

SIMULACION DEL CRECIMIENTO DE AEROBACTER CLOACAE

Alberto Duarte Torres, I.Q., M.Sc.
Profesor Titular
Departamento de Ingeniería Química
Universidad Nacional de Colombia

INTRODUCCION

El propósito de este artículo es presentar los resultados obtenidos mediante la simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae*, con el programa: C:\GWBASIC\HERBERT.BAS, y analizar algunos factores tales como caudal, tiempo de retención y productividad, relacionados con el diseño y operación de reactores donde ocurren transformaciones bioquímicas originadas por la acción de células vivas.

REACTOR POR LOTES

En un reactor por lotes normalmente equipado con un agitador y un sistema de control de pH la composición del caldo es uniforme. Por consiguiente, se supone que el modelo de Monod (Monod, J., 1958) describe adecuadamente el crecimiento de biomasa en la fase exponencial de crecimiento:

$$r_x = \mu \cdot x = \frac{\mu_M \cdot x \cdot S}{K_s + S} \quad (1)$$

Donde, x: concentración de biomasa, (g células secas/litro); μ : velocidad específica de crecimiento de biomasa, hora⁻¹; μ_M : velocidad específica de máxima de crecimiento de biomasa, hora⁻¹; s: concentración del sustrato, g/litro; K_s = constante de saturación, g/litro.

Las células inician su crecimiento exponencial después del período de adaptación una vez inoculado el caldo con un cultivo semilla:

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{r_x}{x} = \mu \quad (2)$$

$$\int \frac{dx}{r_x} = \int_{t_0}^t dt = t - t_0$$

Donde, t_0 : período de adaptación; t - t_0 : período de retención en el reactor por lotes, representado gráficamente como el área bajo la curva $1/r_x$ vs x, (Figura 2).

La simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* se realiza mediante el reemplazo de F = 0 en el programa C:\GWBASIC\HERBERT.BAS, resumido en la Tabla 1. Los resultados de la simulación se presentan en las Figuras 1 y 2.

REACTOR CONTINUO DE FLUJO TAPON

En el reactor continuo de flujo tapón los nutrientes y los microorganismos entran por un extremo, las células crecen a medida que avanzan dentro del reactor, y salen junto con los productos del metabolismo por el extremo opuesto.

La ausencia de agitación impide la mezcla completa del contenido del reactor. La concentración de células, de sustrato y de producto varía en las direcciones axial y radial.

Si el reactor es operado en condiciones estables y se desprecia la variación de la concentración en la dirección radial, entonces estas concentraciones cambian con respecto a la posición axial dentro del reactor pero permanecen constantes en cada punto con respecto al tiempo. Las concentraciones en cada punto del reactor en la dirección axial son similares a las alcanzadas en un fermentador por lotes en igual tiempo de residencia.

En la práctica el comportamiento de los fermentadores de lecho empacado y multietapa se aproxima al de flujo tapón (PFR) y las ecuaciones correspondientes a un reactor por lotes (Ecuaciones [1] y [2]) son aplicables al reactor de flujo tapón. Sin embargo, como la operación es continua, el tiempo de retención se calcula como: $T = V/F$; donde: V: volumen del reactor, litros; F:caudal, litros/hora.

En la Figura 2 se representa gráficamente el tiempo de retención como el área bajo la curva $1/r_x$ versus x.

REACTOR CONTINUO DE MEZCLA COMPLETA (CSTR)

El reactor continuo de mezcla completa (CSTR) es uno de los equipos más utilizados a escala industrial, tanto para fermentaciones aeróbicas como anaeróbicas, con microorganismos y con células animales y vegetales. La intensidad de la mezcla se controla mediante una selección adecuada del impulsor y de la velocidad de agitación. El sistema de

cultivo continuo operado como quimiostato o como turbidostato mantiene la población microbial en un estado de crecimiento exponencial durante períodos prolongados de tiempo. En el quimiostato el caudal suministrado por la bomba se mantiene en el valor deseado y la velocidad de crecimiento se ajusta a este valor. El turbidostato mantiene constante la turbidez del caldo mediante un sensor óptico y un sistema de control para ajustar el caudal. Aunque el quimiostato es un sistema fácil de operar, se recomienda el turbidostato cuando hay necesidad de ajustar la fermentación a velocidades de dilución cercanas al punto de lavado. En este punto la pérdida de células en el efluente supera el crecimiento de las mismas en el fermentador, fenómeno previsible mediante la regulación del caudal. Las ecuaciones de balance de microorganismos y de sustrato en el reactor continuo de mezcla completa (Figura 3), son:

