.

Es necesario crear una función que será el manejador de la interrupción. Esta será llamada cada vez que surja la interrupción, y lo único que realiza será incrementar en uno el valor de un contador. De esta forma, cada vez que aparezca una interrupción quedará registrado en el contador. Esta función se puede definir de la siguiente forma:

```
void irq(){  
    cnt++;  
}
```

Donde “cnt” es una variable del tipo unsigned long donde se almacenará la cantidad de interrupciones que se ha generado.

Después cada vez que se quiera medir será necesario asociar esta función “irq” a uno de los pines de digitales conectados a los fotodiodos. Para ello, se usará la siguiente función:

```
attachInterrupt (0, irq , RISING);
```

De esta forma se asociará la interrupción al irq0, el pin 2 de Arduino Uno.

Una vez que haya pasado un segundo será necesario eliminar la interrupción para evitar que siga contando. Se utiliza el siguiente comando:

```
detachInterrupt(0);
```

Para realizar una espera de un segundo lo recomendable no utilizar un delay(). Ya que este comando para el funcionamiento del Arduino hasta que acaba el tiempo, impidiendo de esta forma que se den las interrupciones.

Se ha de utilizar el comando millis() para generar la espera de un segundo. El comando millis devuelve el tiempo en milisegundos desde que empezó el programa de Arduino. Por tanto, se puede guardar el tiempo inicial usando millis() y después ejecutar un bucle que compare continuamente el tiempo actual con el inicial.

Cuando la diferencia de tiempo supere un segundo se sale del bucle. De esta forma sí que se puede realizar una espera que permita que se den interrupciones.

Se ha de tener en cuenta que no todos los pines digitales sirven para realizar interrupciones. En Arduino Uno solo se pueden generar interrupciones a través de los pines digitales 2 y 3. Esta es la razón por la cual solo se puede controlar un turbidostato con un Arduino Uno.

Sin embargo, si se usase un Arduino Due, se podría manejar interrupciones en a través de cualquiera de sus pines digitales.

Arduino puede comunicarse con un ordenador. Para ello basta con conectar a Arduino con el cable directamente a un puerto USB del ordenador. Esta comunicación será del tipo serial.

Se deberá fijar una velocidad de transmisión de datos a priori. Esta será usada tanto por el Arduino como por el ordenador. En este caso se ha optado por utilizar 9600 baudios. Se podría utilizar velocidades de transmisión superiores, pero tampoco existe esa necesidad. Además, se ha comprobado que a esta velocidad prácticamente no existen errores de transmisión.

En la comunicación serial se establece un protocolo que se debe seguir para poder realizar un intercambio de información. Se ha diseñado un protocolo específico para el proyecto, este será explicado en el Anexo 2 del proyecto.

Interfaz en Matlab

Funcionamiento

Se ha diseñado un programa en el entorno de programación Matlab para poder realizar el control del turbidostato y también permitirá monitorizar su estado.

Matlab es un entorno de programación ampliamente utilizado en el campo de la ingeniería. Además, dispone de una gran cantidad de herramientas para realizar análisis matemáticos. Por estas razones se eligió Matlab para realizar la interfaz del turbidostato.

El programa realizará dos funciones.

En la primera función se encargará de realizar el control del turbidostato. Para ello dispone de un temporizador, que hará que se ejecute de forma periódica el programa de control. Mientras que se realiza el control, también se mostrará la evolución temporal de variables de interés como puede ser la densidad óptica o la tasa de crecimiento.

Un ciclo del programa consiste en la realización de las siguientes tareas:

1. Pedir lectura a Arduino
2. Recibir la medida de Arduino en unidades de irradiancia
3. Convertir la irradiancia a densidad óptica
4. Actualizar el observador con el nuevo valor de densidad óptica y la acción de control aplicada
5. Calcular la nueva acción de control
6. Convertir la acción de control, a unidades de volumen
7. Enviar la orden a la bomba de jeringa para que aplique el volumen necesario
8. Actualiza todas las gráficas de la interfaz

Por otro lado, el programa posee una segunda funcionalidad. En este modo se simula el comportamiento del turbidostato usando un modelo, e introduce los valores del modelo como si fuesen las lecturas de densidad óptica del modelo. También se aplica directamente la acción de control al modelo.

De esta forma se elimina la necesidad de tener el turbidostato físicamente para poder realizar pruebas con el programa.

Además, en modo simulación, el programa se ejecuta a mayor frecuencia por lo que se puede simular toda la evolución del turbidostato, típicamente de unas doce horas, en unos pocos minutos.

Manual de usuario

En este apartado se explicará todo lo necesario para poder utilizar el programa de Matlab.

Cuando se inicia el programa aparecerá la siguiente interfaz gráfica.

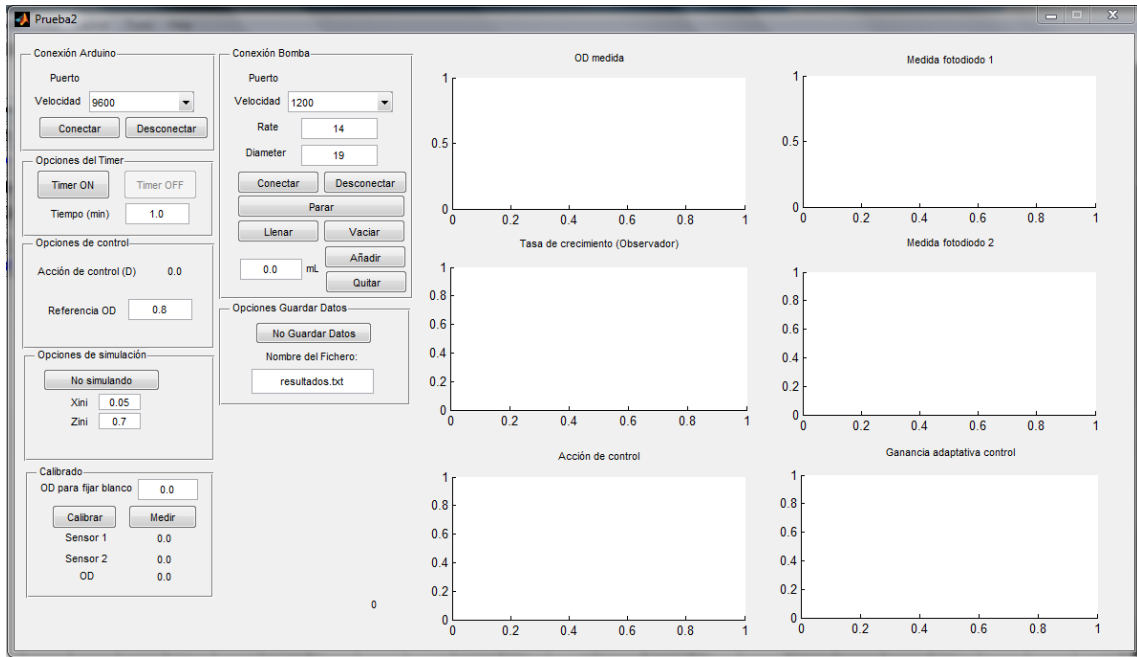


Ilustración 14 - Interfaz programa Matlab

En ella se puede observar diferentes paneles con opciones y seis gráficas donde se mostrará la evolución temporal de las variables de interés.

Se explicará todas las funciones que puede realizar el programa.

Conexión Arduino:

Este panel se encarga de la conexión con el microcontrolador Arduino. El programa detectará al abrirse todos los dispositivos con los que se pueda conectar vía puerto COM. Si no detectase ninguno, el panel de Conexión Arduino aparecerá de la siguiente forma, sin da la posibilidad de elegir un puerto COM.

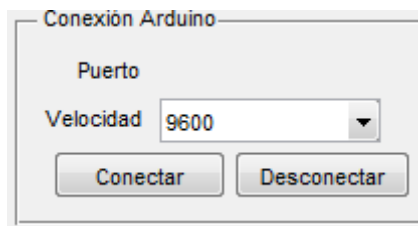


Ilustración 15 - Panel Conexión Arduino

Una vez que se detecte un dispositivo en el puerto COM cambiará a este aspecto.

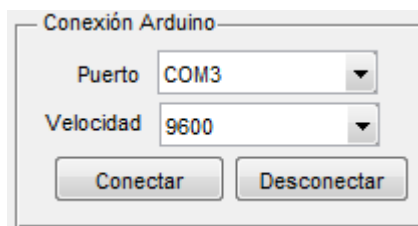


Ilustración 16 - Panel Conexión Arduino con lista de puertos COM

Apareciendo esta vez la posibilidad de elegir que puerto COM utilizar. Si se pincha la flecha de la derecha permitirá elegir otro dispositivo de la lista de detectados.

Este panel también permite seleccionar la velocidad de comunicación en baudios con el Arduino. Esta seleccionada por defecto 9600 pero si se pincha en la flecha de la derecha se abre un desplegable con las velocidades típicas de comunicación que se utilizan.

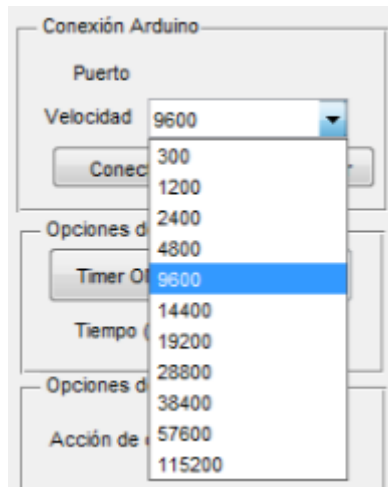


Ilustración 17 - Detalle desplegable panel de conexión Arduino

Una vez seleccionados el puerto y la velocidad adecuados, se pinchará en el botón Conectar para empezar la comunicación con Arduino. Por otro lado, el botón Desconectar cortará la conexión con Arduino.

Conexión Bomba:

Este panel se encargará de todo lo relacionado con la bomba de jeringa.

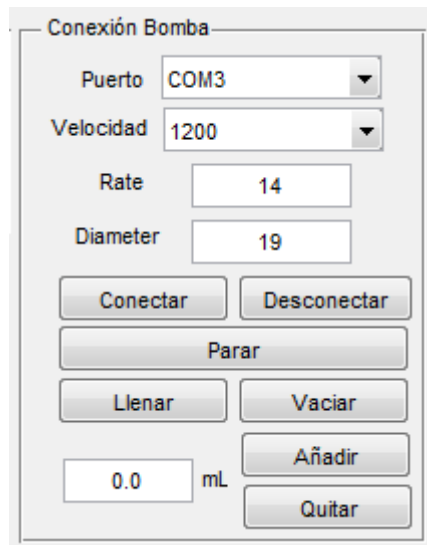


Ilustración 18 - Panel Conexión Bomba

Dispone las mismas opciones para realizar la conexión a través del puerto COM que el panel de Arduino. Cabe destacar que por defecto la velocidad de comunicación en este caso es 1200, la necesaria para una correcta comunicación con la bomba.

Además, este panel dispone de otras funciones.

Rate permite ajustar la velocidad de flujo a la que trabajará la bomba.

En Diameter, se tendrá que introducir el diámetro en milímetros de la jeringa que se está utilizando. Este valor se usará de forma interna para calcular cuánto debe avanzar el embolo para poder suministrar el volumen de líquido necesario.

Ambos parámetros, Rate y Diameter, están inicializados los valores normales que se utilizan, por lo que no será necesario cambiarlos a no ser que se cambie de jeringa.

Lo que se ha visto hasta ahora permitirá que la bomba de jeringa pueda ser usada correctamente por el turbidostato. Por último, en el panel existen más botones que permitirán manejar de forma manual a la bomba.

Esto es de utilidad para llenar o vaciar la jeringa, o realizar comprobaciones de calibrado.

En el último edit se puede fijar qué cantidad de volumen queremos añadir o quitar.

Opciones del timer:

Este panel permitirá manejará el temporizador del programa.

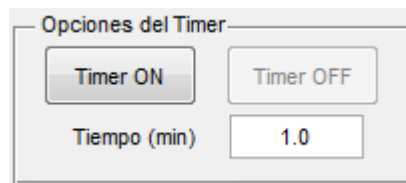


Ilustración 19 - Panel de opciones del temporizador

En este panel se puede ajustar que tiempo de muestreo en minutos y encender o apagar el temporizador. El tiempo de muestreo que se seleccione será usado para realizar el control y las simulaciones.

Opciones de control:

En este panel se podrá seleccionar la referencia en OD que deberá alcanzar el turbidostato.

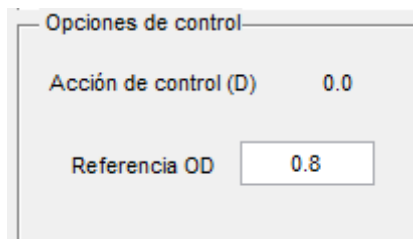


Ilustración 20 - Panel opciones de control

Además, también mostrará el valor de la última acción de control aplicada. Se planea que en el futuro permita ajustar parámetros internos del control y que se pueda elegir qué control utilizar.

Opciones de simulación:

En este panel se ajustará las opciones disponibles con la simulación.

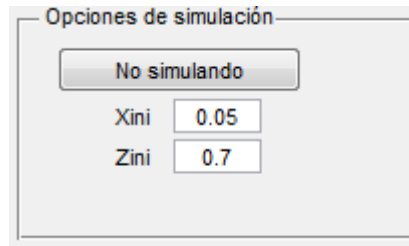


Ilustración 21 - Panel opciones de simulación

Si se presiona el botón de No simulando, el programa pasará a simular el comportamiento del turbidostato. Por lo que, en vez de leer los datos a través del Arduino, se tomarán directamente del modelo.

Si se pretende realizar una simulación no es necesario conectar el Arduino ni la bomba de jeringa. Se utilizará el tiempo de muestreo colocado en el temporizador para realizar la simulación del modelo, sin embargo, el temporizador se ejecutará a una velocidad mucho mayor de la especificada para que de esta forma se puedan obtener los resultados en pocos segundos.

Una vez que se activa la simulación el panel pasará a este estado.

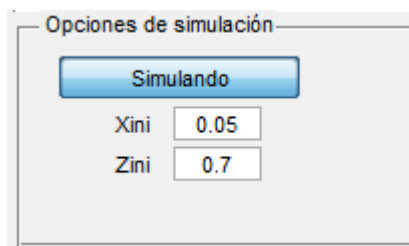


Ilustración 22 - Panel opciones de simulación activo

También permite ajustar unos parámetros del modelo. Como son la concentración inicial de microorganismos (Xini), o la cantidad de biomateria más sustrato inicial (Zini).

