

Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida

Dayana Acebo-González y Armando T. Hernández-García.

Área de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Bioquímica, Centro Nacional Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, La Habana. dayana.acebo@cnic.edu.cu

Recibido: 23 de agosto de 2012.

Aceptado: 2 de noviembre de 2012.

Palabras clave: métodos turbidimétricos, sistemas ópticos, bioprocesos, cultivo celular, microbiología predictiva.

Key words: turbidimetric methods, optical systems, bioprocessing, cell culture, predictive microbiology.

RESUMEN. El desarrollo de la industria biotecnológica ha propiciado la necesidad de contar con herramientas analíticas cada vez más rápidas y potentes, que permitan estimar de manera más eficaz el crecimiento celular en el transcurso de los bioprocesos. En tal sentido, las técnicas turbidimétricas constituyen herramientas muy útiles que satisfacen tales expectativas y que se aplican en las ciencias de la vida. Los sistemas para la medición de turbidez operan sobre la base de los fenómenos ópticos que se producen al incidir un haz de luz a través de un medio. La luz se dispersa debido a la existencia de partículas suspendidas en el interior del medio en análisis, que también intervienen en la reducción de la intensidad del haz de luz resultante. La manera en que la muestra suspendida en el medio interfiere con la luz está relacionada con el tamaño, la forma, la composición de las partículas en la suspensión y la longitud de onda de la luz incidente. En el presente trabajo se muestra el estado del arte en relación con el desarrollo y el uso de las técnicas turbidimétricas en el cultivo de células. Las técnicas turbidimétricas se diferencian por la geometría del detector de luz utilizado. El avance de los sistemas ópticos ha conducido a su empleo eficaz para la obtención de información en distintos campos de medición incluidos los procesos biotecnológicos. De esta manera, los métodos turbidimétricos constituyen una alternativa en la obtención de información y el control de los sistemas biotecnológicos.

ABSTRACT. The development of the biotechnological industry has favored the need of having analytical tools, increasingly fast and powerful, which allows a more effective estimation of cell growth during bioprocesses. In this regard, turbidimetric techniques are very useful tools that fill such expectations and can be applied to life sciences. Systems for measuring turbidity are based on optical phenomena resulting from passing a beam of light through the culture medium. Light becomes scattered, due to the presence of foreign particles suspended in the medium under analysis thereby reducing the intensity of the emerging light. The manner in which a sample, suspended in medium, interferes light is then related to size, shape and composition of particles in suspension as well as the wavelength of the incident light. This paper describes the state of art of the development and use of turbidimetric techniques in cell culturing. Turbidimetric techniques differ one each other in geometry of the light detector used. The development of optical systems has led to an effective use in order to have information on various measurement fields including biotechnological processes. Therefore, turbidimetric methods constitute an alternative way for obtaining information and controlling biotechnological systems.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas ópticas de medición se utilizan desde hace años para obtener cierta información de un objeto, teniendo en cuenta la existencia de fenómenos ópticos y las propiedades que presenta la luz. Los fenómenos ópticos implican la interacción de la luz con un medio. Al atravesar una muestra el haz luminoso, ocurre la absorción, la fluorescencia o la dispersión que junto a las propiedades ondulatorias (amplitud, fase, polarización, longitud de onda) ofrecen un mundo rico en información.¹

La medición de la turbidez, inicialmente comenzó a utilizarse para proporcionar una evaluación básica de la calidad del agua. Los primeros turbidímetros se desarrollaron en la década del 60 del siglo XX y la tecnología óptica fundamental se mantuvo sin cambios hasta mediados de los años 80. Desde entonces, el desarrollo tecnológico de estos instrumentos ha avanzado de manera agigantada. Nuevos diseños de turbidímetros han evolucionado en cuanto a la tecnología utilizada (fuentes de luz y el diseño del detector) y se han utilizado para compensar o eliminar las interferencias asociadas al análisis de la turbidez (ejemplo: color de la muestra, burbujas en la muestra que desvían la luz y longitud de onda), que a menudo hacen difícil la comparación de las mediciones realizadas.²

Las técnicas ópticas tradicionales de medición han experimentado un renacimiento debido al fuerte desarrollo de las fuentes y los detectores de luz, así como de nuevos elementos de tipo óptico. Los avances en la nanotecnología han abierto nuevos campos como la nanomedicina y la tomografía óptica, impulsando una creciente demanda para el desarrollo de la medición óptica y de la tecnología de imagen en las ciencias de la vida. En general, son técnicas rápidas, sin contacto y no destructivas para el medio ambiente.³ Los recientes acontecimientos en las técnicas ópticas, como: las sondas de densidad óptica, los biosensores ópticos, los sensores de fibra óptica, infrarrojos y de fluorescencia, demuestran la creciente importancia que presentan los sistemas de sensores ópticos en el registro de los procesos biotecnológicos. Estos ofrecen la posibilidad de un seguimiento continuo del proceso sin perturbación alguna y cercano al valor real.⁴ El objetivo de esta revisión consistió en mostrar el estado del arte en cuanto a las técnicas de medición de turbidez aplicadas a las ciencias de la vida, especialmente, a los bioprocesos.

MEDICIÓN DE TURBIDEZ

Definición de turbidez

La turbidez se define por la Organización Internacional de Normalización (ISO), como la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido.⁵ Al ser un indicador de apariencia óptica, ocasionado por la dispersión y absorción de la energía lumínica a través del líquido, la turbidez solo puede ser medida usando técnicas ópticas.⁶ Se fundamenta en la relación de la intensidad de la luz incidente y de la luz dispersada por el medio, mediante la ley de Lambert-Beer (Ecuación 1), en la que la turbidez es proporcional a la concentración de partículas.⁷⁻⁹ Un haz de radiación monocromática paralelo con intensidad I_0 llega al medio absorbente perpendicular a la superficie; luego pasa a través de la longitud X del medio, que contiene partículas absorbentes que bloquearán la transmisión de la luz (átomos, iones o moléculas), la intensidad del haz disminuye a I como resultado de la absorción y la dispersión. Si el material se compone de partículas con diferentes coeficientes de absorción y de dispersión, el coeficiente total de absorción y de dispersión, (α_A y α_B), es igual a la suma de los coeficientes de absorción y de dispersión de todas las partículas.¹⁰

$$I = I_0 e^{-[\alpha_A + \alpha_B]xc} \quad (1)$$

dónde:

I intensidad de la luz resultante.