Entradas - Salidas + Crecimiento o consumo = Acumulación

$$F.x_a - F.x + V.r_x = \frac{dx}{dt}$$

$$\mu.x - D.x = \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

$$F.s_a - F.s - \frac{V.r_x}{Y_{x/s}}$$

$$= V \cdot \frac{ds}{dt}$$

$$D.s_a - D.s - \frac{\mu \cdot x}{Y_{x/s}}$$

$$= \frac{ds}{dt} \quad (4)$$

$$\text{Donde: } D = \frac{F}{V}; \quad \mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

$$\text{Monod: } \mu = \frac{\mu_m \cdot s}{K_s + s}$$

Donde, $F.x_A$: microorganismos en el afluente; F: caudal, m³/s; x_A : concentración de microorganismos en el afluente, kg células/m³; $F.x$: microorganismos en el efluente; x: concentración de células en el reactor; V: volumen del caldo, m³; r_x : velocidad de crecimiento de las células en el fermentador; dx/dt : cambio con respecto al tiempo de la concentración de células en el fermentador; D: velocidad de dilución, s⁻¹; $D = 1/T$; T: Tiempo de retención, s;

En condiciones estables, los microorganismos crecen a una velocidad suficiente para reemplazar los que salen en el efluente ($dx/dt = 0$). Además si el alimento es estéril ($x_A = 0$) el tiempo de retención se calcula como: $T = x/r_x = 1/\mu$; el tiempo de residencia en el reactor continuo de mezcla completa (CSTR) es igual al área de un rectángulo de anchura x y altura $1/r_x$, tal como se indica en la Figura 5.

Las ecuaciones [3] y [4] definen el comportamiento de un cultivo continuo. Si en estas ecuaciones se

mantienen constantes s y D , y D no excede un cierto valor crítico, existen valores únicos, x_e y s_e , para los cuales dx/dt y ds/dt son iguales a cero, es decir el sistema corresponde a un estado estable:

$$s_e = K_s \cdot \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right)$$

$$x_e = Y_{x/s} \cdot (s_a - s) \quad (5)$$

$$= Y_{x/s} \cdot \left(s_a - K_s \cdot \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right)$$

REACTOR POR LOTES CON ALIMENTACION CONTINUA

Uno de los métodos empleados con mayor frecuencia en la operación semicontinua de fermentadores es la operación de un reactor por lotes con alimentación continua (fed-batch) ilustrado en la Figura 7. Si la concentración del alimento es alta, el volumen efectivo de caldo en el reactor no cambia apreciablemente. Generalmente se utiliza una de las siguientes estrategias de alimentación con el propósito de controlar el reactor: caudal constante o caudal linealmente creciente; caudal exponencialmente creciente con el objeto de mantener constante la concentración de sustrato y alcanzar un crecimiento exponencial; caudal controlado por alguna respuesta del sistema como, por ejemplo, el cociente respiratorio, la composición de los gases efluentes, o la concentración de algún

producto; caudal cíclico o en lotes repetidos.

Después de cada período de operación el reactor se desocupa parcialmente y entonces se alimenta sustrato para recuperar el volumen inicial. A causa de la baja solubilidad del oxígeno, la operación semicontinua, en el caso de fermentaciones aeróbicas, incluye generalmente la modalidad de alimentación continua de aire o de oxígeno.

Las concentraciones en cada punto del reactor en la dirección axial son similares a las alcanzadas en un fermentador por lotes en igual tiempo de residencia.

REACTOR CONTINUO DE MEZCLA COMPLETA CON RECIRCULACION

Cuando se disminuye el tiempo de retención en un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) aumenta la productividad celular hasta alcanzar un

valor máximo. Sin embargo, si el tiempo de retención disminuye ligeramente después de alcanzar este valor máximo, la velocidad de generación de células es inferior a la velocidad de salida de células en el efluente del reactor y la productividad disminuye rápidamente debido al «lavado» de las células del reactor.

Un procedimiento para aumentar la productividad es recircular las células después de separarlas del efluente mediante un filtro u otro sistema de separación (Figura 9). La velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración de células, x , y al aumentar x aumenta la productividad. Por consiguiente, el reactor CSTR se puede operar en condiciones estables sólo si hay una recirculación parcial y una corriente efluente, E , tal como se muestra en la Figura 9.