Calibrado:

En este panel se encuentran las opciones para realizar el calibrado de OD del turbidostato.



Ilustración 23 - Panel de calibrado

En OD para fijar el blanco se introducirá el valor de OD actual del cultivo. Este valor se puede obtener tomado una muestra del cultivo y medir su densidad óptica en un espectrofotómetro.

Una vez se introduce el valor de densidad óptica, se ha de presionar el botón de Calibrar, para realizar el calibrado.

Entonces se realizará una medida de la densidad óptica del cultivo y se calibrará para que mida correctamente.

Después se puede realizar una segunda medida usando el botón Medir para comprobar que la calibración funciona correctamente.

Opciones Guardar Datos:

Este panel permitirá guardar todos los datos de interés en un fichero. Los datos que guarda son los siguientes: los valores medidos directamente por los fotodiodos, la densidad óptica, la referencia de densidad óptica, la tasa de crecimiento y la acción de control.

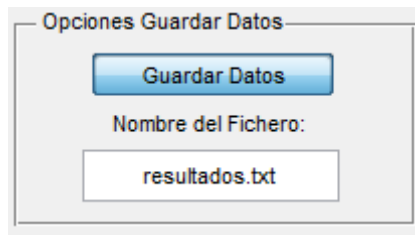


Ilustración 24 - Panel de opciones para guardar datos

Permite introducir el nombre que se quiere dar al archivo.

6. RESULTADOS

Ensamblaje final del turbidostato

Se mostrarán a continuación una serie de fotografías que ilustran el resultado del ensamblaje de todos los componentes que forman el turbidostato.

En la siguiente fotografía se puede observar la cámara de cultivo donde residirá la vasija de vidrio con los microorganismos. Concretamente, en esta imagen se puede observar que hay un cultivo de bacterias dentro de la cámara. De no haber bacterias el cristal de la cámara estaría completamente transparente.

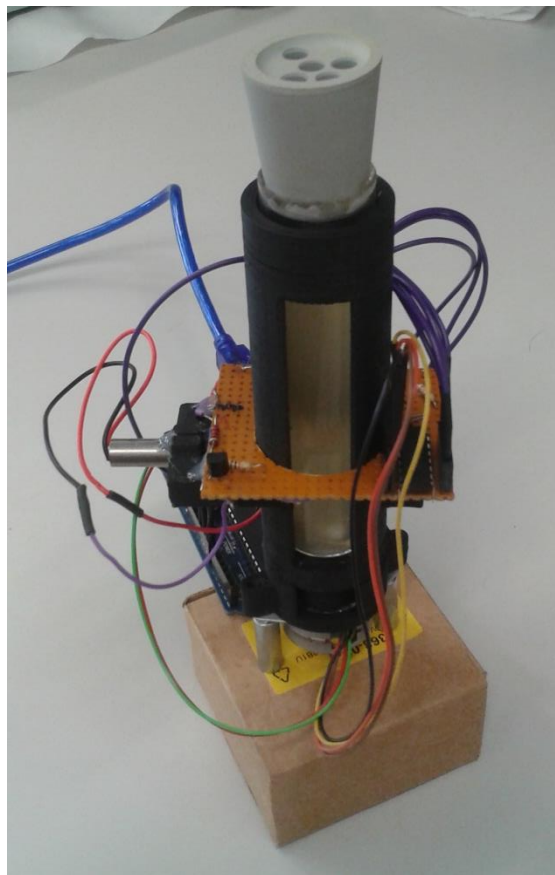


Ilustración 25 - Cámara de cultivo

En esta ocasión se puede observar el montaje final de todos los componentes del turbidostato. En esta foto están presentes: la bomba de jeringa, la bomba de aire, la cámara de cultivo y el propio ordenador.

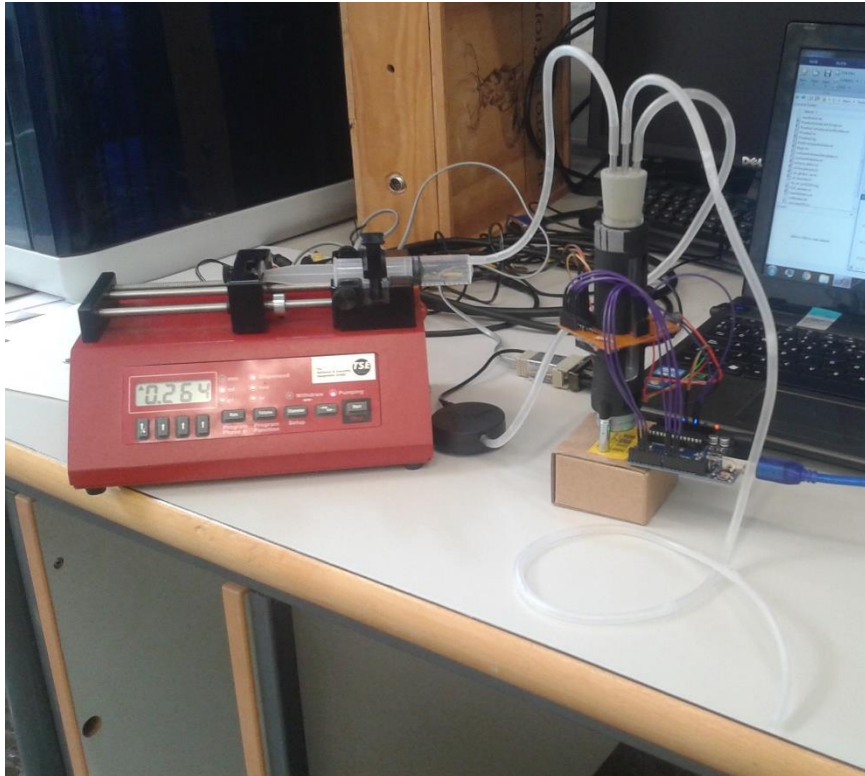


Ilustración 26 - Montaje final del turbidostato

Repetitividad de las medidas

Se han realizado una serie de pruebas para conseguir obtener una buena repetitividad en la medida de los fotodiodos.

Los resultados de estas experiencias consiguieron detectar cual era la causa de la alta variabilidad en las medidas: la manipulación del tubo de vidrio (por las razones que se han explicado en el apartado de captación de potencia lumínica).

Por tanto, en este apartado se verán las pruebas que se realizaron que validan las conclusiones que se obtuvieron.

Antes de empezar con las explicaciones de las pruebas cabe destacar que en el turbidostato se utilizan dos fotodiodos. El primer fotodiodo será llamado a partir de ahora Sensor1, y este mide la potencia lumínica que atraviesa el cultivo. Por otro lado, el segundo fotodiodo será llamado Sensor2 y este medirá la potencia que emite el diodo laser sin pasar por el cultivo. Esto se explica en más detalle en el apartado de captación de potencia lumínica.

La primera prueba consistía en calcular la varianza en las medias cuando el tubo de vidrio era rotado. De esta forma se podrá calcular la varianza, para poder compararla en los siguientes experimentos.

Se utilizó el tubo de vidrio sin cultivo en su interior, y el procedimiento que se seguía consistía en medir y rotar de forma aleatoria el tubo. Obteniendo este resultado.

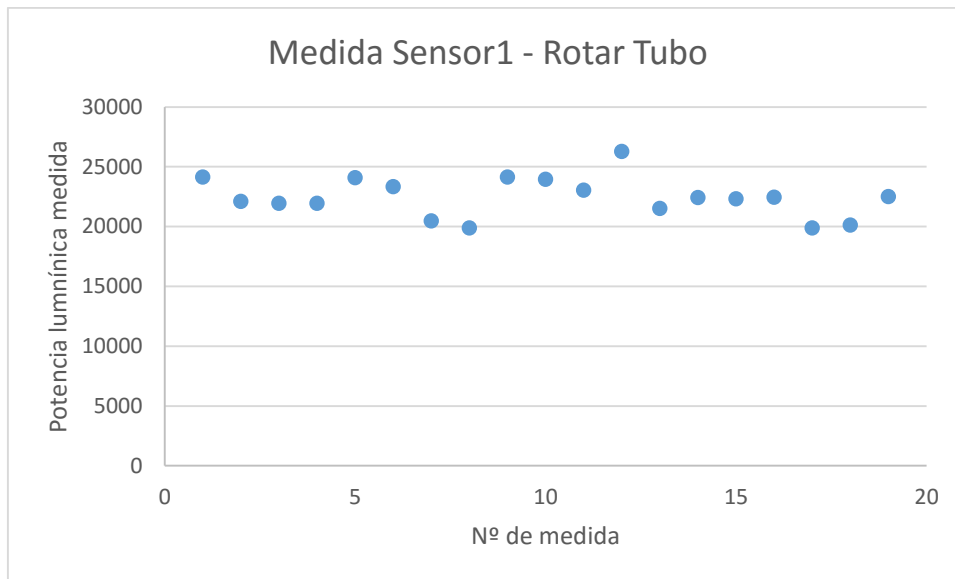


Ilustración 27 - Gráfico medidas sensor 1 rotando el tubo de cultivo

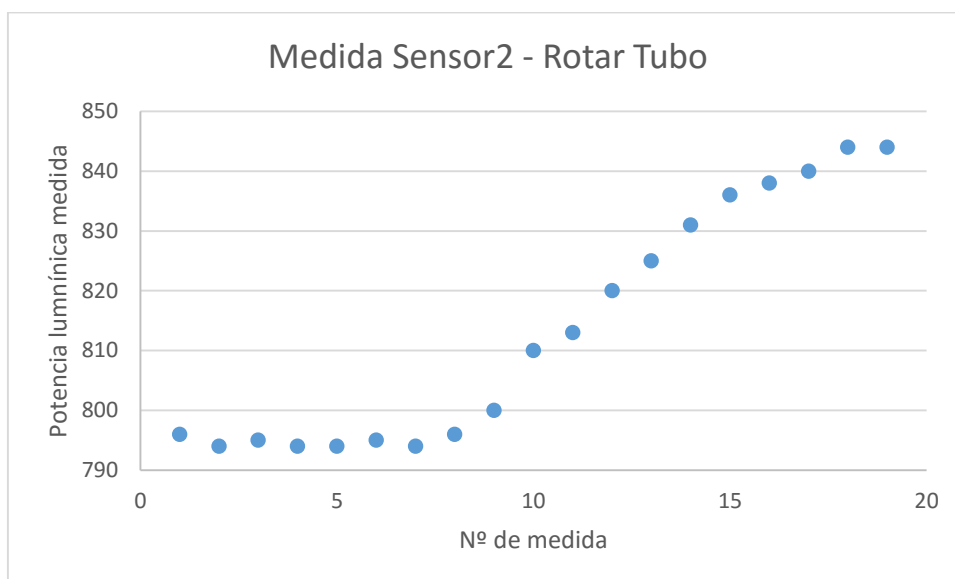


Ilustración 28- Gráfico medidas sensor 2 rotando el tubo de cultivo

	Sensor1	Sensor2
Promedio	22461,79	813,63
Varianza	2801205,73	397,91
Desviación	1673,68	19,95
Desviación %	7.451%	2.451%

Ilustración 29 - Tabla resultados de medir rotando el tubo

Como se puede observar la distribución de los datos en las medidas del Sensor1 es mucho más aleatorio que en el Sensor2. Esto es debido a que rotar el tubo solo afecta a las medidas del Sensor1, ya que son las que miden la potencia lumínica a través del propio tubo.

En el caso del Sensor2, se puede estar dando dos fenómenos. El primero es que se esté calentando el sensor por lo que hasta que alcance la temperatura final las medidas variarán. La segunda opción es que la luz exterior esté afectando a las medidas. Este experimento se realizó por la mañana por lo que cada vez había más luz ambiente en el laboratorio conforme avanzaba

el tiempo. Pero, aun así, esta última opción no es demasiado viable ya que las medidas se realizaron en un intervalo de tiempo pequeño (alrededor de 15 minutos).

La siguiente prueba fue repetir este experimento realizando un cambio. En esta ocasión se le colocó una marcar al tubo de vidrio para poder reorientarlo en la posición inicial después de haberlo manipulado.