I_0 intensidad de la luz en el punto 0.

0 punto de partida del paso de luz a través del medio absorbente.

X longitud del medio o distancia del viaje de la luz a través del medio.
 C concentración del medio.
 αA coeficiente de absorción.
 αB coeficiente de dispersión.

La proporcionalidad entre la intensidad de la luz incidente y la luz dispersada por el medio depende del tamaño y de la forma de las células que se encuentren en el medio que se esté analizando, que también puede ser afectada por las condiciones ambientales. La correlación entre la concentración de partículas y la turbidez, también llamada calibración, depende, en el caso del análisis de cultivos bacterianos, de las especies bacterianas que se estén analizando, y en ocasiones, incluso de la cepa específica utilizada.¹¹ La medición de turbidez se usa para estimar los indicadores de crecimiento de bacterias como una alternativa a los recuentos de las placas tradicionales. Su utilización se ha incrementado como nueva tendencia en la microbiología predictiva y ha comenzado a centrarse en la cuantificación de la variabilidad de las respuestas bacterianas en los entornos de los alimentos y otros productos industriales.¹¹⁻¹²

La unidad de medición estándar para la turbidez es la Unidad Nefelométrica de Turbidez (UNT). Aunque también se utilizan otras unidades de medida para la turbidez establecidas por regulaciones y estándares, como, Total de Sólidos Suspendidos (SST) y Concentración de sedimento en suspensión (SSC).¹²

Principio de medición de turbidez

Cuando el haz de luz atraviesa el fluido de la muestra (Fig. 1), los sólidos suspendidos dispersan la luz en todas direcciones. La reducción de la intensidad del haz de luz se debe a la difusión del haz por dichos sólidos suspendidos en el medio. Sin embargo, la absorción de la radiación incidente por sustancias coloreadas disueltas, también reduce la intensidad de la luz y debe tenerse en cuenta para contrarrestar este efecto, de forma manual o automática.¹³ En el análisis de bajas cantidades de sólidos suspendidos, se suele usar la medida de la luz dispersa, debido a que los fotodetectores detectan pequeños cambios de la intensidad de la luz en contraste con un fondo oscuro. Sin embargo, este método tiene como desventaja que con grandes cantidades de sólidos disueltos en la muestra, se produce una dispersión múltiple que limita la cantidad de luz que recibe el detector.¹³ A elevadas concentraciones de sólidos suspendidos, se deben emplear métodos de medición alternativos, tales como los de absorción.¹³⁻¹⁴

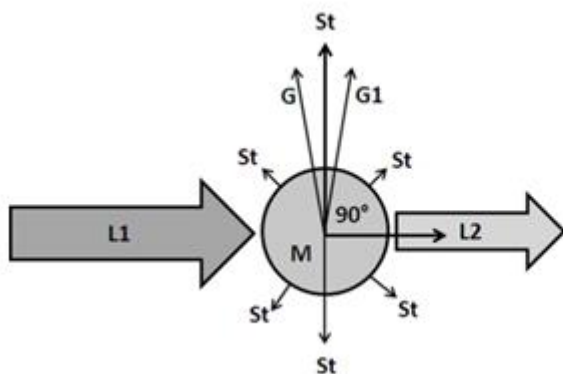


Fig. 1. Efectos de luz al atravesar la muestra.⁶ **L1** Haz de luz incidente sobre la muestra. **L2** Haz de luz que ha pasado a través de la muestra. **M** Muestra en análisis. **St** Luz difundida por las partículas suspendidas en la muestra. **G** y **G1** Rayos periféricos del haz de luz difundido.

Técnicas turbidimétricas de medición

La turbidez se mide utilizando las técnicas de turbidimetría o nefelometría. La relación directa entre los datos de turbidez y la concentración de sólidos suspendidos depende de muchos factores, entre los cuales se incluye el tamaño de las partículas, la forma, la distribución y el estado de la superficie, índice de refracción de las partículas de dispersión y de la longitud de onda de la luz utilizada.⁵

Hay tres diseños básicos de medidores de turbidez (Fig. 2):

- El nefelómetro cuantifica la intensidad de la luz dispersada por la muestra bajo análisis. El sensor se encuentra montado en un ángulo normalmente de 90° del rayo de luz incidente. Este diseño tiene una precisión limitada a elevadas turbiedades. A medida que aumenta la turbidez aumenta la cantidad de luz dispersa, ocurriendo una dispersión múltiple que disminuye la intensidad de luz difusa que llega al detector situado a los 90° .^{5,14-17}
- El turbidímetro mide la absorbancia de la muestra en estudio. Es uno de los instrumentos más utilizados y la técnica empleada consiste en el uso de un cultivo de microorganismos en un medio líquido, que actúa como una suspensión coloidal, la cual bloquea y refleja la luz que pasa a través de él. La luz es absorbida de manera directamente proporcional a la concentración de células que hay en el cultivo.^{5,14-17}
- El turbidímetro que revela la tasa o relación de intensidades luminosas, mide tanto la transmisión de la intensidad de la luz como su dispersión. Este diseño es muy apropiado para los productos líquidos que presenten colores intensos y para muestras de gran turbidez.⁵ Esta configuración es la clave para obtener buenas características de rendimiento en las mediciones de turbidez, así como una buena estabilidad, linealidad, sensibilidad, baja luz difusa y rechazo del color.¹⁴

Además de estas técnicas de medición, la de retrodispersión se refiere a la medición de la luz dispersada en un ángulo entre 90° y 180° .^{10,18} La espectrometría de retrodispersión Rutherford (RBS) es una poderosa técnica analítica, basada en la medida de un haz de iones retrodispersados de elevada energía que incide sobre una muestra. En este método, la luz dispersada se detecta en direcciones determinadas, siempre correspondientes a ángulos de dispersión mayores de 90° . Esta técnica brinda información sobre las masas atómicas en el medio y determina la distribución de los elementos en el medio en función de su profundidad.^{19,20}