En este caso, el balance de materiales del fermentador es:

$$F \cdot x_A - E \cdot x + V \cdot \mu \cdot x = V \cdot \frac{dx}{dt} \quad (6)$$

Donde, F : afluente al reactor, litros/hora; E : efluente del reactor; x_A , x : concentración de células en el afluente y en el reactor, respectivamente, g/litro; V : volumen de caldo en el reactor, litros; μ : velocidad específica de crecimiento de células, (hora)⁻¹; dx/dt : incremento de la concentración de células en el reactor, g/(litro.hora).

Si el reactor se opera en condiciones estables, $dx/dt = 0$, con alimentación estéril, $x_A = 0$, la ecuación anterior se convierte en :

$$\frac{E}{F} = B = \frac{\mu}{D}; \mu = \frac{B}{\tau} \quad (7)$$

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

Donde, T : tiempo de retención, horas; D : velocidad de dilución, hora⁻¹; B : relación de recirculación. Si $B = 1$, no hay recirculación y $D = \mu$.

Si la velocidad de crecimiento sigue la cinética de Monod se obtiene la siguiente ecuación para evaluar la concentración de sustrato después de reemplazar $\mu = B \cdot D$ en la ecuación de Monod:

$$s = \frac{B \cdot K_s}{\tau \cdot \mu_M - B} \quad (8)$$

Esta ecuación es válida para $\tau \cdot \mu > B$. La concentración de células en el reactor se calcula a partir del coeficiente de rendimiento $Y_{x/s}$:

$$Y_{x/s} = \frac{x}{s_A - s} \cdot \frac{E}{F} \quad (9)$$

$$x = V \cdot \frac{Y_{x/s}}{B} \cdot (s_A - s)$$

En la Figura 10 se presenta el efecto de la relación de recirculación sobre la concentración de células y la productividad en la simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) con recirculación ($F = 160$ litros/hora, $s_0 = 3$ g/litro).

En el caso especial de $B = 1$, no hay recirculación de células y: $\mu = D = 1/\tau$. La concentración de células y la productividad se duplican en el caso de $B = 0,5$, ($\mu = B \cdot D = B/\tau$).

SIMULACION

Herbert et al., 1956., informan los siguientes datos correspondientes a la cinética de crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un medio de crecimiento con glicerol como sustrato limitativo: μ_M : 0,85 hora⁻¹; K_s : 0,0123 g/litro; $Y_{x/s}$: 0,53 (g biomasa seca)/(g glicerol).

- Simular el crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes y en un reactor de flujo tapón. Simular el crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes con alimentación continua: $F = 160$ litros/hora, $s_0 = 3$ gramos glicerol/litro).

La simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* se realiza mediante el programa C:\GWBASIC\HERBERT.BAS, resumido en la Tabla 1. En la Figura 8 se representa el volumen de caldo en el reactor, y la variación de la masa de glicerol y de microorganismos con respecto al tiempo de retención. Los resultados son obtenidos con el programa C:\GWBASIC\HERBERT.BAS, en el caso de $F = 0$.

CONCLUSIONES

- El reactor continuo de mezcla completa (CSTR) operado a una concentración de producto correspondiente a $(1/r_x)_{\text{mínimo}}$, es el sistema más productivo ya que requiere el menor tiempo de residencia (Figura 5).

- Cuando hay necesidad de alcanzar una concentración de producto

(células), X_F , en el período de crecimiento estacionario, se logra mayor productividad en el fermentador por lotes (Figura 2) que en el sistema de reactor continuo de mezcla completa (Figura 6).

- La selección del sistema óptimo de fermentación depende de los requerimientos del proceso tales como el grado de conversión deseado o la concentración final del producto, y de la forma de la curva $1/r_x$ versus x . Si la concentración final del producto es menor que la correspondiente a $(1/r_x)_{\text{mínimo}}$, es más eficiente un solo fermentador que dos conectados en serie.

- Sin embargo, si la concentración final de producto (X_F) es mucho mayor que la correspondiente a $(1/r_x)_{\text{mínimo}}$, la mejor combinación para lograr el mínimo tiempo de retención es un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) operado a una concentración de producto, $x_{\text{óptimo}}$, correspondiente a $(1/r_x)_{\text{mínimo}}$, seguido de un reactor de flujo tapón (PFR), (Figura 12).

- Aunque la Figura 12 ilustra el procedimiento de evaluación del tiempo total de retención del sistema de reactores CSTR y PFR en serie, debe tenerse presente que en el caso particular de la simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae*, $X_F \approx X_{\text{óptimo}}$, y, por consiguiente, solo es necesario un reactor.

- De la figura 13 se deduce que un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) operado a una concentración de producto correspondiente a $(1/r_x)_{\text{mínimo}}$ seguido de otro reactor CSTR conectado en serie es un sistema más eficiente que un sólo reactor CSTR.