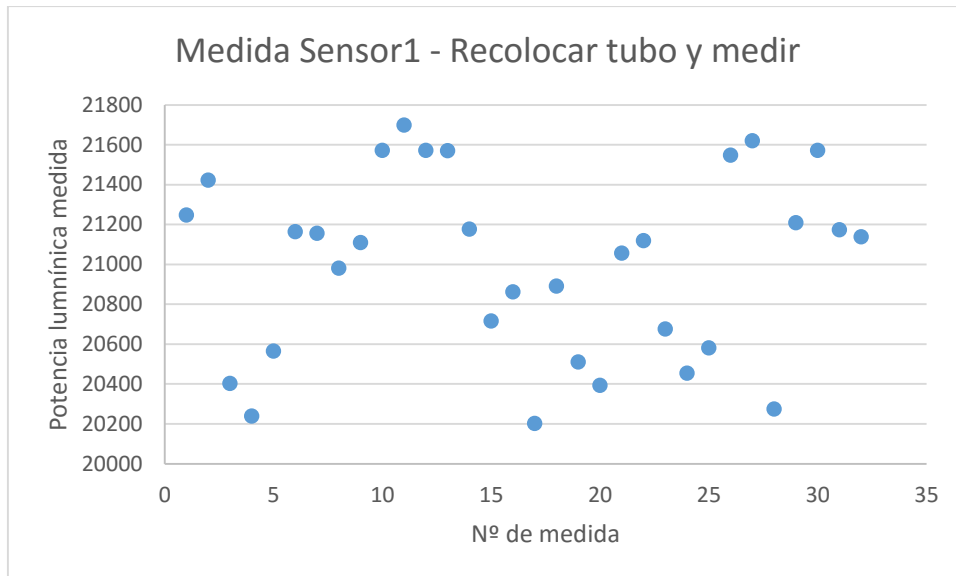


Ilustración 30- Gráfico medidas sensor 1 rotando y recolocando el tubo de cultivo

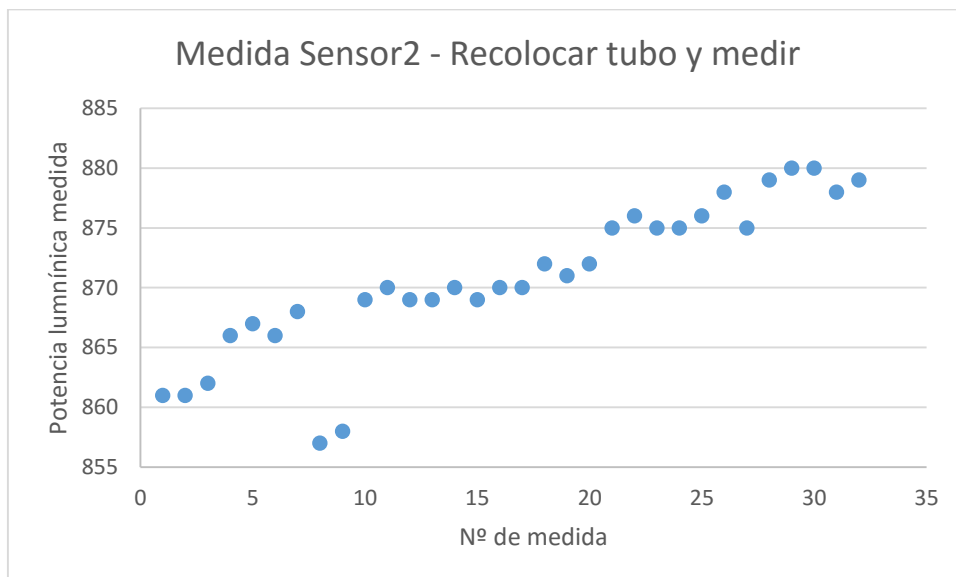


Ilustración 31- Gráfico medidas sensor 2 rotando y recolocando el tubo de cultivo

	Sensor1	Sensor2
Promedio	20995,63	870,72
Varianza	209992,56	40,08
Desviación	458,25	6,33
Desviación %	2,182%	0.726%

Ilustración 32- Tabla resultados de medir rotando y recolocando el tubo

Otra vez se vuelve repetir el fenómeno de que en el Sensor1 las medias son más aleatorias y sin embargo en el Sensor2 las medidas tienden a crecer de forma gradual. Lo importante que en este experimento la varianza ha disminuido significativamente, en comparación con el experimento anterior. Por lo que, recolocar el tubo en la misma posición permite reducir la variabilidad en la medida del Sensor1.

Por último, se realizó otro experimento en el cual no se manipulaba el tubo. Simplemente se colocaba y se realizaba medidas de forma seguida.

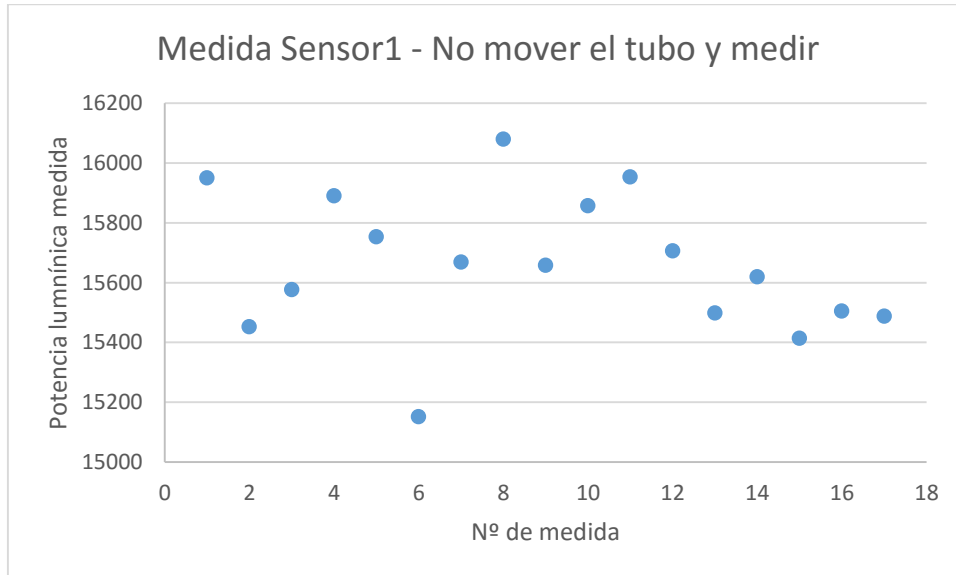


Ilustración 33 - Gráfico medidas sensor 1 sin mover el tubo de cultivo

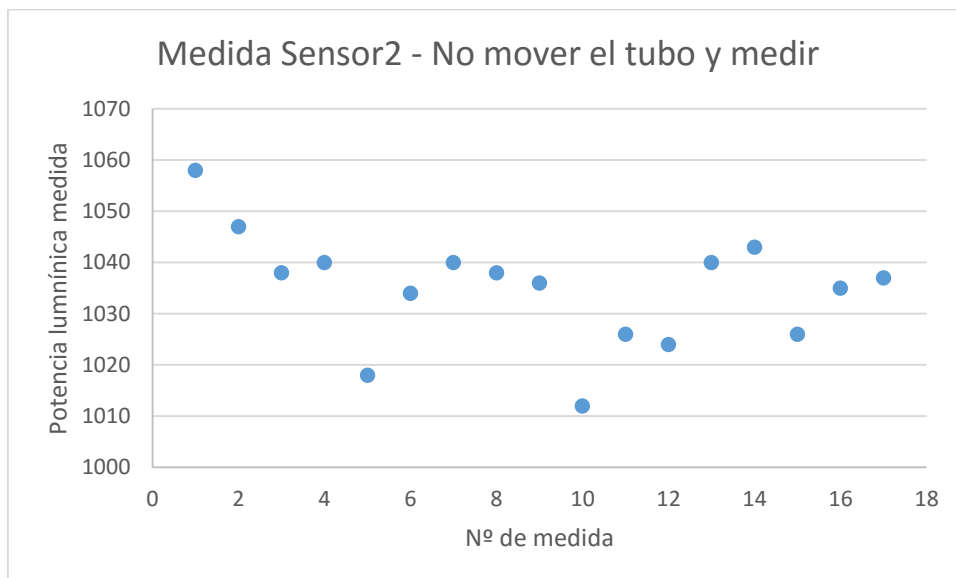


Ilustración 34 - Gráfico medidas sensor 2 sin mover el tubo de cultivo

	Sensor1	Sensor2
Promedio	15660,59	1034,82
Varianza	56290,88	121,03
Desviación	237,26	11,00
Desviación %	1.515%	0.011%

Ilustración 35 - Tabla resultados de medir sin mover el tubo

En este caso, ambas gráficas tienen una distribución aleatoria. La varianza en ambos casos se ha reducir significativamente con respecto a los resultados anteriores. Por lo que, la mayor fuente de variabilidad en las medidas es la manipulación del tubo.

Lo último que cabe destacar es que las medidas del Sensor2 se han estabilizado en esta prueba, por lo tanto, puede que el efecto que se estaba observando en los experimentos anteriores fuese debido al calentamiento del propio sensor.

Pero aun así se debería hacer una prueba enfocada a evaluar el transitorio de temperatura en las medidas de los sensores, ya que, en este experimento, no se observa el efecto del calentamiento en el Sensor1.

Puede que no se observe el efecto del transitorio de temperatura en las medidas del Sensor1 debido a que este recibe alrededor de 15 veces más potencia lumínica, por lo que alcanza el estado estacionario antes que el Sensor2.

Estabilidad de los sensores

Debido a que el turbidostato deberá permanecer funcionando durante largos periodos de tiempo. Se ha estudiado en apartados anteriores que los sensores se ven afectados por diferentes efectos externos que provocan que sus medidas tengan variabilidad.

Por tanto, se debe asegurar que los sensores del turbidostato son capaces de medir de forma precisa a lo largo del tiempo. Esto es debido a que la calibración solo se puede realizar una vez al inicio del funcionamiento, por tanto, si varía la potencia lumínica que emite el láser o aparece algún ruido que modifique las medidas de los sensores, el turbidostato dejará de estar calibrado y todas las medidas que tomo a partir de ese punto serán erróneas.

Se ha realizado una prueba en la que el turbidostato medía de forma periódica (cada tres minutos) la misma muestra. De esta forma, si al acabar la prueba seguía midiendo los mismos valores de potencia lumínica significará que puede permanecer calibrado a lo largo del tiempo.

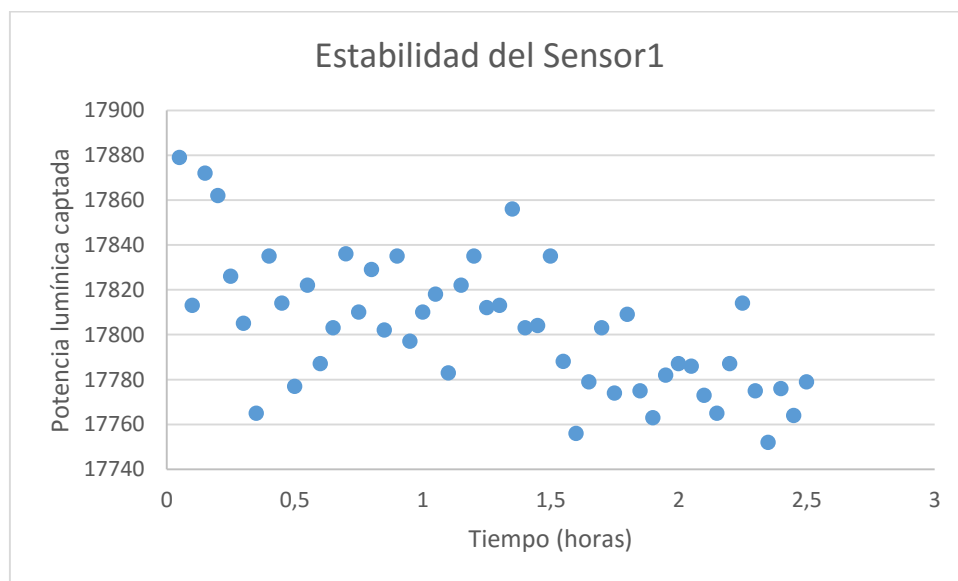


Ilustración 36 – Estabilidad del sensor 1 a lo largo del tiempo

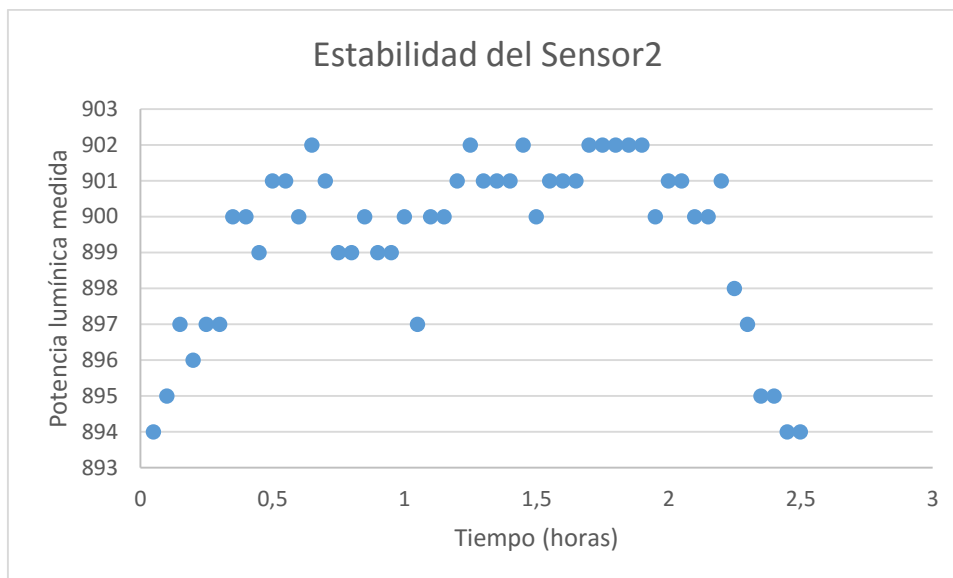


Ilustración 37 - Estabilidad del sensor 2 a lo largo del tiempo

	Sensor1	Sensor2
Media	17802,91548	899,396881
Varianza	873,4164	5,6
Desviación	29,8536635	2,39045722
Desviación %	0,17%	0,27%

Ilustración 38 - Tabla resultados de la prueba de estabilidad

La prueba duró dos hora y media, durante el desarrollo de la prueba se mantuvo unas condiciones de luz ambientales constantes. El resultado es que las medidas tienen una varianza pequeña, siendo la desviación porcentual inferior al 0.3% para los dos sensores.

Por tanto, se ha conseguido una elevada estabilidad para los sensores. Pero faltaría realizar una prueba donde las condiciones de luz ambiental fuesen desfavorables y variasen a lo largo del tiempo. Para observar de este modo su efecto en las medidas.

Pruebas de calibrado

En esta sección se mostrarán los experimentos realizados para calibrar el turbidostato.

Recordando la expresión de calcular la densidad óptica vista en el apartado de Medición de densidad óptica.

$$DO = \frac{1}{L} \cdot \log_{10} \left(\frac{I_o}{I} \right)$$

Siendo:

OD : densidad óptica

L : grosor de la muestra medido en cm.

I_o : Intensidad del rayo que atraviesa a la muestra.

I : Intensidad del rayo sin que atraviese a la muestra.

Se realizó una primera prueba utilizando dos filtros de 0.2 y 0.5 de densidad óptica. Estos filtros tienen la ventaja que, si se colocan dos de ellos seguidos, sus densidades ópticas se suman, permitiendo de esta forma tener acceso a una gran cantidad de valores distintos de densidad óptica.

La densidad óptica es la absorbancia por unidad de longitud. Por tanto, se podría pensar que en este caso la longitud a atravesar es el espesor del filtro, menos de un milímetro. Esto es un error.

Estos filtros están ajustados para que su densidad óptica simule ser la densidad óptica de un objeto de un centímetro de espesor. Esto se hace así porque todos los medidores comerciales de densidad óptica trabajan usando esta distancia para las muestras que miden.

Por tanto, para este experimento L tendrá un valor de un centímetro.

Se muestra a continuación la prueba de calibrado usando filtros. Para ello se ha medido inicialmente el valor de I sin poner ningún filtro, y después se ha colocado los distintos filtros y sus múltiples combinaciones, obteniendo las medidas de I_0 . Por último, se ha aplicado la ecuación de la densidad óptica con las consideraciones anteriormente comentadas.