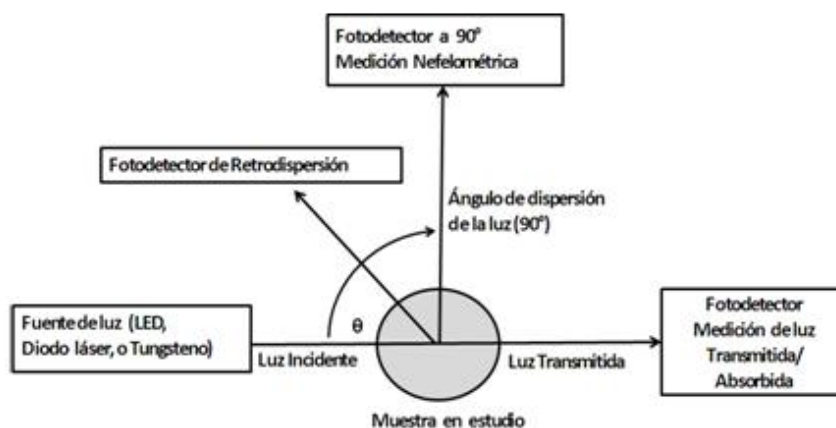


Fig. 2. Técnicas para la medición de turbidez.

Fuente de luz

Generalmente se consideran emisores optoelectrónicos aquellos dispositivos que son capaces de convertir energía eléctrica en luz. Existen varios tipos de emisores o fuentes de luz, como los termoluminiscentes (bombillas), electroluminiscentes (LED y láseres) y los basados en plasma (halógenos).²¹

Un ejemplo de fuente de luz utilizada comúnmente en las mediciones de turbidez es la lámpara de filamento de tungsteno incandescente, la cual contiene una banda espectral con diferentes longitudes de onda. Esta característica pudiera ser una desventaja para su uso, ya que la producción de numerosas longitudes de onda puede llevar a obtener una menor intensidad de la luz dispersada.¹⁴

Otros dispositivos también muy utilizados como fuente de luz en las mediciones de turbidez, son los LEDs (*light-emitting diodes*). Holonyak desarrolló el primer LED en 1962 sobre la base de capas de GaAsP y logró emitir con luz roja.²² Desde entonces, los LEDs, han desempeñado un papel prominente como sensores ópticos.²³ Estos dispositivos semiconductores capaces de emitir una radiación electromagnética cuando son polarizados en forma directa. La longitud de onda emitida depende del material semiconductor usado y de su dopaje (proceso donde se agregan impurezas a un material semiconductor en su forma pura, las cuales no son más que átomos de otro elemento que modifican las propiedades de conducción del material). Se pueden adquirir LEDs de diversas longitudes de onda, por ejemplo, verde (565 nm), amarillo (590 nm), naranja (632 nm), rojo (649 nm), azul (470 nm) y en el infrarrojo cercano.²⁴

Los LEDs ofrecen un mayor número de ventajas en comparación con otras fuentes de luz utilizadas en aplicaciones optoelectrónicas. Estos, incluyen mayor tiempo de vida, bajo costo, menor consumo de energía, mayor brillo, construcción robusta, configuración flexible, una mayor pureza espectral, pequeño tamaño y un amplio intervalo espectral (247-1550 nm, intervalo espectral de los LEDs disponibles comercialmente).²³

El diodo láser, como otro ejemplo de fuente de emisión, se obtuvo como resultado del desarrollo del diodo LED. La palabra láser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) en español se traduce como Amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación. El diodo láser es un dispositivo que utiliza un principio de la mecánica cuántica: la emisión inducida o estimulada para generar un haz de luz coherente de un medio adecuado y con el tamaño, la forma y la pureza controlados. Refiriéndose al proceso cuántico, la luz característica emitida por electrones cuando pasan de un estado de gran energía a un estado de menor energía, estimula a otros electrones a efectuar una trayectoria similar (pasar de un estado de mayor energía a otro de menor energía). El resultado es una luz sincronizada que sale del material. Una característica importante es que la luz emitida no solo tiene la misma frecuencia (monocromática), sino que es monofásica (está en fase), también está sincronizada y se obtiene como resultado un rayo de luz muy preciso.²⁴

Detectores

En los turbidímetros el haz de luz resultante de la interacción entre la luz incidente y la muestra será detectado por el fotodetector y como resultado, la señal electrónica producida se procesa y se convierte entonces en un valor de turbidez. La ubicación del detector en el turbidímetro varía de acuerdo con la configuración del diseño en el instrumento. Existen cuatro detectores que se utilizan frecuentemente en los turbidímetros, estos son, los tubos fotomultiplicadores, los fotodiodos de vacío, y de silicio, así como los fotoconductores de sulfuro o de cadmio.²⁵

Estos detectores se diferencian por su respuesta espectral, de acuerdo con la longitud de onda del haz de luz incidente (Fig. 3). Los fotomultiplicadores utilizados en la instrumentación nefelométrica tienen picos de sensibilidad espectral en el ultravioleta cercano y en el espectro del azul visible. Requieren un suministro de alta tensión bien ajustado para mantener una buena estabilidad en la medición. El fotodiodo de vacío generalmente exhibe una respuesta espectral similar a la de un fotomultiplicador, pero un poco más estable. Sin embargo, sus características se ven afectadas por las condiciones del medio ambiente, en particular, la humedad.¹⁶ Los fotodiodos de silicio generalmente tienen un máximo de sensibilidad espectral en la región visible del rojo o del infrarrojo cercano. El fotoconductor de sulfuro o de cadmio tiene este máximo entre la respuesta espectral del fotomultiplicador y del fotodiodo de silicio.^{10,26}