Tabla 1 Simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes con alimentación continua, programa :

C:\GWBASIC\HERBERT.BAS.

```

10 CLS
20 PRINT «HERBERT.BAS»
30 PRINT
40 PRINT «Cinética de crecimiento de Aerobacter
cloacae»
50 PRINT
60 PRINT
70 PRINT «CRECIMIENTO POR LOTES SIN
FORMACION DE PRODUCTO»
80 PRINT «CON ALIMENTACION CON-
TINUA»
90 PRINT « SIN FORMACION DE
PRODUCTOS NO CELULARES»
100 PRINT
110 PRINT «PULSE ENTER !»
120 ANS$ =INPUT$(1)
130 CLS
140 NN = 1
150 REM Escribir las constantes: UMX: 1 /hora;
KS:g/litro
160 REM Y:g microorganismos/g glicerol;
VO:volumen inicial, litros
170 REM S0: g glicerol/litro;X0: g
microorganismos/litro
180 REM F:caudal, litros/hora; MX: masa de
microorganismos, g
190 REM MS: masa de sustrato, g
200 UMX=.85
210 KS=.0123
220 Y=.53
230 VO= 100
240 S0 = 3
250 X0=.1
260 F= 160
270 REM Paso de integración: T1
280 T1=.01
290 REM Valor final de la variable independiente:
T2
300 T2 = 6.5
310 REM Intervalo de impresión de los resultados:
T3
320 T3=.5
330 PRINT « HERBERT. BAS»
340 PRINT
350 PRINT «T: variable independiente (tiempo,
horas)»
360 PRINT «Valor final de T, T2=>»T2
370 PRINT «T1: paso de integración, T1 =>»T1
380 PRINT «T3: intervalo de impresión, T3=>»T3
390 PRINT
400 PRINT «PULSE ENTER !»
410 ANS$ = INPUT$(1)
420 CLS
430 PRINT «RESULTADOS»
440 PRINT
450 PRINT «T: tiempo, horas»
460 PRINT «V: volumen del caldo, litros»
470 PRINT «X: concentración de células, g/litro»
480 PRINT «S: concentración de glicerol, g/litro»
490 PRINT «MS: masa de sustrato, g»
500 PRINT «MX: masa de células,g»
510 REM Numero de ecuaciones diferenciales:
520 N=5
530 REM condiciones iniciales: 01 = S;0(2) = X;
0(3): volumen
540 0(1) =S0
550 0(2)=X0
560 0(3) = VO
570 0(4)=VO*S0
580 0(5) = V0*X0
590 REM Subrutina de Runge-Kutta de orden 4:
600 T = INT(T2/T1 + .5):T1 = T2/T:T = INT(T3/
T1 + .5):T3 = T *T1:T = 0:T4 = 0
610 T8 = 1:GOTO 860
620 IF(T-T4 + T1 /10) < 0 THEN 660
630 T4=T4+T3:T5 =INT(T/T1 +.5):T=T5*T1
:GOSUB 960
640 IF(T-T2 + T1 /10) < 0 THEN 660
650 LOCATE 23,1:END
660 ON T8 GOTO 680,720,760,800
670 PRINT» * * ERROR * *»:STOP
680 FOR T5 = 1 TO N
690 T0(T5)=T1 *I(T5):T6(T5) =O(T5):0(T5)
=O(T5) +T0(T5)/2
700 NEXT T5
710 T=T+T1/2:T8=2:GOTO860
720 FOR T5 = 1 TO N
730 T7 = T1 * I(T5):T0(T5) = T0(T5) + 2
*T7:0(T5) = T6(T5) + T7/2
740 NEXT T5
750 T8 = 3:GOTO 860
760 FOR T5 = 1 TO N
770 T7 =T1 *I(T5):T0(T5) =T0(T5) +
2*T7:0(T5) =T6(T5) +T7
780 NEXT T5
790 T8 = 4:T = T + T1 /2:GOTO 860
800 FOR T5 = 1 TO N
810 0(T5) =T6(T5) + (T0(T5) + T1 * I(T5))/6
820 NEXT T5
830 T8 = 1 :GOTO 860
840 REM ECUACIONES DIFERENCIALES:
850 REM I(1):RS; I(2):RX;
I(3):F;I(4)=VX':I(5)=VS'
860 I(1) = -I (2)/Y
870 I(2) = U *0(2)
880 I(3) = F
890 U = (UMX*0(1))/(KS + 0(1))
900 I(4) = 0(3) * I(1) + 3 * I(3)
910 I(5) = 0(3) * I(2)
920 0(1) =0(4)/0(3)
930 0(2) =0(5)/0(3)
940 GOTO 620
950 PRINT
960 PRINTSPC(3);»T= «;T;SPC(3);»V =
«;0(3);SPC(3);»X=>»0(2);SPC(3);
«S=>»0(1);SPC(3); «MS = «;0(4); SPC(3);»MX
= «;0(5)
970 NN =NN + 1
980 RETURN