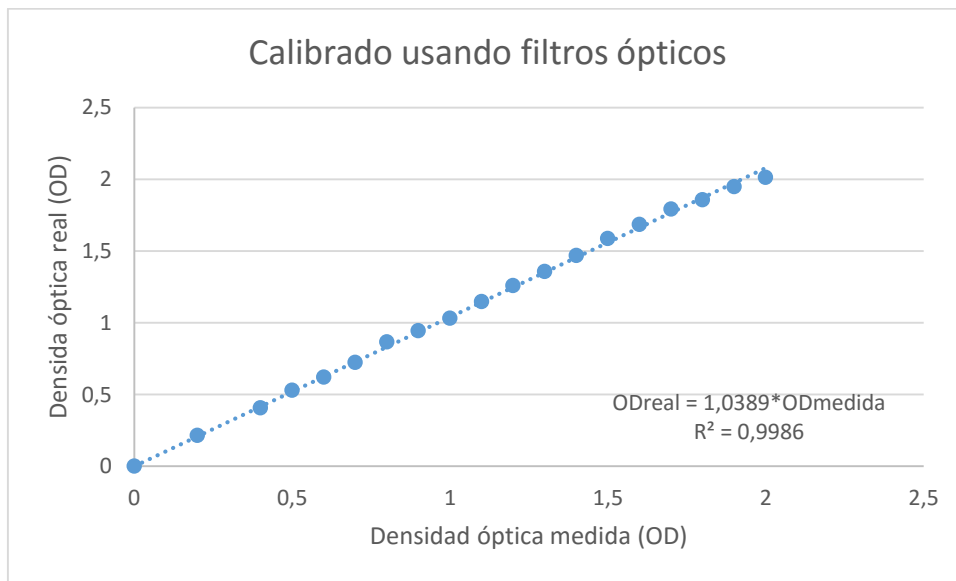


Ilustración 39 - Prueba calibrado mediante filtros ópticos

Se ha trazado una línea de tendencia para comprobar la validez del calibrado. Se ha conseguido casi una relación unitaria entre la densidad óptica real y la densidad óptica medida, por tanto, el sistema consigue medir correctamente.

Cabe destacar el alto valor de R^2 siendo este prácticamente igual a uno. Este valor representa lo bien que se ajusta el modelo que se ha utilizado para explicar la relación medida. En este caso, el modelo utilizado es una recta de pendiente prácticamente unitaria que pasa por el origen de coordenadas. Esto quiere decir que está calibrado el sistema, por lo que las medidas que toma son iguales a la realidad.

Una vez comprobado que se puede medir densidades ópticas, se pasará a medir densidades ópticas en el turbidostato.

Debido a lo comentado en el apartado de Estabilidad de los sensores, se ha de evitar la manipulación de tubo de cultivo para asegurar la repetitividad de las medidas. Esto conlleva a que realizar pruebas de calibrado se convierta en un proceso más largo.

La razón es que no se puede manipular el tubo para asegurar que el valor de I se mantiene constante a lo largo del experimento. Por tanto, no se puede vaciar el tubo de cultivo para llenarlo después con otro cultivo de densidad óptica diferente, y realizar un experimento parecido al anterior.

Se hicieron dos experimentos.

En el primero se utilizaba la técnica de reorientar el tubo de vidrio a la posición inicial.

Y en el segundo, se dejó crecer un cultivo durante varias horas y se midió de forma periódica la densidad óptica, retirando un poco de cultivo directamente del tubo de cultivo cada vez que se quería medir. Existe una relación proporcional entre densidad óptica y absorbancia, que es la longitud a travesar por el haz.

Se mostrarán a continuación los resultados de ambos experimentos. En el eje vertical se colocará la densidad óptica real del cultivo medida con un espectrofotómetro. Y en el eje horizontal el valor de absorbancia.

Se mide en esta caso la absorbancia ya que tiene una relación proporcional con la densidad óptica que depende de L . De esta forma se podrá obtener el valor de L experimentalmente.

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

$$OD = \frac{1}{L}A$$

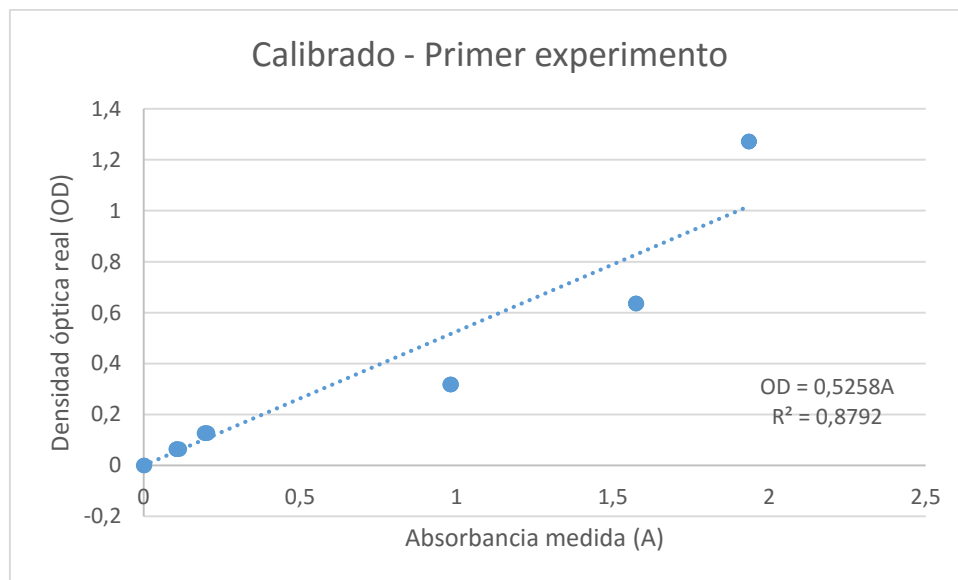


Ilustración 40 - Primer experimento de calibrado usando bacterias

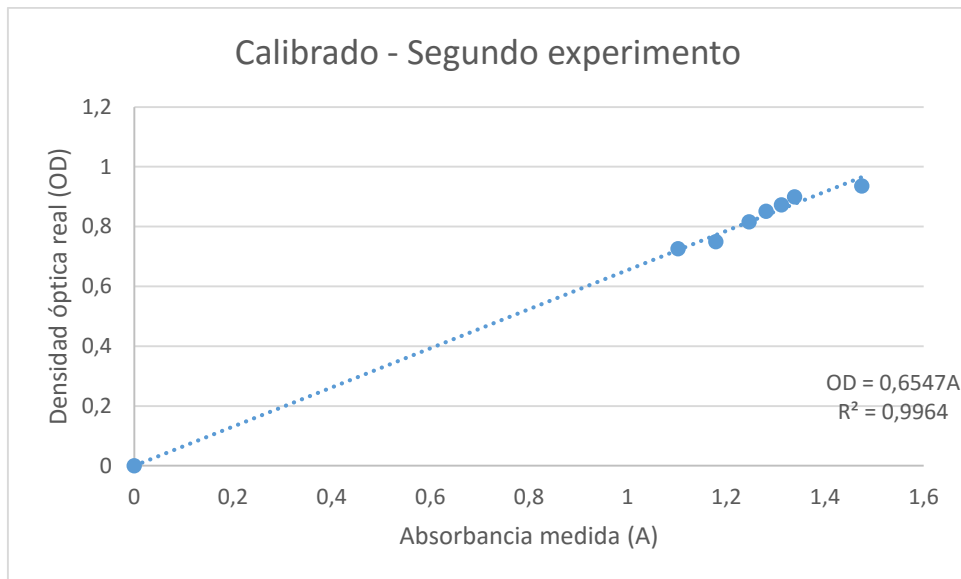


Ilustración 41 - Segundo experimento de calibrado usando bacterias

En ambos gráficos se ha trazado utilizando un modelo proporcional para determinar la relación entre absorbancia y densidad óptica. En el segundo experimento se consigue un ajuste mejor, como demuestra su valor más elevado de R^2 .

El primer experimento es más fácil que se haya podido producir un error en la medida debido a la manipulación del tubo de cultivo. Existen dos medidas que se separan en exceso de la proporción de las demás. Este efecto es más notable si juntamos los datos de los dos experimentos en una misma gráfica.

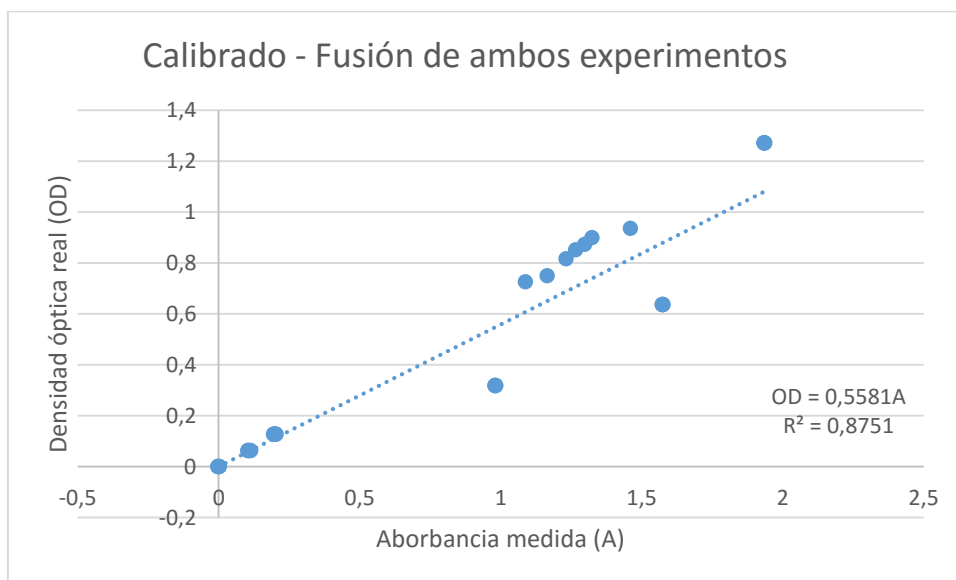


Ilustración 42 - Fusión de resultados de ambos experimentos

Los dos datos que se encuentran por debajo de la recta son seguramente debidos a errores de manipulación del tubo de cultivo, por lo que se pueden eliminar una vez han sido identificado su causa.

Obteniendo la siguiente gráfica:

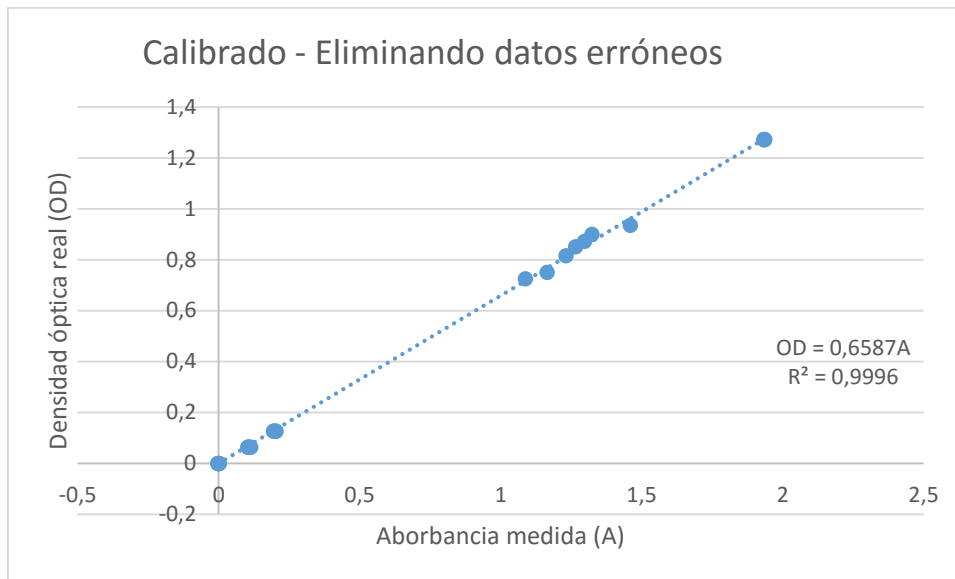


Ilustración 43 - Eliminación de datos anómalos

Se obtiene un valor muy elevado de R^2 , por lo que la relación proporcional entre absorbancia y densidad óptica es válida.

$$OD = 0.6587A$$

$$L = 1.5181 \text{ cm}$$

De esta forma se ha conseguido realizar el calibrado del turbidostato. Para calcular la densidad óptica se deberá utilizar el valor L obtenido en este apartado.

Usando este valor de L para calcular la densidad óptica de los experimentos anteriores se consigue este resultado:

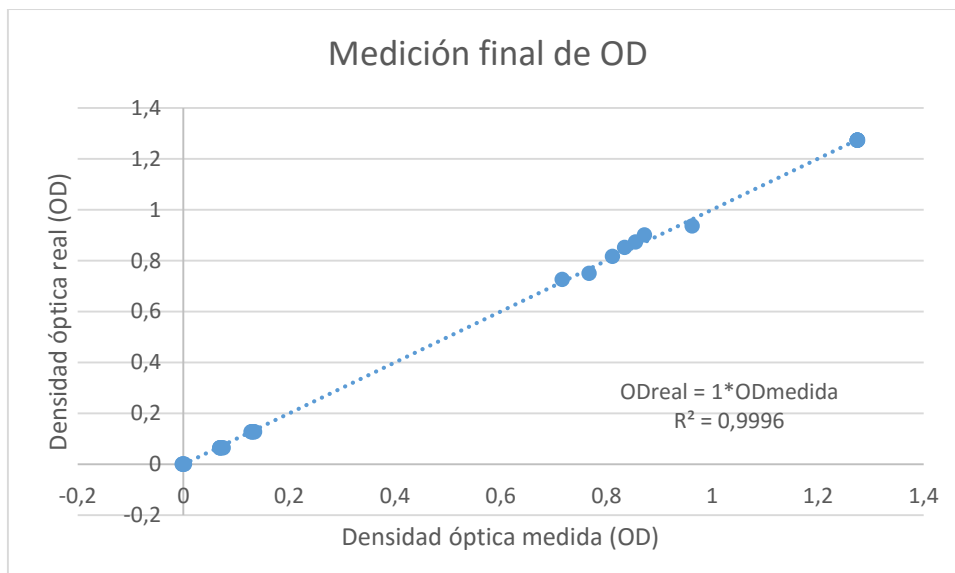


Ilustración 44 - Calibrado final de OD

En la gráfica esta representados la densidad óptica medida través de los sensores, frente la densidad óptica real medida por el espectrofotómetro del laboratorio. Ambos valore coinciden casi perfectamente, obteniendo un R^2 de 0.9996 muy próximo a uno.