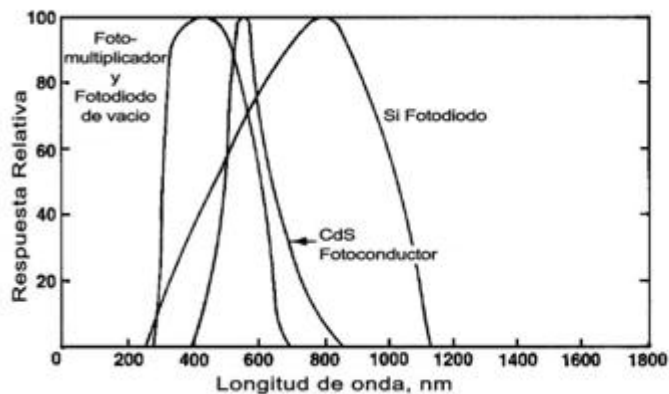


Fig. 3. Características típicas de la respuesta espectral de cuatro tipos de fotodetectores.²³

Los recientes avances en la ingeniería de materiales y en la microelectrónica han permitido desarrollar fotodetectores con el objetivo de mejorar sus prestaciones y extender su campo de utilización a la identificación de los microorganismos. En consecuencia, se ha desarrollado una gran variedad de fotodetectores de alta tecnología como los fotodiodos de silicio.²⁷⁻²⁸

El uso de los fotodetectores de silicio elimina muchos de los problemas relacionados con el ruido en la medición, al detectar la señal dispersada o transmitida. Debido a su estabilidad elevada, gran intensidad y la posibilidad de detectar diferentes longitudes de onda en el espectro visible y ultravioleta.²⁹ Estos sistemas pueden medir la absorbancia o la fluorescencia, o ambas inclusive lo que posibilita su empleo para determinar la concentración de bacterias, vitaminas (riboflavina), fármacos, proteínas y aminoácidos en muestras biológicas.³⁰

Estandarización en el diseño de los turbidímetros

Diversas organizaciones han desarrollado normas con el intento de estandarizar los diseños de los instrumentos y lograr que los resultados sean exactos y repetibles. Estas normas regulan las diferentes configuraciones en el diseño de los turbidímetros que se encuentran disponibles actualmente en el mercado.¹⁵

Hoy día, están reconocidos los métodos USEPA 180.1 y la Norma ISO 7027.³¹ Mientras USEPA 180.1 recomienda el uso de la emisión de la radiación en el intervalo visible, con longitudes de onda entre 400 y 600 nm, la Norma ISO 7027 propone la luz infrarroja a 860 nm como fuente emisora.^{25-26, 31}

Se debe destacar que ambas metodologías fueron diseñadas para las muestras de agua con baja turbidez y la interferencia de un mínimo de color. Sin embargo, existe una

enorme variedad de muestras en las que estos dos métodos pueden fallar al medir la turbidez con un elevado grado de sensibilidad. Estas muestras contienen, generalmente, ya sea una matriz fuertemente coloreada, partículas coloreadas, o ambas. Además, la muestra puede emitir fluorescencia o partículas con tamaños específicos. Estas características se traducen en una mayor interferencia, que disminuye el rendimiento de estos dos métodos. En los ejemplos de tales muestras se incluyen: productos líquidos alimenticios, control de la contaminación durante la producción de diversos fluidos, resinas, la degradación de aceites y recuentos bacterianos en agar, siendo solo una pequeña parte de la gran variedad de posibilidades.²⁵

Diseño general de un sistema para la medición de turbidez

Las técnicas clásicas empleadas en microbiología para medir el crecimiento celular son: las determinaciones de densidad óptica (turbidez), conteo en placa y peso seco. El conteo en placa es la más antigua (aproximadamente 100 años) y es considerada una de los procedimientos más utilizados en la aquella. Aunque esta última posibilita conocer de manera directa la viabilidad de los microorganismos presentes en una muestra, sin embargo, consume tiempo. En tal sentido, el método turbidimétrico tiene la ventaja de estimar de manera rápida el crecimiento de una población microbiana.¹⁷

Generalmente, un sistema para la medición de turbidez consta de la fuente de luz, la muestra en análisis y del fotodetector (fotodiodo, fotorresistencia, etc.) (Fig. 4). En estos sistemas, la fuente de emisión de luz (ejemplo los LEDs), tiene la capacidad de emitir a una longitud de onda determinada, existe un recipiente cristalino o frasco donde se coloca la muestra en estudio y el fotodetector se comporta como receptor de los fotones o sensor óptico.¹⁷ Dicho fotodetector se encuentra antes de un bloque de acondicionamiento, que permite amplificar y filtrar las señales emitidas por él en forma de impulsos eléctricos. Estas señales pueden ser introducidas en una Unidad Central de Procesamiento y Control (UCPC) encargada de la conversión analógico-digital de la señal de entrada y de cumplir con las tareas del procesamiento digital, como la cuantificación y el procesamiento matemático con el objetivo de proporcionar el resultado requerido, además de mostrar el valor de la turbidez medida después del procesamiento digital.³¹⁻³² Asimismo, la UCPC es capaz de generar y controlar una señal con determinadas características para estimular la fuente de emisión de luz.^{5,33}

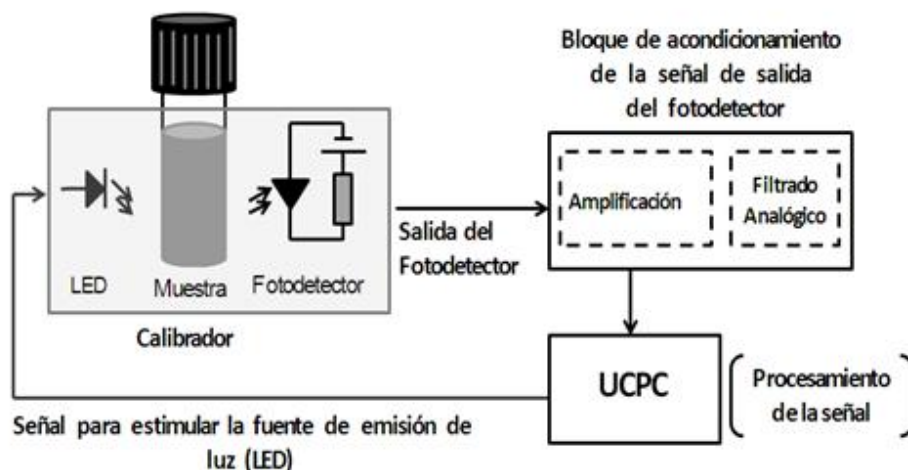


Fig. 4. Esquema general de un sistema para la medición de turbidez.