```

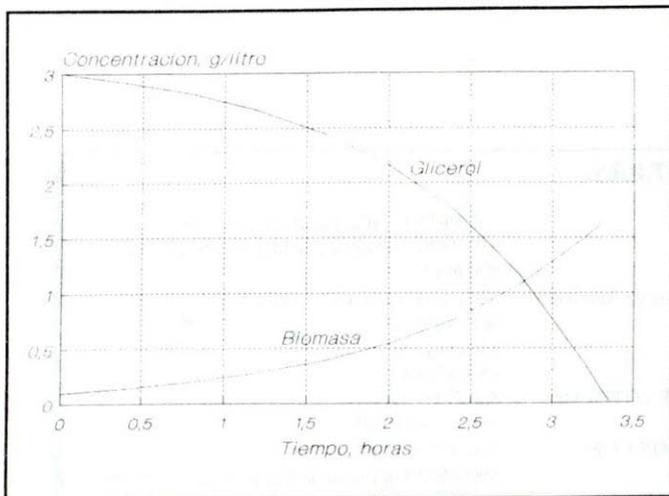


Figura 1 Representación gráfica de los resultados obtenidos en la simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes ($F = 0$), programa: C:\GWBASIC\HERBERT.BAS. Variación de la concentración de células y de sustrato con respecto al tiempo de retención.

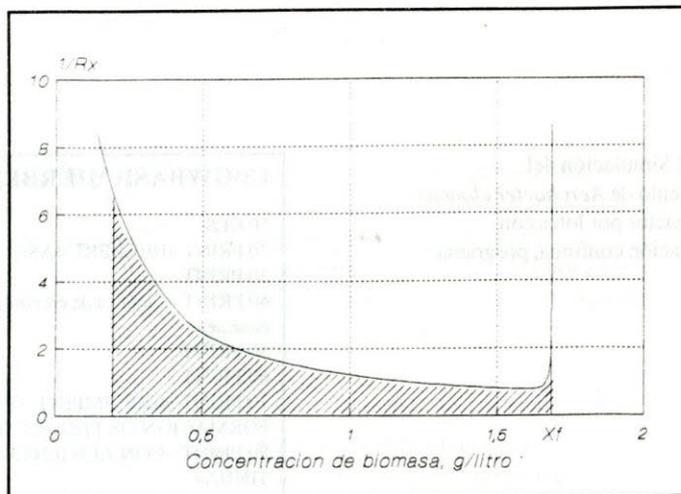


Figura 2 Representación gráfica de los resultados obtenidos en la simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes, programa: C:\GWBASIC\HERBERT.BAS. El tiempo de retención requerido corresponde al área bajo la curva $1/r_x$ vs x .

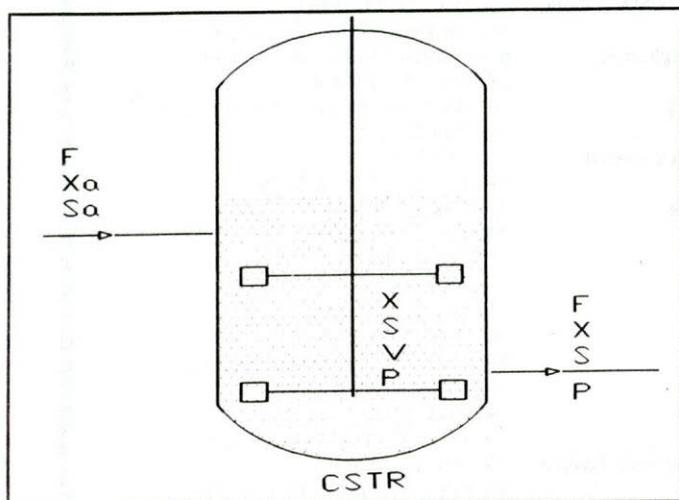


Figura 3 Representación esquemática de un reactor continuo de mezcla completa (CSTR)