Con todo esto, el calibrado y la medición de densidad óptica quedan resueltas en el turbidostato.

Pruebas de crecimiento bacteriano

Llegados a este punto, una vez resueltos los problemas de calibrado y de estabilidad de los sensores, el siguiente paso es realizar una prueba con un cultivo de bacterias. Se tomó un cultivo de bacterias en una concentración inicial de densidad óptica de 0.35.

Se dejó crecer al cultivo dentro del turbidostato y se midió de forma periódica (cada tres minutos) la densidad óptica del cultivo.

El experimento duró aproximadamente una hora.

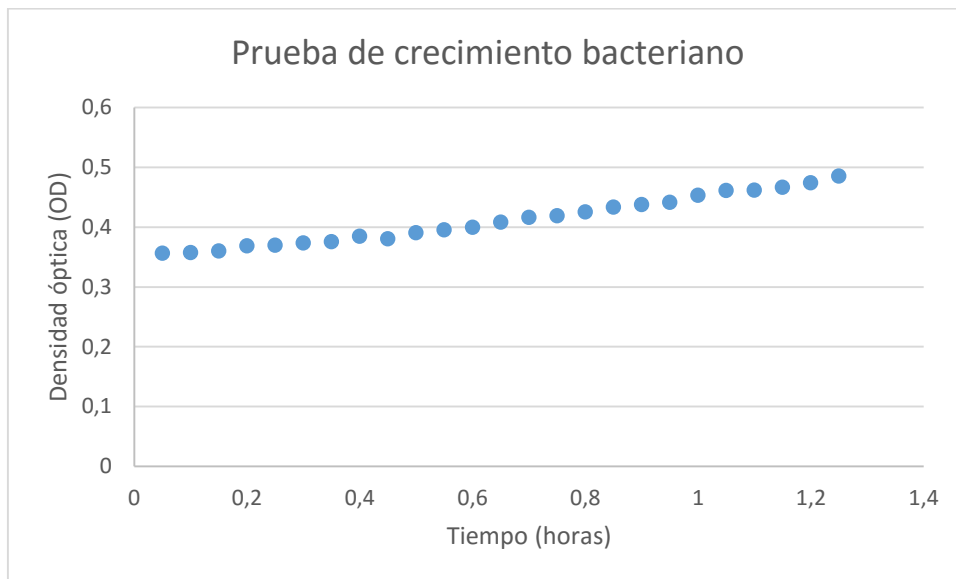


Ilustración 45 - Prueba de crecimiento bacteriano durante 1.2 horas

Al final el experimento, el cultivo según la medida del turbidostato había alcanzado una densidad óptica de 0.485. Se midió usando el espectrofotómetro del laboratorio y la densidad óptica real del cultivo fue de 0.48.

De esta forma se ha podido validar el buen funcionamiento del calibrado del turbidostato.

Una vez realizada esta prueba se planificó una segunda prueba que durase más tiempo y el tiempo de muestreo fuese más pequeño, de un minuto.

Hacer una prueba más larga permite observar la evolución completa del cultivo de bacterias, y permitirá más adelante usar estos datos para ajustar los parámetros del observador.

Los resultados de esta nueva prueba son los siguientes:

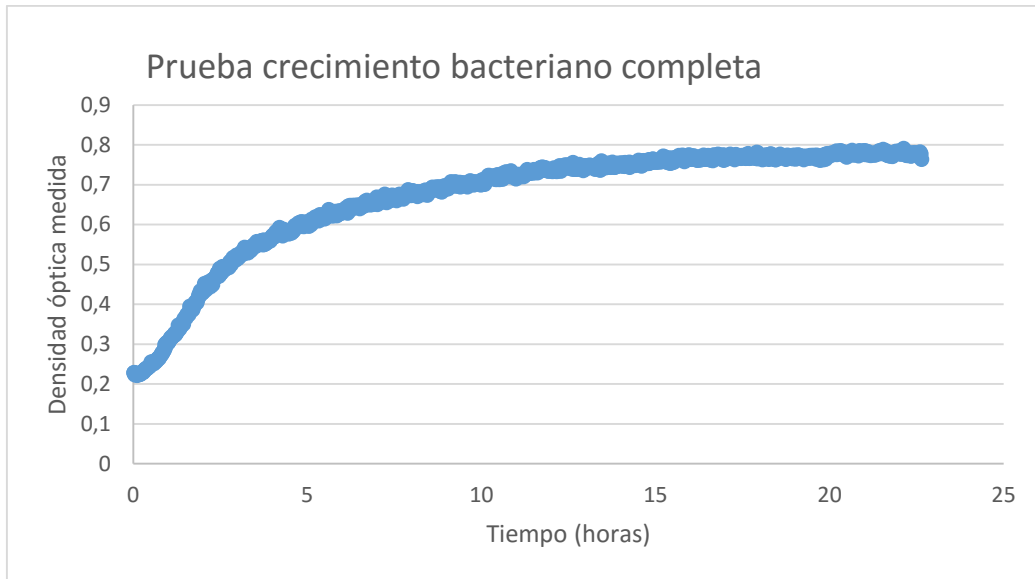


Ilustración 46 - Prueba crecimiento bacteriano durante 24 horas

En esta prueba el cultivo empezaba en una concentración de 0.23 de densidad óptica.

En la gráfica se puede observar tres tramos de diferenciados.

En el primer tramo, entre 0 y 4 horas, el cultivo de bacterias crece de forma exponencial. Esto es debido a que las bacterias tienen acceso a todos los nutrientes que necesitan.

En el segundo tramo, entre 4 y 15 horas, el crecimiento se ralentiza. La explicación de esto es que debido a que el tubo de cultivo se encontraba cerrado, no existía una renovación del aire. Por tanto, las bacterias se quedaron sin oxígeno y empezaron a trabajar de forma anaeróbica. Trabajar sin la presencia de oxígeno se traduce en una actividad celular menor, por tanto, se reduce la velocidad de su crecimiento.

Finalmente, en el último tramo, a partir de las 15 horas, se detiene todo crecimiento debido a que se han consumido la totalidad de los nutrientes presentes en el cultivo.

Una vez acabada la prueba se midió la concentración del cultivo con el espectrofotómetro y resultó ser de 0.72 de OD. Sin embargo, la última medida del turbidostato fue de 0.78. Esta diferencia es significativa, por lo que se debe de estudiar el porqué de esta diferencia en las medidas.

Se mostrará a continuación los valores de las medidas de potencia lumínica realizadas por los dos sensores. El sensor1 es el que mide la potencia lumínica del haz laser después de atravesar el cultivo. Por el contrario, el sensor2 es el que mide la potencia reflejada de salida del láser.

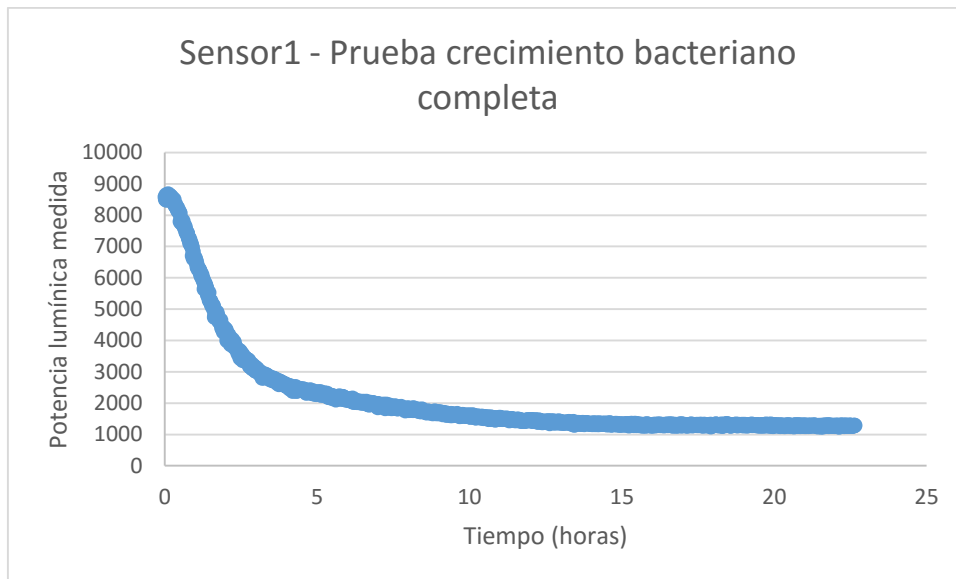


Ilustración 47 - Medidas sensor 1 durante la prueba de crecimiento bacteriano durante 24 horas

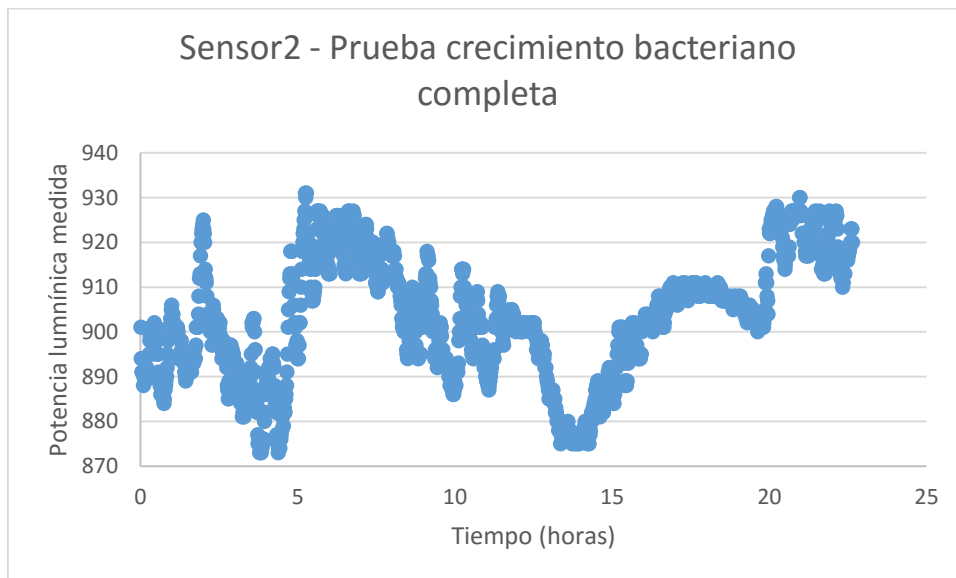


Ilustración 48 - Medidas sensor 2 durante la prueba de crecimiento bacteriano durante 24 horas

Sensor2	
Media	902,949963
Varianza	186,197643
Desviación	13,6504489
Desviación %	1,51%

Ilustración 49 - Tabla análisis medidas sensor 2 durante el desarrollo de la prueba de 24 horas

En las gráficas podemos observar la evolución temporal de la potencia lumínica medida en los sensores 1 y 2.

En la gráfica del sensor 1 sí que se ve reflejado el efecto del crecimiento del cultivo, con forme existen más microorganismo menos potencia llega al sensor1. Sin embargo, la medida en el sensor 2 deberá de permanecer constante porque se usará para poder estimar la potencia lumínica que emite el láser.

No se puede apreciar, debido a la escala, pero las medidas del sensor 1 siguen presentando la misma variabilidad vista en la prueba de estabilidad de los sensores. Por otro lado, la variabilidad en las medidas del sensor 2 en la gráfica. Aun así, esta variabilidad solo se traduce en una desviación porcentual del 1.51%, a pesar que esta sea mayor de las vistas en apartados anteriores, sigue siendo aceptable.

Esta desviación en las medias no es capaz de producir un cambio tan grande en la medición de densidad óptica, por lo que la diferencia existente entre la medida del espectrofotómetro y del turbidostato debe estar causada por otra circunstancia.

Una vez descartado esto, la única opción que queda es que se realizase mal la medida con el espectrómetro. Debido a que el experimento se inició un día y se acabó al día siguiente, se tuvo que calibrar dos veces el espectrofotómetro. Estas dos calibraciones se realizaron usando como blanco una muestra del cultivo fresco, así que es probable que las características del blanco cambiasen de un día para otro, explicando de esta forma la diferencia en las medidas.

De todas formas, se deberá realizar un experimento en el futuro para asegurar el buen funcionamiento del turbidostato.

Observador

En este apartado se mostrará los resultados del observador. La función del observador en el proyecto es la de estimar el valor de la tasa de crecimiento del cultivo a partir de las medias de densidad óptica y de la acción de control.

Se realizará una simulación probando el funcionamiento del observador, esta simulación se realizará usando el programa de Matlab desarrollado en el propio proyecto.

Se simulará un cultivo que posee una concentración baja de microorganismo y con una concentración alta de nutrientes. No se añadirá más medio fresco al cultivo, por tanto, los microorganismos crecerán durante un periodo y finalmente detendrán su crecimiento. De esta forma la tasa de crecimiento variará y se podrá comprobar que el observador es capaz de seguir las variaciones en la tasa de crecimiento.

Se han utilizado los siguientes valores para los parámetros del observador:

$$\alpha = 1.1 ; \beta = 1.8 ; p = 0.2$$

Y se ha utilizado un tiempo de muestreo de un minuto.