Para el diseño de un sistema de medición de turbidez es importante conocer el espectro de absorción de la muestra que se quiere determinar, esto es, a qué longitud de onda de

la radiación incidente causará la máxima absorción la especie en estudio para obtener la mejor sensibilidad en su cuantificación.³⁴ En general, sobre la sensibilidad del diseño en el método a utilizar, pueden influir: la longitud de onda, la intensidad y la frecuencia de la corriente eléctrica de estimulación, así como el ángulo de incidencia de los fotones para el sensor (foto detector) utilizado.²³

Aplicaciones de la turbidimetría en los bioprocesos

Los bioprocesos modernos son extremadamente complejos y difieren entre sí, (entre ellos se tiene la producción de antibióticos, el cultivo de células de mamíferos, entre otros), por lo que se han desarrollado diversos sistemas de análisis y configurado a partir del diseño de diferentes módulos básicos, que satisfacen las demandas específicas de cada proceso en particular.³⁵⁻³⁶

Dentro de los procesos biotecnológicos se encuentran los de fermentación, en donde la introducción de nuevos sensores ópticos ha permitido el avance en su comprensión.³⁷ Los sensores ópticos son herramientas eficaces para obtener cierta información del sistema biológico bajo estudio, ofreciendo un control no destructivo de los procesos biotecnológicos.³⁴

Durante el registro y control de los procesos fermentativos, se necesita una estimación rápida del crecimiento bacteriano, para lo cual se han desarrollado métodos turbidimétricos que permiten medir la absorbancia de las bacterias en el cultivo.³⁸ Para determinar el crecimiento microbiano, se toma una muestra del caldo de fermentación (*off-line*) y se mide la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro o un colorímetro, a una longitud de onda constante. La medición de la densidad óptica con un espectrofotómetro es un modo rápido y fácil para obtener la curva de crecimiento de dicho microorganismo.³⁹ Las mediciones de la densidad óptica proporcionan información útil para el control del cultivo alimentado en el fermentador, por lo que resulta ideal realizar estas mediciones directamente (*on-line*) en el proceso y así, obtener valores en tiempo real.⁴⁰ Por lo tanto, para el control en tiempo real de los procesos de fermentación de microorganismos, se requiere del uso de sensores que posean un amplio intervalo dinámico de medición.⁴¹

Varias son las investigaciones publicadas, relativas a procesos fermentativos, en las que se mide la densidad óptica *on-line*. Por ejemplo, en el trabajo publicado por Kennedy,³⁷ se realizaron mediciones dentro del propio fermentador, para lo cual se utilizó como fuente de emisión una sonda de fibra óptica junto a la fuente de detección, ambas sumergidas en el cultivo, las que posibilitaron la medición de la dispersión de la luz por la muestra. En este sistema experimental, se obtiene el espectro de dispersión de la luz en la fermentación de tres microorganismos individuales (aproximadamente a las mismas concentraciones): *Saccharomyces cerevisiae*, *B. subtilis* y *Escherichia coli*. La relación útil entre la dispersión de la luz y la concentración de células se observa en la curva de calibración de cada uno de los microorganismos.³⁷

Otro ejemplo de la aplicación de la turbidimetría en los procesos de cultivo en biorreactores lo constituye la investigación realizada por P. Wu,⁴² en la que se realizó la medición de la densidad óptica *on-line* mediante sondas ópticas, durante el proceso de cultivo de hibridoma murino.⁴²

La desventaja de usar la densidad óptica para la estimación rápida del crecimiento celular, radica en que tanto las células viables como las no viables absorben a una longitud de onda específica y como resultado, el valor de la densidad óptica no puede tomarse como una medida directa de la viabilidad celular.⁴³⁻⁴⁴

Sistemas ópticos para la medición de la turbidez

El análisis de la turbidez se torna cada vez más popular, sobre todo, porque la práctica alternativa de toma de muestras y análisis de la sedimentación o filtración y pesaje de los procedimientos, son procesos lentos y propensos a errores. El precio relativamente elevado de medidores de turbidez comercialmente disponibles ha estimulado intensas investigaciones relacionadas con el diseño de nuevos sistemas para la medición de la turbidez.⁴

Algunas variantes modernas posibilitan, realizar mediciones de absorción y fluorescencia a partir del uso de diferentes longitudes de onda, lo que permite disminuir los tiempos empleados en la detección y estudio de microorganismos. En un artículo reciente, se describe un método que posibilita mejorar la capacidad de un sistema optoelectrónico de detección de microorganismos combinando la centrifugación de la muestra, el empleo de fuentes fluorescentes de luz y el uso de cinco longitudes de onda de excitación (comprendidas entre el rojo y el ultravioleta).⁴⁵

También, se ha probado el uso de un sensor óptico (luminiscencia), combinado con el empleo de diferentes ángulos de captación de las señales y de diferentes longitudes de onda (entre el ultravioleta y el infrarrojo), para el que se ha descrito un incremento significativo en la sensibilidad del sistema para la detección de patógenos procedentes de diferentes medios.⁴⁶

Por otro lado, existen autores que abordan la mejora del fotodiodo y de la tarjeta asociada (circuito integrado) en la medición de la absorbancia (dependiendo de la frecuencia).⁴⁷ El detector de absorbancia utilizado, se basó en la utilización de un amplificador en configuración *lock-in* para realizar el procesamiento digital de la señal (DSP LIA). Este detector mostró menor nivel de ruido al ser comparado con un detector que incluyó un amplificador operacional simple (TL082CP).⁴⁷