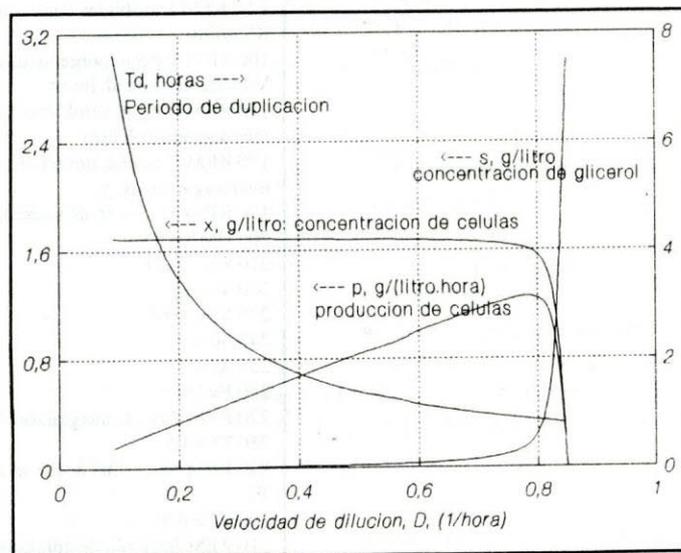


Figura 4 Simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor de mezcla completa (CSTR). Los valores de la concentración de células y de sustrato a diferentes velocidades de dilución, en condiciones estables, se calculan mediante la ecuación [5] con los siguientes datos: $\mu_M = 0.85$ hora⁻¹; $Y_{xs} = 0.53$; $s_0 = 3$ (g glicerol)/(litro); $x_0 = 0.1$ (g microorganismos)/(litro).

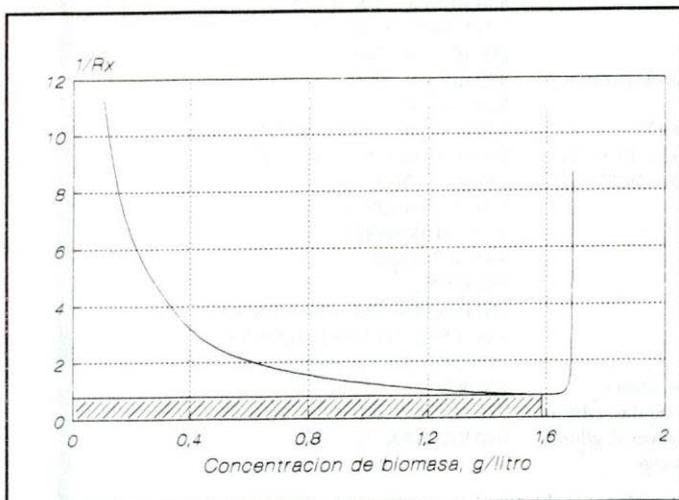


Figura 5 Simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae*, con el programa: C:\GWBASIC\HERBERT.BAS. El mínimo tiempo de retención requerido en el reactor continuo de mezcla completa (CSTR), calculado con los datos del Ejemplo, corresponde al área de un rectángulo de anchura $x = 1.586$ g producto/litro y altura $1/r_x = 0.784$ (litro.hora)/g, esta área es mínima cuando $1/r_x$ es mínima, como se muestra en la Figura.

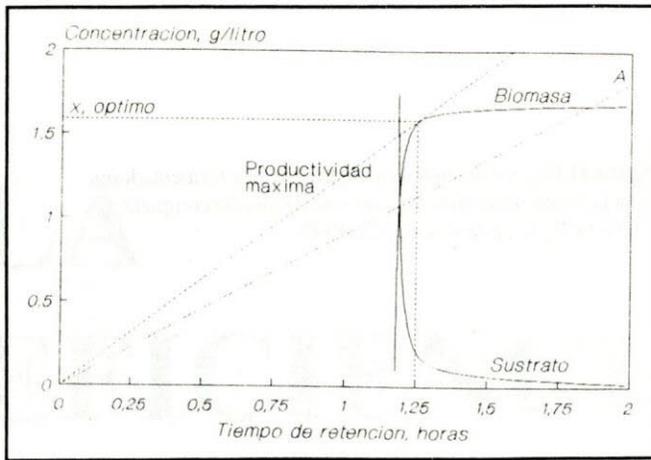


Figura 6 Simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor continuo de mezcla completa (CSTR), calculado con los datos del Ejemplo. La máxima productividad es igual a la pendiente de la línea tangente a la curva de concentración de producto. Los valores óptimos de la concentración de producto ($x = 1,586$ g producto/litro) y de tiempo de retención ($t = 1,25$ horas) coinciden con los obtenidos en la Figura 5.