Este es el resultado de la simulación:

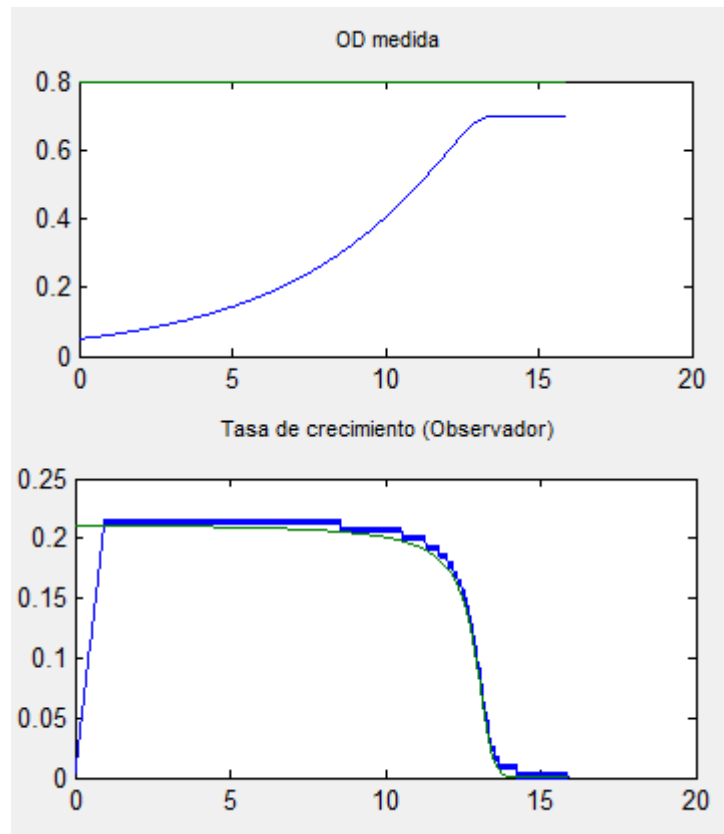


Ilustración 50 - Simulación del observador

Se puede observar en la gráfica superior que el cultivo empieza en 0.05 de densidad óptica y acaba en 0.7 de OD.

En la gráfica inferior se observa la tasa de crecimiento real (línea verde) y la estimada por el observador (línea azul). Existe un periodo de tiempo de una hora aproximadamente en el que la estimación del observador se acerca lentamente hasta alcanzar el valor real de tasa de crecimiento. Llegado a este punto, el observador es capaz de seguir con bastante fidelidad las variaciones en la tasa de crecimiento. Por tanto, el observador funciona correctamente.

Cabe destacar que se dispone de la tasa de crecimiento real debido a que se trata de una simulación y se puede obtener este parámetro del modelo, pero en las pruebas físicas no se podrá tener este valor para comparar si el observador funciona correctamente.

Por tanto, el siguiente paso es comprobar si funciona el observador con un proceso real.

Tal y como se había explicado en el apartado anterior, se usará los datos de la prueba de crecimiento bacteriano completo para ajustar el observador. Se usará en este caso los mismos parámetros como punto de partida, pero lo más probable es que se tengan que modificar para mejora su comportamiento.

Se mostrará a continuación el resultado de usar el observador con los datos de densidad óptica obtenido en el experimento con bacterias:

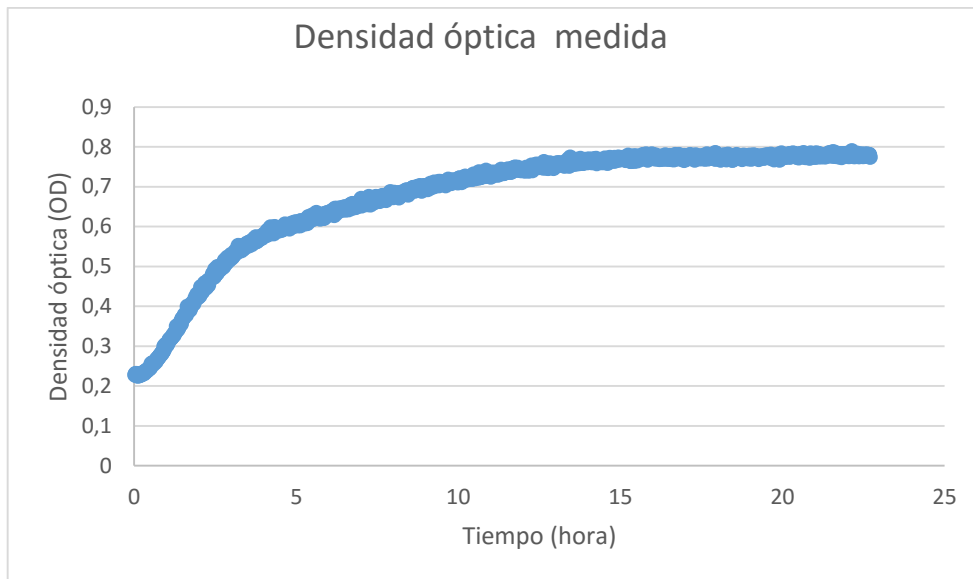


Ilustración 51 - Datos de densidad óptica utilizados para el observador

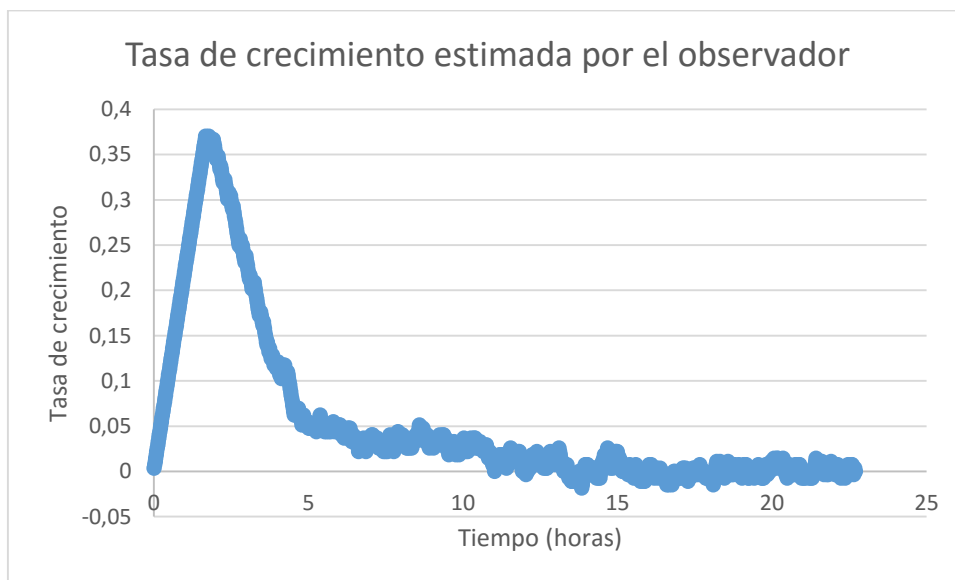


Ilustración 52 - Observador trabajando con datos reales

En la gráfica superior se puede observar la evolución de la concentración de las bacterias medido en unidades de densidad óptica.

En la gráfica inferior se observa la estimación de la tasa de crecimiento del observador. En esta ocasión vuelve a aparecer ese tramo inicial, en el que el observador avanza gradualmente hasta estimar el valor real de tasa de crecimiento. Sin embargo, tarda más en estabilizarse que en el resultado de la simulación anterior.

Una vez se ha estabilizado, el observador estima valores de tasa de crecimiento que coinciden con el estado de las bacterias comentado en el apartado anterior de pruebas de crecimiento bacteriano.

En el tramo entre 5 y 12 horas, existe una tasa de crecimiento pequeña que coincide con lo previsto. Y finalmente la tasa de crecimiento se hace prácticamente nula, que coincide también con el cese de crecimiento de las bacterias.

Se ha probado a modificar los parámetros para obtener una respuesta mejor del observador.

$$\alpha = 1.5 ; \beta = 2.1 ; p = 0.28$$

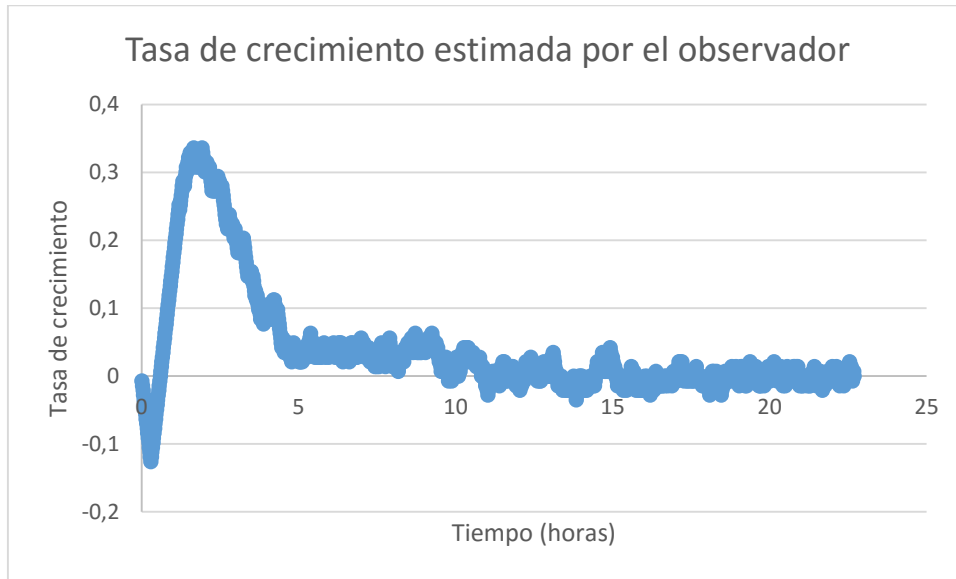


Ilustración 53 - Reajuste de los parámetros y su efecto en el observador

En este caso, se producen estimaciones de tasa de crecimiento negativas en los primeros instantes del observador. Una tasa de crecimiento negativa no tiene sentido a nivel físico. Esto es debido a que en este simulador no se ha inicializado correctamente el estado. Al modificar los parámetros, y sobre todo al haber aumentado el valor de p se ha conseguido que se establezca antes ligeramente. Sin embargo, ha aumentado la variabilidad de las estimaciones de forma significativa.

El ajuste de los parámetros del observador no es una tarea trivial. Con los datos que se poseen actualmente se ha conseguido realizar un ajuste del observador. Sin embargo, se debería hacer otro experimento con bacterias en las que no se limite su crecimiento y se alimenten de medio fresco de forma continua. En este caso sí que aportará más información para el ajuste de los parámetros.

Control

En este apartado se verificará el funcionamiento del control implementado para el turbidostato. Se utilizará la funcionalidad de simulación del programa de Matlab desarrollado en este proyecto.

Las leyes de control propuestas en el apartado de Diseño del Control, necesitan el valor de la tasa de crecimiento. Por tanto, en las simulaciones se utilizará el valor de tasa de crecimiento que proporciona el observador. De esta forma se validará el funcionamiento global del sistema control.

Se realizará primero la simulación del controlador proporcional.

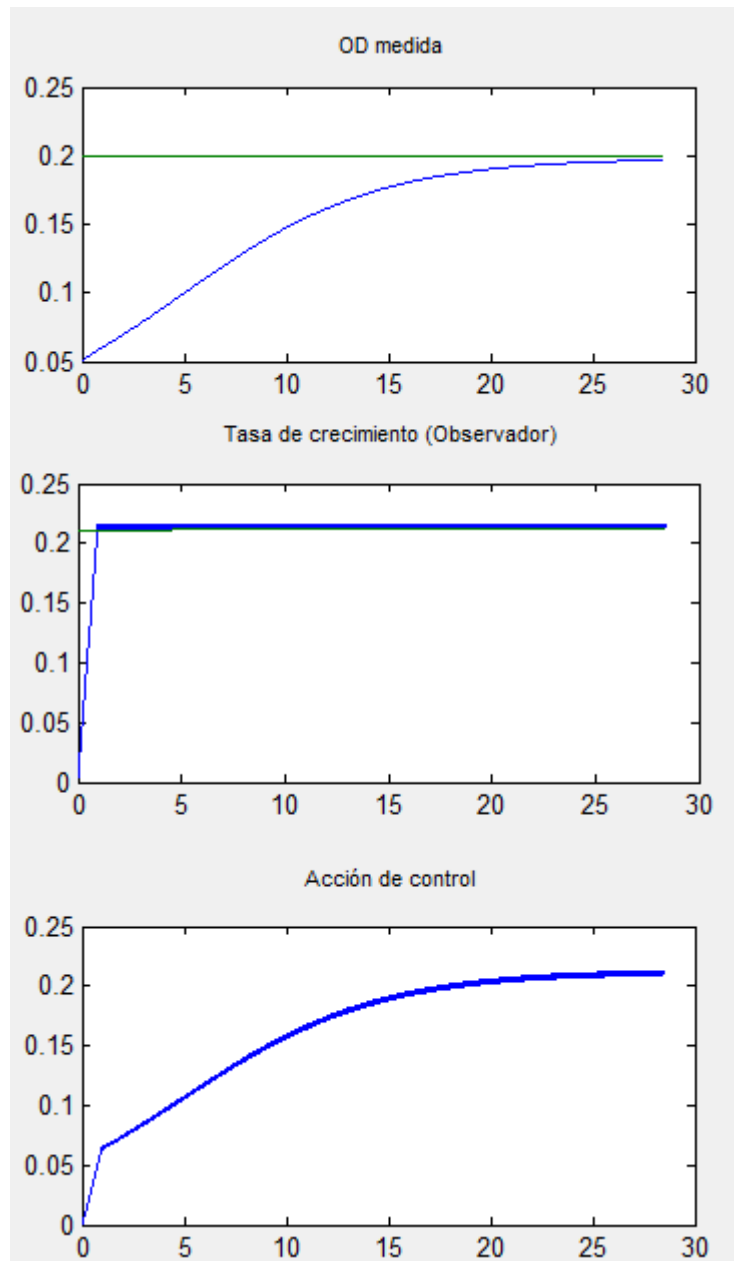


Ilustración 54 - Simulación control proporcional

En la primera gráfica se puede observar que el sistema consigue alcanzar la referencia (línea verde) de densidad óptica de forma sobreamortiguada, sin embargo, tarda sobre 25 horas en alcanzar la referencia.

En la segunda gráfica se puede observar que las estimaciones de tasa de crecimiento que ha realizado el observador son correctas.

Y en la última gráfica se encuentra la acción de control que se ha aplicado al sistema.

A continuación, se realizará la simulación con el control diseñado en el instituto de Automática Industrial e Informática (ai2).