Además, Song *et al.*⁴⁸ reportaron el empleo de un arreglo de fotodiodos, en forma de microchip portátil, para la identificación y cuantificación de *E.coli* O157:H7. En otra investigación,⁴⁹ se realizó el diseño y construcción de un instrumento electrónico para registrar sólidos suspendidos en diferentes sistemas acuosos, basado en los principios de la turbidimetría y nefelometría. En dicho trabajo, se evaluaron dos sensores ópticos monolíticos de gran sensibilidad, del orden de 0,45 A/W a 650 nm, colocado en la dirección del haz transmitido y del haz dispersado. Se utilizó un amplificador de transimpedancia que proporcionó una tensión lineal y proporcional a la cantidad de luz recibida por el detector, en el que las fotocorrientes de ambos detectores resultaban alimentadas por un circuito logarítmico de precisión. La salida del circuito logarítmico es digitalizada para tener mediciones de turbidez en análisis de aguas o de transparencia en el caso de recubrimientos y de dispersión de luz en sistemas acuosos que tienen algún grado de materia sólida suspendida.⁴⁹

El método turbidimétrico o espectrofotométrico de absorción, se ha utilizado también en distintas investigaciones para determinar la concentración de glucosa.³⁰ Basado en que su reacción con la hidroxilamina se obtiene la oxima correspondiente la cual es el compuesto a determinar cuyo espectro de absorción UV se ubica en el intervalo de 200 a 260 nm. La fuente de radiación, en esta investigación, se seleccionó considerando estos valores. En el diseño se utilizaron dos fotodetectores de silicio. El sistema de registro de la señal de salida de cada detector hace uso del amplificador logarítmico LOG102, el amplificador operacional LM308N y el microcontrolador PIC16F873A; componentes que son de gran precisión, que permiten la obtención de resultados, muestreando elementos técnicos y valores nominales a tener en cuenta para el diseño del instrumento de medición.³⁰

En varios trabajos destinados al diseño optoelectrónico de los turbidímetros, se incorpora el amplificador *lock-in*, que también puede ser implementado digitalmente. Este dispositivo tiene como característica principal que elimina el ruido introducido en la señal de medición a otra frecuencia que no sea la de referencia sin afectar dicha medición.^{31,47,50,51} En estos sistemas se miden los cambios de amplitud y fase de las señales ópticas intrínsecas (IOS), las cuales revelan cambios en la transmitancia y dispersión de la luz. Estos sistemas en general se componen de tres partes principales: 1) fuente de alta frecuencia que modula la intensidad de la luz; 2) detector de luz; 3) procesamiento de señales y el módulo de adquisición de datos. El emisor es excitado por una fuente de corriente sinusoidal de intensidad modulada, generada y controlada por la UCPC. Los fotones dispersos, después de la interacción con el medio, son capturados por el detector de luz. En el módulo de procesamiento de señales, se incluye un circuito integrado (CI) demodulador, un filtro pasa bajo y un circuito de amplificación, la señal demodulada obtenida en el procesamiento analógico es muestreada por el módulo de adquisición de datos. Finalmente, se envía la señal a un ordenador personal para su posterior análisis.³¹ La combinación de estas técnicas proporciona una elevada relación señal-ruido y la falta de sensibilidad a la luz ambiente.^{31,50}

Sistemas ópticos para la medición de turbidez, aplicados a los bioprocesos

El control de los procesos de fermentación se encuentra limitado por la incapacidad para medir parámetros tales como: sustrato, producto y concentración de biomasa para mantener una línea rápida de realimentación. Los parámetros físicos y químicos, tales como la temperatura y el pH, actualmente pueden medirse en línea usando sensores adecuados. Sin embargo, para obtener información sobre la densidad óptica, es preciso, en algunos casos, tomar muestras para la medición. El diseño de nuevos sistemas ópticos ha permitido el desarrollo de las técnicas espectroscópicas, haciendo posible registrar en tiempo real los parámetros que intervienen en el proceso de fermentación. Las técnicas espectroscópicas requieren de una mínima o ninguna preparación de la muestra, y se pueden utilizar para evaluar simultáneamente varios parámetros en matrices complejas.⁵²

Se han desarrollado nuevos diseños de biorreactores destinados a la medición *on-line* de densidad óptica. Un ejemplo es el dispositivo desarrollado por Pascal Picart,⁵³ dedicado a la medición simultánea de la bioluminiscencia y la densidad óptica en un cultivo de bacterias bioluminiscentes. El biorreactor optoelectrónico dispone de un módulo que incluye: un diodo láser modulado dedicado a la medición de la densidad óptica y un cabezal de detección para la adquisición de la bioluminiscencia y las señales de densidad óptica. La bioluminiscencia se mide a través de una unidad fotomultiplicadora muy sensible que ha sido calibrada fotométricamente para permitir mediciones de la luz a flujo continuo. El sistema optoelectrónico para determinar la densidad óptica consta de un diodo láser y un fotodiodo. El dispositivo ha sido validado con la bacteria *Vibrio fischeri*, en condiciones de cultivo continuo. Se ha comprobado una muy buena correlación entre las mediciones manuales y las automáticas procesadas con este instrumento.⁵³

Es importante destacar que se han realizado varias mediciones *on-line* en procesos de fermentación de *E. coli* de cultivos de gran densidad mediante dispositivos ópticos basados en fuentes de luz como las lámparas o emisores de luz de diodos (LED).³⁹ Un ejemplo es la investigación realizada por Martin y Timothy, en la que se describe el procedimiento no invasivo de una nueva sonda óptica basada en la reflectancia óptica. La naturaleza no invasiva de la medición evita los problemas de ensuciamiento del

sensor y la contaminación cruzada, además de la necesidad de esterilizar la sonda, lo que reduce el costo de los materiales utilizados en la producción del sensor. El instrumento consta de un sensor óptico que se monta sobre el exterior del recipiente de fermentación y de un monitor que procesa las señales de reflectancia medidas por los sensores. El rendimiento del instrumento fue probado bajo las condiciones de fermentación del microorganismo *E. coli*.⁵⁴

En recientes publicaciones, se trata el uso del sensor llamado TruCell, desarrollado por la compañía Finesse, LLC, que consiste en una fuente láser dirigida a través de una ventana de teflón. Este sensor puede captar la luz dispersada enviada hacia adelante, dentro de un cono de 20°, lo que hace posible una mayor detección de la intensidad de luz transmitida. Este ángulo de recogida permite al sensor lograr una gran relación señal-ruido, incluso en medios muy turbios. Este sensor es capaz de medir en tiempo real dentro de una brecha de la sonda de medición, la cual tiene una longitud física de acuerdo con el camino óptico de la luz, que pasa directamente a través del medio líquido en el interior del biorreactor.^{40,55}

Las investigaciones destinadas a mejorar los sistemas para la medición de turbidez, van enfocadas no solo a realizar cambios en la fuente de radiación y detección, sino también, a mejorar la captación de la señal de salida del detector o sensor óptico para distintos campos de medición, y se centran en variantes tales como: la posición del detector, la amplificación de la señal medida y la disminución de los ruidos procedentes de fuentes externas, con el objetivo de obtener una mejor sensibilidad en la medición, así como un valor cercano al real.