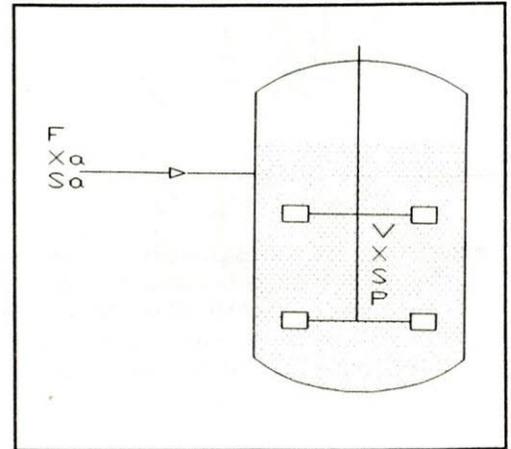


Figura 7 Representación esquemática de un reactor por lotes con alimentación continua.

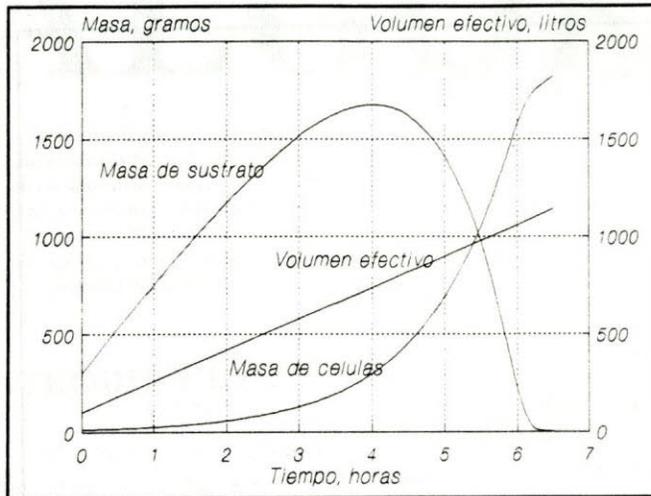


Figura 8 Simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor por lotes con alimentación continua $\sim F = 160$ litros/hora, $S_0 = 3$ gramos/litro), programa: C:\GWBASIC\HERBERT. BAS.

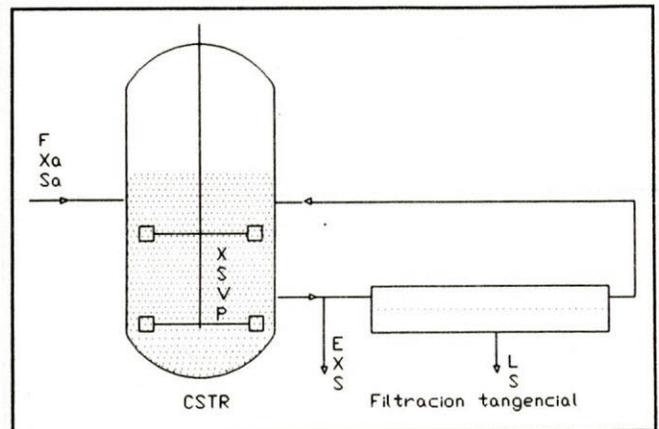


Figura 9 Reactor continuo de mezcla completa con recirculación

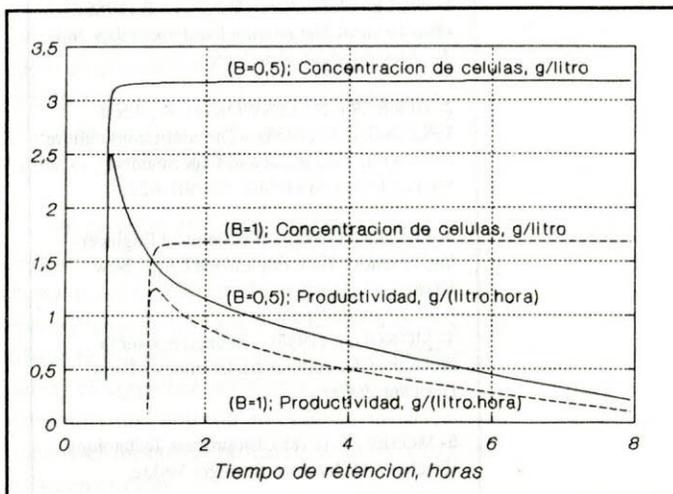


Figura 10 Simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae* en un reactor continuo de mezcla completa (CSTR) con recirculación ($F = 160$ litros/hora, $S_0 = 3$ gramos/litro). Efecto de la relación de recirculación B sobre la concentración de células y la productividad.