Se han utilizado los siguientes valores para los parámetros del regulador:

$$a = 2.2 ; b = 2.0$$

El ajuste de estos valores aún no está estudiado, por lo que solo se pueden ajustar por el método de prueba y error. Se han ido probando diferentes combinaciones hasta obtener la siguiente respuesta:

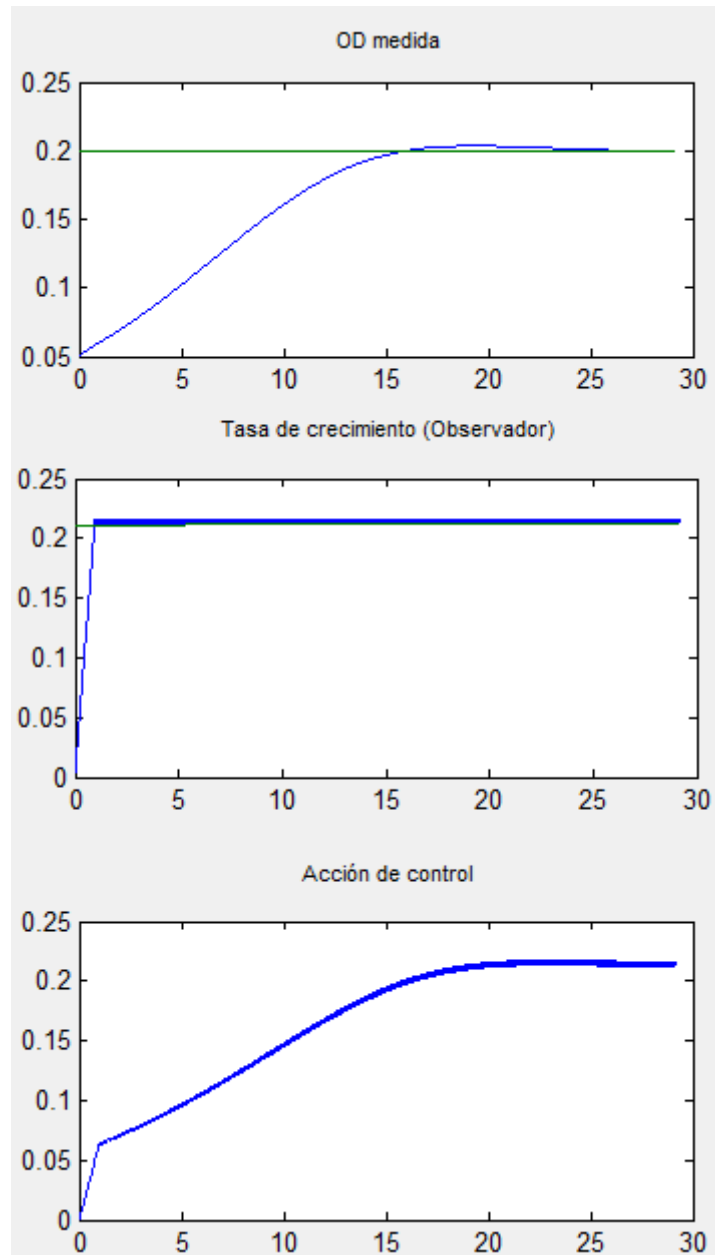


Ilustración 55 - Simulación control adaptativo

En la primera gráfica se puede observar que el sistema alcanza la referencia de densidad óptica mucho antes que, con el controlador proporcional, tardando aproximadamente unas 15 horas. Además, el sistema se comporta ahora de forma subamortiguada, teniendo una leve sobreoscilación.

El siguiente paso es probar el funcionamiento de estos controladores en un experimento real con bacterias. Pero esto no se ha podido realizar en el desarrollo del proyecto por falta de tiempo.

7. NORMATIVA

La Biología Sintética suele trabajar de dos maneras distintas. Un campo es el llamado dry-lab, el cual se enfoca en el diseño y análisis de circuitos biológicos mediante métodos computacionales. El otro campo es el llamado wet-lab, que se enfoca en la obtención de nuevos organismos, con las propiedades objetivo, y con la estrategia adecuada para conseguirlas, mediante el uso de agentes biológicos y sustancias químicas. El objetivo de la Biología Sintética no se podría conseguir sin la unión de estos dos campos, que complementan el diseño y la mecánica necesaria para lograr estas nuevas propiedades.

El uso de agentes biológicos y sustancias químicas trae diferentes riesgos para la salud humana, dependiendo del tipo de agente o sustancia que se haya utilizado. Esto conlleva a una responsabilidad en las personas a cargo de estas actividades científicas y usuarios del laboratorio, pues es necesario un conocimiento profundo de las características y riesgos que afectan a la salud humana cuando se utilizan.

Para identificar y analizar los riesgos asociados a las diferentes operaciones con elementos biológicos habitualmente ejecutadas en laboratorios biotecnológicos, y de manera que se llegue a conocer cómo tomar medidas de prevención y control, los siguientes manuales y decretos sirven como fuente de información.

Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo BOE nº 124, de 24 de mayo. Ministerio de Empleo y Seguridad Social e Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Manual de Seguridad para operaciones en laboratorios de biotecnología y de tipo biológico. Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio 3ª Edición. Organización Mundial de la Salud (OMS), 1983.

Para sintetizar la información esencial sobre los procedimientos que probablemente van a tener lugar durante la implementación del circuito genético deseado, se han recopilado los siguientes puntos. Se asume que la implementación física del circuito biológico tendrá lugar en la Comunidad Valenciana. Así, tanto las normativas de la Generalitat Valenciana, como las normativas españolas deben ser consideradas.

Laboratorio como lugar de trabajo. Generalidades.

De acuerdo a lo dispuesto en el Real Decreto 486/1997 del 14 de abril de 1997, han de ser respetadas las condiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo. Atendiendo a las actividades que serán desarrolladas, en caso de tener lugar en los laboratorios de la Universidad Politécnica de Valencia, las actividades laborales que deben ser consideradas son:

- a) Encargos docentes para trabajos académicos.
- b) Investigación, incluyendo operaciones de preparación, servicio de mantenimiento, etc.

En el Manual de Seguridad para operaciones en laboratorios de biotecnología y tipo biológico (UPV) los siguientes aspectos son mencionados más detalladamente. Aquí, sólo se describen los aspectos más relevantes.

Orden e higiene: No sobrecargar las repisas y áreas de almacenamiento, así como no obstruir áreas de paso o cerramiento. Tener cuidado con líquidos que se puedan derramar sobre las mesas o el suelo y desechar los productos residuales en los contenedores adecuados. Limpia y mantén de manera adecuada los materiales y equipamientos después de haber sido usados, y deposita los productos en los lugares de almacenamiento.

Espacio de trabajo por trabajador: Altura desde el suelo hasta el techo: 3 metros. Superficie libre por trabajador: 2 metros cuadrados. Capacidad cúbica (volumen) no utilizada por el trabajador: 10 metros cúbicos.

Temperatura, humedad y ventilación: El aislamiento térmico debe estar correctamente adecuado a las condiciones climáticas donde esté situado el laboratorio. Los límites de temperatura, humedad y ventilación deben estar ajustados de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 486/1997/Anexo III. Las condiciones de iluminación mínima de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 486/1997/Anexo IV.

1. Almacenamiento y manipulación de productos químicos.

Para la correcta manipulación y almacenamiento es necesario para el usuario identificar los diferentes compuestos peligrosos, de acuerdo a lo dispuesto en el Real Decreto 363/1995 del 10 de marzo del 1995. No han sido utilizados compuestos peligrosos para este proyecto. El Real Decreto 99/2003 del 24 de enero del 2003 incorpora las siguientes definiciones:

Substancias: Elementos químicos y sus compuestos en su estado natural, o aquellos obtenidos mediante cualquier procedimiento de producción, incluyendo los aditivos necesarios para mantener la estabilidad del producto y contaminantes que resulten de utilizar esas técnicas, excluyendo disolventes que puedan aislar sin tener influencia en la estabilidad ni en la modificación de la composición.

Preparaciones: Mezclas o disolventes compuestos por dos o más sustancias químicas. 3.

2. Operaciones de manera segura en laboratorios donde se manipulen agentes biológicos.

Para proteger la salud del trabajador de riesgos procedentes de la exposición a agentes biológicos durante el desarrollo de actividades, el Real Decreto 664/1997 del 12 de mayo de 1997 fue publicado dentro del marco regulatorio de la Ley 31/1995 sobre la Prevención de Riesgos Laborales.

De acuerdo a lo mencionado en el Real Decreto 664/1997 del 12 de mayo de 1997, los agentes biológicos son definidos como microorganismos, incluyendo aquellos genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de producir cualquier clase de infección, alergia o toxicidad.

Alternativamente, un microorganismo se considera como cualquier entidad biológica, celular o no, capaz de reproducirse o transmitir material genético. Hay cuatro tipos de microorganismos básicos: bacterias, hongos, virus y parásitos (protozoos, especies, etc.). Un cultivo celular es el resultado del crecimiento in vitro de células obtenidas de organismos multicelulares.

Dependiendo del riesgo de infección, el Real Decreto 664/1997 clasifica los agentes biológicos en cuatro grupos. Los agentes biológicos necesarios para el presente proyecto son agentes biológicos de tipo 1, es decir, aquellos que tienen pocas probabilidades de causar una enfermedad al ser humano.

Los agentes biológicos más propensos a producir cualquier tipo de riesgo de enfermedad (grupos del 2 al 4 en orden ascendente de peligrosidad), pueden ser encontrados en el siguiente link: <http://www.mtas.es/insht/legislation/biologic.htm#{#}anexo2>.

Antes de empezar cualquier actividad la cual implique la manipulación de agentes biológicos, éstos deben ser identificados de entre un inventario. Los métodos de control para agentes biológicos están orientados de acuerdo a los ya mencionados grupos de agentes biológicos. A este respecto, los métodos de control para los agentes biológicos de este proyecto son Métodos de Control del grupo 1.

Algunas medidas preventivas de carácter general para laboratorios con Control de 1er Nivel (métodos de control del grupo 1) están descritas en el Manual de Seguridad para operaciones en laboratorios de biotecnología y tipo biológico (páginas 84-87). Algunas de las recomendaciones de interés para agentes biológicos de tipo 1, además de los métodos preventivos generales, son:

- No utilizar pipetas con la boca. Utilizar dispositivos adecuados.
- Utilizar bata de laboratorio para prevenir la contaminación en la ropa normal. No utilizar bata de laboratorio fuera del laboratorio.
- Utilizar siempre protección ocular cuando exista riesgo de salpicaduras. Si es posible, que sean materiales plásticos en lugar de materiales de vidrio, para disminuir el riesgo de corte.
- Hacer una descontaminación de las superficies de trabajo al menos una vez por día, y siempre teniendo en cuenta el riesgo de derramamiento.
- Todos los usuarios del laboratorio deben lavarse las manos después de la manipulación de materiales infecciosos y a la hora de abandonar el laboratorio.

Con respecto al transporte de materiales biológicos, se deben tener en cuenta unas cuantas medidas preventivas:

- El transporte de muestras entre laboratorios se hará únicamente en caso de que, si éstas cayesen, no salpicasen.
- Las muestras deben estar etiquetadas o identificadas adecuadamente y no serán utilizadas con otro objetivo.
- Las muestras no serán transportadas con la mano.

Con respecto al almacenamiento de materiales biológicos:

- Las muestras biológicas deben ponerse en zonas de acceso restringido, minimizando las posibilidades de contaminación para los usuarios y el medioambiente.
- El almacenamiento en congeladores de nitrógeno líquido implica el uso de gafas y máscaras protectoras que prevengan de los daños infringidos por salpicaduras del

nitrógeno líquido. Más aún, en caso de rotura del equipamiento, el contenedor debe ser vaciado y dejarse el nitrógeno líquido evaporarse antes de proceder a su limpieza.

Con respecto al procesamiento de residuos, todos los desechos biológicos deben ser descontaminados antes de ser eliminados, satisfaciendo las reglas dispuestas en la Ley nacional 10/1998 del 21 de Abril de 1998 sobre Residuos, y el Real Decreto autonómico 240/1994 del 22 de Noviembre de 1994, por el que es aprobado el Reglamento Regulador de la Gestión de los Residuos Sanitarios; Orden del 14 de Julio de 1997 de la Consellería de Medio Ambiente de la Comunidad Valenciana, aprobando el Decreto 240/1994; Ley 10/2000 del 12 de Diciembre del 2000, sobre Residuos de la Comunidad Valenciana.

Los residuos de laboratorios que utilicen agentes biológicos normalmente se clasifican en:

- Residuos biológicos sólidos como residuos urbanos.
- Residuos biológicos sólidos especiales.
- Residuos sólidos no patogénicos provenientes de cultivos microbiológicos.
- Residuos biológicos líquidos.

El procesamiento de residuos para estos distintos tipos de residuos está descrito en el Manual de Seguridad para operaciones en laboratorios de biotecnología y tipo biológico (páginas 70-71).

Para más información, consulte los documentos normativos descritos al inicio de este capítulo.

8. ANEXO

Comunicación serial con la bomba de jeringa

La comunicación serie RS-232 permitirá manejar la bomba a través de un ordenador. Debido a que no todos los ordenadores (sobre todo portátiles) disponen de un puerto serie, se adquirió un adaptador serie a USB. Este adaptador se comporta como un puerto COM y sirve como intermediario de la bomba y el ordenador.

Para realizar la comunicación serie es necesario establecer una velocidad de transmisión. Esta generalmente se expresa en baudios. Se probaron diferentes velocidades de transmisión y finalmente se eligió 1200 baudios. La razón es que a velocidades superiores se producían muchos fallos en la comunicación, impidiendo una comunicación fiable.

La bomba utiliza un protocolo de comunicación que se ha de seguir para poder actuar sobre ella. Este protocolo consiste en mensajes predefinidos que siguen una estructura fija. Estos mensajes realizan acciones como suministrar un volumen, parar la bomba o elegir la velocidad del flujo.

Los comandos que han sido necesarios en el proyecto han sido los siguientes:

VOL [<float>|<volume units>]

Fija la cantidad de volumen a suministrar o fija las unidades del volumen.

UL = μL (microliters)

ML = mL (milliliters)

RAT [<float>[<rate units>]]

Fija la velocidad de flujo o la unidad de la velocidad de flujo.

UM = μ L/min

MM = mL/min

UH = μ L/hr

MH = mL/hr

DIA [<float>]

Fija el diámetro de la jeringa que se está utilizando en milímetros.

DIR INF

Cambia la dirección de la bomba para que inyecte líquido.

DIR WDR

Cambia la dirección de la bomba para que extraiga líquido.

RUN

Ejecuta el programa.

STP

Detiene el programa actual.

CLD

Vacía por completo la jeringa.

Los parámetros <float> deberán tener un máximo de 4 dígitos a la izquierda del punto decimal y 3 dígitos a la derecha.

La comunicación serie necesita de un carácter de fin de mensaje. Este carácter se usa para poder separar los mensajes unos de otros. Siempre que se envíe un mensaje deberá de ser acabado por el carácter de fin de mensaje. En este caso, este carácter viene fijado por el fabricante y es un retorno de carro.

En lenguajes de programación como C se usa “\r” para representarlo.

Comunicación serial con Arduino

En el caso de la comunicación del ordenador al Arduino solo existe un tipo de mensaje. Si Arduino lee el carácter “r” significa que deberá realizar una medida del estado del turbidostato y enviarle posteriormente el resultado por serial al ordenador.

Sin embargo, la comunicación del Arduino al ordenador es más compleja. Esto es debido a que se realizó teniendo en cuenta que en el futuro se podrá tener más de un turbidostato en un mismo Arduino.

Sólo existe un tipo de mensaje y es el siguiente:

`@,s,0,18715,758,\n`

Donde:

@ : identificador de inicio del mensaje

S : indica que se trata de medidas de los sensores

0 : número del turbidostato

, : separador de valores

18715 : valor del fotodiodo en el pin 2

758 : valor del fotodiodo en el pin 3

\n : identificador de fin de mensaje

Dispone de un parámetro que identifica de qué turbidostato se trata.

Además, se tiene otro parámetro que indica el tipo de los valores que se envía, actualmente sólo existen del tipo "s", sensores. Si fuese necesario en el futuro se podría enviar al ordenador otro tipo de información.

Los identificadores de inicio y fin de mensaje son necesarios para poder separar mensajes consecutivos que lleguen al ordenador. Y el separador de valores es necesario para poder pasar más de un parámetro por mensaje.

9. BIBLIOGRAFÍA

Genérico sobre biorreacciones:

J.M. Bruno-Bárcena, E.Picó-Marco, J.L.Navarro, J.Picó,

Título: Microbial dynamic transformations: basic concepts

Ref. libro: Biotechnology,[Ed.Horst W.Doelle , Edgar J. DaSilva],in Encyclopedia of Life Support Systems(EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO

Páginas: 207-238 Fecha: 2007 Editorial: Eolss Publishers, Oxford ,UK

Para los observadores:

Núñez S<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=127](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=127)>, De Battista
H<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=124](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=124)>, Garelli
F<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=3](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=3)>, Vignoni
A<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=128](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=128)>, Picó
J<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=2](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=2)>. 2013. Second-Order Sliding Mode Observer for Multiple Kinetic Rates Estimation in Bioprocesses<<http://sb2cl.ai2.upv.es/content/second->

order-sliding-mode-observer-multiple-kinetic-rates-estimation-bioprocesses>. Control Engineering Practice. 21(9):1259-1265.

*

Picó J<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=2](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=2)>, Picó–Marco E<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=103](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=103)>, Vignoni A<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=128](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=128)>, De Battista H<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=124](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=124)>. 2013. Stability preserving maps for finite-time convergence: super-twisting sliding-mode algorithm<<http://sb2cl.ai2.upv.es/content/stability-preserving-maps-finite-time-convergence-super-twisting-sliding-mode-algorithm>>. Automatica. 49(2):539.

*

De Battista H<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f\[author\]=124](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f[author]=124)>, Picó J<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f\[author\]=2](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f[author]=2)>, Garelli F<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f\[author\]=3](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f[author]=3)>, Vignoni A<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f\[author\]=128](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=1&f[author]=128)>. 2011. Specific growth rate estimation in (fed-)batch bioreactors using second-order sliding observers<<http://sb2cl.ai2.upv.es/content/specific-growth-rate-estimation-fed-batch-bioreactors-using-second-order-sliding-observers>>. Journal of Process Control. 21:1049–1055.

Estrategias de control de turbidostatos:

De Battista H<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=124](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=124)>, Picó J<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=2](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=2)>, Picó–Marco E<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f\[author\]=18](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?f[author]=18)>. 2012. Nonlinear PI control of fed-batch processes for growth rate regulation<<http://sb2cl.ai2.upv.es/content/nonlinear-pi-control-fed-batch-processes-growth-rate-regulation>>. Journal of Process Control. 22:789-797.

De Battista H<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f\[author\]=124](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f[author]=124)>, Picó J<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f\[author\]=2](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f[author]=2)>, Picó–Marco E<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f\[author\]=18](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f[author]=18)>. 2006. Globally stabilizing control of fed-batch processes with Haldane kinetics using growth rate estimation feedback<<http://sb2cl.ai2.upv.es/content/globally-stabilizing-control-fed-batch-processes-haldane-kinetics-using-growth-rate>>. Journal of Process Control. 16:865–875

J.Picó, E.Picó-Marco, J.L.Navarro, H. DeBattista, Control of fed-batch bioreactors. Part I. Capítulo de libro.

Ref. libro: Nonlinear and adaptive control: tools and algorithms for the user, A. Astolfi (Ed.) ISBN: 1-86094-617-8 Páginas: 207-238 Fecha: 2006 Editorial: World Scientific, Gran Bretaña

Picó-Marco E<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f\[author\]=18](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f[author]=18)>, Picó J<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f\[author\]=2](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f[author]=2)>, De Battista H<[http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f\[author\]=124](http://sb2cl.ai2.upv.es/biblio?page=2&f[author]=124)>. 2005. Sliding mode scheme for adaptive specific growth rate control in biotechnological fed-batch processes<<http://sb2cl.ai2.upv.es/content/sliding-mode-scheme-adaptive-specific-growth-rate-control-biotechnological-fed-batch>>. International Journal of Control. 78:128–141.

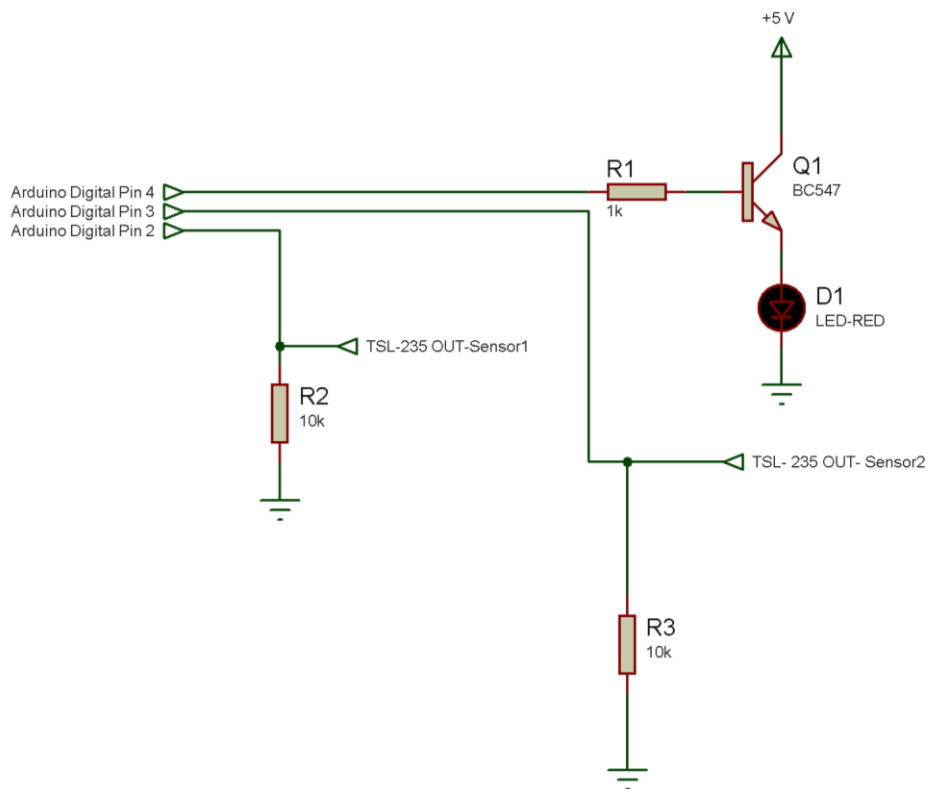
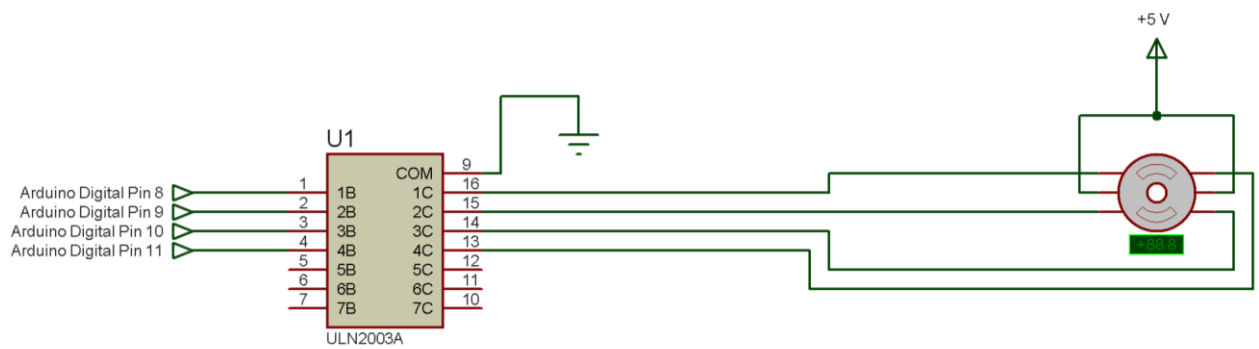
PARTE II PLANOS

1. PLANOS

Introducción

En este apartado se expondrán el plano del proyecto. Cabe destacar que el diseño estructural del turbidostato se realizó en un proyecto anterior al presente proyecto, por esa razón no aparecen aquí los planos.

El único plano que se dispone en el presente proyecto es el esquema de conexión eléctrica general.



	PROYECTO: CONTROL DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS EN MINI-TURBIDOSTATOS	Escala N/A
Autor: Fernando Nóbel Santos Navarro	Plano: Plano del esquema eléctrico general	Plano N°: 1

PARTE III PRESUPUESTO

1. PRESUPUESTO

Introducción

En esta sección se va a realizar un análisis de todos los costes asociados a la construcción y puesta en funcionamiento de un turbidostato. Se dividirá el presupuesto en diferentes unidades funcionales, de esta forma se podrá tener una visión global del coste asociado a cada una de las tareas.

Cabe destacar que se indicará los códigos de referencia y proveedores de donde se realizó la compra de los componentes. De esta forma se pretende facilitar al usuario de este documento la adquisición de todos los elementos necesarios.

El presupuesto está dividido en dos bloques principales, que a su vez estos se encuentran divididos en las unidades funcionales. Se expone a continuación la estructura:

- **Montaje del turbidostato**
 - o Impresión Elementos en 3D
 - o Electrónica
 - o Material de Laboratorio
 - o Mano de Obra
- **Diseño y control**
 - o Software
 - o Programación y control

Costes Parciales

En este apartado se indican los costes asociados cada una de las unidades funcionales.

Impresión Elementos en 3D

Se ha consultado el precio de ABS a los técnicos de impresión 3D en la ETSID.

Unidad	Descripción	Cantidad	Precio Unitario (€/unidad)	Coste (€)
g	Cantidad de Polímero ABS	517,6	0,01816	9,4
			Total	9,4

Electrónica

Unidad	Cód. Referencia	Descripción	Cantidad	Precio Unitario (€/unidad)	Coste (€)
RS Electrónica					
ud	368-0277	Motor paso a paso 5V	1	22,65	22,65
Mouser Electronics					
ud	856-TSL235-LF	Fotodiodo Luz a Frecuencia	2	2,97	5,94
ud	512-BC547B	Transistor NPN BC547	1	0,378	0,38
ud	782-A000066	Arduino Uno REV 3	1	22,18	22,18
Farnell Electronics					
ud	2425404	Cable Unifilar	20	0,0875	1,75
ud	1094421	Driver Motores ULN2003A	1	0,618	0,62
paquete de 10	130515	Paquete Jeringa Vacía 10 mL	1	13,75	13,75
Ebay					
paquete		Kit Resistencias 20 Valores	1	6,49	6,49
Acuarios Verdemar					
ud		Aquarium Air Pump aPUMP	1	15,95	15,95
New Era					
ud	NE-1000	Programable Single Syringe Pump	1	628,28	628,28
digiKey					
ud	VLM-650-03-LPA-ND	LASER MODULE 650NM CLASS IIIA	1	18,31	18,31
Electrónica Gimeno					
ud		PLACA PERFORADA TOPOS BAQUELITA	1	5,6	5,6
				Total	741,89

Material de Laboratorio

Unidad	Descripción	Cantidad	Precio Unitario (€/unidad)	Coste (€)
ud	Vasijas de vidrio	1	39,99	39,99
ud	Tapón de silicona	1	1,59	1,59
Total				41,58

Mano de obra

Se necesita de un perfil técnico con conocimientos básicos de electrónica para realizar el montaje tanto físico como electrónico del turbidostato.

El precio de las horas ha sido calculado a partir del salario medio de un técnico del Departamento de Sistemas y Automática de la UPV.

Unidad	Descripción	Cantidad	Precio Unitario (€/unidad)	Coste (€)
h	Tiempo de técnico	20	50	1000
Total				1000

Software

Durante el desarrollo del proyecto se hizo un uso frecuente de Matlab para toda la etapa de diseño del control. Por otro lado, se usó puntualmente AutoCad para generar los archivos. stl, necesarios para la impresión 3D de las piezas del turbidostato.

Unidad	Descripción	Cantidad	Precio Unitario (€/unidad)	Coste (€)
ud	Licencia estándar de Matlab	1	2000	2000
ud	Licencia estándar de AutoCad	1	3995	3995
Total				5995

Diseño y Control

Se necesita un ingeniero con conocimientos de programación y de teoría de control para realizar los ajustes necesarios para que el controlador y el observador funcione.

Unidad	Descripción	Cantidad	Precio Unitario (€/unidad)	Coste (€)
ud	Tiempo de Ingeniero Superior	10	80	800
Total				800

Coste Total

Nº Unidad Funcional	Descripción	Coste (€)
Montaje turbidostato		
1	Impresión Elementos en 3D	9,39
2	Electrónica	741,89
3	Material Laboratorio	41,58
4	Mano de Obra	1000
Diseño y Control		
5	Software	5995
6	Programación y control	800
Presupuesto de Ejecución Material		8587,87
	<i>IVA (21%)</i>	<i>1803,45</i>
Presupuesto Total		10391,32

El coste total del proyecto asciende a DIEZ MIL TRESCIENTOS NOVENTA Y UN EUROS CON TREINTA Y DOS CÉNTIMOS.