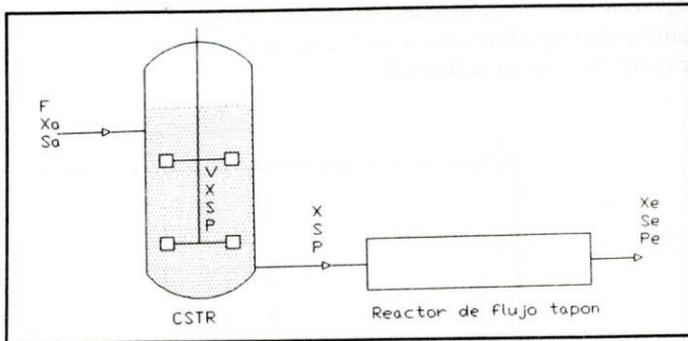


Figura 11 Representación esquemática de dos fermentadores conectados en serie: Reactor continuo de mezcla completa (CSTR) y Reactor de flujo tapón (PFF).

Figura 12 Representación gráfica de los resultados obtenidos en la simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae*, con el programa: C:\GWBASIC\HERBERT.BAS. Tiempo total de retención requerido por el sistema de fermentador continuo de mezcla completa (CSTR) y un reactor de flujo tapón (PFF) conectado en serie.

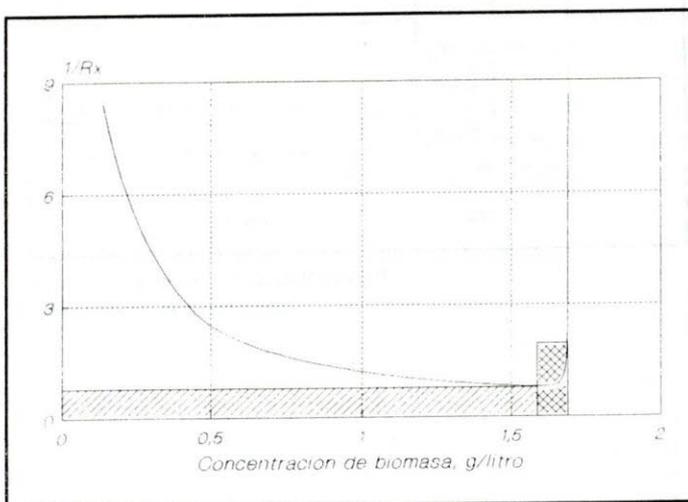
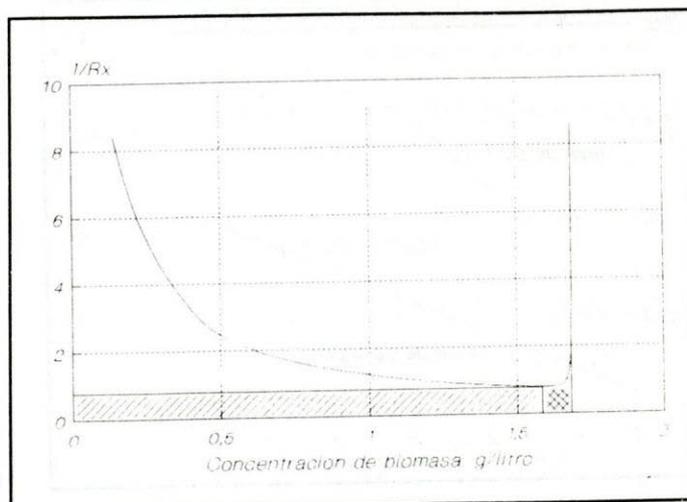


Figura 13 Representación gráfica de los resultados obtenidos en la simulación del crecimiento de *Aerobacter cloacae*, con el programa: C:\GWBASIC\HERBERT.BAS. Tiempo total de retención requerido por el sistema de dos fermentadores continuos de mezcla completa (CSTR) conectados en serie.

BIBLIOGRAFIA

- 1- BAILEY, J. E., AND OLLIS, D. F. (1986). «Biochemical Engineering Fundamentals,» 2nd. de., McGraw-Hill, New York .
- 2- HERBERT, D., ELSWORTH, R., AND TELLING, R.C. (1956), «The continuous culture of bacteria; a Theoretical and Experimental Study,» J. Gen. Microbio/. 14: 601-622.
- 3- LEE, J.M. (1992). «Biochemical Engineering,» Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- 4- MONOD, J. (1958). «Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes,» Paris., Hermann & Cie.
- 5- MOSER, A. (1988). Bioprocess Technology, Kinetics and Reactors, Springer Verlag.