Sistemas turbidimétricos (*on-line*) aplicados a los bioprocesos y disponibles en el mercado internacional

La academia y la industria han propuesto diferentes inventivas para el desarrollo de métodos rápidos y la automatización de instrumentos aplicados a los bioprocesos, buscando siempre las más precisas y confiables. De modo que se ha desarrollado un área dinámica de la microbiología aplicada que hace frente al estudio para mejorar los métodos de detección temprana, la caracterización y el recuento de microorganismos tanto en productos clínicos, como en muestras de alimentos, productos industriales y ambientales.⁵⁶ En el mercado internacional se pueden encontrar diferentes sistemas que emplean como técnica de diagnóstico la medición de turbidez y que se utilizan en los procesos biotecnológicos.

El desarrollo de nuevos sensores ópticos, que pueden ser incorporados a un biorreactor, ha permitido la medición de la densidad óptica *on-line*. Entre ellos, se encuentra la sonda no invasiva, BE2100, fabricada por la compañía Applikon Biotechnology. Este sensor se ha diseñado para su uso en laboratorios de investigación y en ambientes industriales. Debido a la que no precisa ningún contacto directo con el medio, el sistema puede ser utilizado en los procesos de cultivo de microorganismos patógenos y no necesita ser esterilizado.⁵⁷ El sensor BE2100 emplea una matriz de rayos láser y detectores infrarrojos, los cuales son sensibles a los diferentes cambios en la biomasa del cultivo. Este sensor realiza mediciones continuas y en tiempo real, en un intervalo mayor de 300 unidades de densidad óptica.⁵⁷⁻⁵⁸

El OD4, es un sensor óptico creado por la compañía DASGIP Information and Process Technology GmbH, para el registro *on-line* de la absorbancia y el crecimiento celular. El módulo correspondiente se puede incorporar en cuatro biorreactores como máximo. Utiliza sensores infrarrojos de gran precisión con diferentes longitudes de trayecto óptico.⁵⁹ Cada módulo OD4 tiene su propio microprocesador, el cual permite que todos

los datos puedan ser transferidos a un sistema de control para la supervisión del proceso. Presenta un intervalo de medición de 0 a 5 unidades de absorbancia.⁶⁰

Otro ejemplo es el sensor InPro 8200 (de fibra doble), fabricado por Mettler Toledo Ingold.⁶¹ La medición óptica de turbidez en este caso, se basa en la tecnología de luz retrodispersa o *backscattered light*, opción indicada para grandes concentraciones de sólidos no disueltos en el cultivo. Utiliza la tecnología de fibra óptica y presenta un intervalo de medición de 5 a 4000 FTU (Unidades de Turbidez Formazin) por sus siglas en inglés.⁶²⁻⁶³

Estos sistemas ópticos de medición están específicamente diseñados para integrarse en el biorreactor. Además, le proporcionan a los operadores una herramienta poderosa para caracterizar el crecimiento de células en tiempo real en laboratorios de investigación, plantas piloto, en cultivos celulares a gran escala, y en instalaciones de fermentación.⁶⁴

CONCLUSIONES

La turbidimetría es una técnica que se sustenta básicamente en los fenómenos ópticos que ocurren durante el paso de un haz de luz a través de un medio. La implementación de técnicas de medición cada vez más novedosas ha permitido realizar mediciones de turbidez que incluyen una buena linealidad y estabilidad, un amplio intervalo de medición y la posibilidad de medir la turbidez de la muestra, incluso en presencia de colorantes. De igual modo, la introducción de nuevos sistemas ópticos para medir el crecimiento celular en los procesos biotecnológicos continúa creciendo en interés, ya que constituye una estrategia de control para los bioprocesos. De esta manera, el continuo desarrollo de los sensores ópticos, como por ejemplo, las sondas de densidad óptica, los biosensores ópticos, los sensores de fibra óptica, los infrarrojos y de fluorescencia ofrecen una medición biotecnológica sin perturbaciones y con una mayor precisión en los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kai-Erik P, Mylly A, Priezzhev V. Springer Series in optical sciences. Optical Measurement Techniques, Innovations for Industry and the Life Sciences. Springer Series in Optical Sciences. [Consultado 11 de Junio del 2012]. Disponible en: <http://books.google.com/cu/books?id=UFIzj6n9JHsC&pg=PA142&lpg=PA142&dq=Kai-Erik+PeiponenRisto+Myllyl%C2%A8alexander+V.+Priezzhev+Optical+Measurement+Techniques+Innovations+for+Industry+and+the+Life+Sciences&source=bl&ots=Z1w33sqVqR&sig=CzGz6v67LmLH1dB8zR2kc7vc3jU&hl=es&sa=X&ei=GzYiUZbOCMTVswab-IHQBw&ved=0CD4Q6AEwAg#v=onepage&q=Kai-Erik%20PeiponenRisto%20Myllyl%C2%A8alexander%20V.%20Priezzhev%20Optical%20Measurement%20Techniques%20Innovations%20for%20Industry%20and%20the%20Life%20Sciences&f=false>.
2. Sadar M. Turbidity instrumentation - an overview of today's Available technology. Application Scientist, Hach Company. Loveland Colorado P.O. Box 389, Loveland Colorado. 30 de Abril de 2002:3-1.
3. Scott A, Prah I, Martin J C Van Gemert, Ashley J. Welch. Determining the Optical Properties of Turbid Media Using the Adding-Doubling Method. 1996; 12th September:33-1. [Consultado 21 de Junio del 2012]. Disponible en:

- http://www.google.com/cu/url?sa=t&rct=j&q=Scott+A%2C+Prah+1%2C+Martin+J+C+Van+Gemert%2C+Ashley+J.+Welch.+Determining+the++Optical+Properties+of+Turbid+Media+Using+the+Adding-Doubling+Method.1996%3B+12th+September&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F46037027_Determining_the_optical_properties_of_turbid_mediaby_using_the_adding-doubling_method%2Ffile%2Fd912f506ee7efba034.pdf&ei=CEsiUdr_AoPC9QSC_oDADA&usg=AFQjCNGWc3X_2eVm5h5vXxv5iRzSiJxcJA&bvm=bv.42553238,d.Yms
4. Freitag R, Fenge C, Scheper T, Schügerl K. Immunological on-line detection of specific proteins during fermentation processes. *Analytica Chimica Acta*.1991; 249, 1:113-122.
 5. Theofanis L, Christos A, Christos P A Nephelometric Turbidity System for Monitoring Residential Drinking Water Quality. University Cyprus, Nicosia, Cyprus: 13-5.[Consultado 12 de Junio del 2012]. Disponible en: <http://www2.ucy.ac.cy/~faniseng/publications/SENSAPPEAL09.pdf>
 6. Velasco Tarragona-Cambrils F. Sistemas de Análisis, Analizadores de procesos, Proyecto ICUE Tema 1.3.05.Turbidez. La Motte Company Helping People Solve Analytical Challenges. 2007; abril-julio: 42-2.
 7. Davies-Colley RJ, Smith DG. Turbidity, Suspended Sediment and Water Clarity: A Review. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 2001, 37: 1085-1101.
 8. Hoffman N, Preetham A.J. Rendering Outdoor Light Scattering in Real Time. [Consultado mayo de 2012]. Disponible en: <http://ati.amd.com/developer/dx9/ATI-LightScattering.pdf>.
 9. Jenkins FA, White HE. *Fundamentals of Optics*, McGraw-Hill: Tokyo, Japan, 1976:455-473.
 10. Fairuz Bin A, MohdZubir Bin M. Turbidimeter Design and Analysis: A Review on Optical Fiber Sensors for the Measurement of Water Turbidity. *Journal Sensors*.2009; 9: 8311-8335.
 11. Métris A, George M, Michael W, Baranyi J. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods*. 2003; 55(3): 821-827.
 12. Holliday C, Rasmussen T, Miller W. Establishing the Relationship between Turbidity and Total Suspended Sediment Concentration. 2003 Georgia Water Resources Conference, University of Georgia: Athens, GA, USA, April 23-24, 2003.
 13. Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Szeged HANDOUT for medical students. Turbidity and Nephelometry. Light scattering: 2-1.[Consultado mayo de 2012]. Disponible en: <http://biochem.szote.u-szeged.hu/edu/actual/en/pdf/gyak-turbid-nefelo.pdf>
 14. U.S. Environmental Protection Agency. Determination of Turbidity by Nephelometry. 1993; Agosto: 170-12.
 15. EPA Guidance Manual Turbidity Provisions. Basic Turbidimeter Design and Concepts.1999; April: 13-6.
 16. World Bank & Government of The Netherlands funded. Emission Spectroscopy and Nephelometry. 2000; febrero: 41- 20.
 17. ABB Instrumentation. Turbidity Measurement, Technical Note, 1999. [Consultada marzo de 2011] Disponible: http://www.tbi-bailey.com/faq/pdf/1_turbty.pdf

18. Espectrometría de retrodispersión rutherford (RBS) y canalización iónica. [Consultado 27 de septiembre de 2012] Disponible en: <http://acdc.sav.us.es/cna/index.php/es/vande-graaff/tecnicas/65-espectrometria-de-retrodispersion-rutherford-rbs-y-canalizacion-ionica>.
19. Centro de Microanálisis de Materiales. RBS, Técnicas IBA. [Consultado 27 de septiembre de 2012] Disponible en: <http://www.cmam.uam.es/es/tecnicas-iba/108>
20. Sendra RJ. Dispositivos Optoelectrónicos. 2001; 18 de abril: 63-33.[Consultada 6 de marzo del 2012] Disponible en: http://www.iuma.ulpgc.es/~jrsendra/Docencia/dispositivos_optoelectronicos/download/teoria/apuntes/curso00-01.pdf.
21. Holonyak Jr, Bevaqua N. Coherent (visible) light emission from Ga(As_{1-x}P_x) junctions. *Applied Physics Letters*.1962, 1:82-83.
22. O'Toole M, Diamond D. Absorbance Based Light Emitting Diode Optical Sensors and Sensing Devices.Review of Journal Sensors.2008, 8: 2453-2479.
23. Madrid R. Elena. Analizador Digital Electro-Óptico: Aplicación Simultánea de Ambos Métodos como Herramienta de Automatización en Microbiología. [Tesis en opción del título de Doctor en Bioingeniería]. Departamento de Bioingeniería, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, 1999.
24. Gómez González E. Tema 3. Fuentes de luz y emisión laser. Apuntes de Óptica. Curso 2008/09. [Consultado 18 de junio de 2012]. Disponible en: <http://laplace.us.es/campos/optica/tema3/opt-tema3-0809.pdf>
25. Sadar MJ. Understanding Turbidity Science, Technical Information Series, Booklet 11; Hach Company, Loveland, CO, USA, 1996:26-7.
26. ID Quantique SA. id101. Series Miniature photon counter for OEM applications. [Consultado 11 de septiembre de 2012]. Disponible en: <http://www.photonicsolutions.co.uk/datasheets/idqt/id101.pdf>
27. ID Quantique SA. id150. Series Miniature 8-channel photon counter for OEM applications. [Consultado 11 de septiembre de 2012. Disponible en: <http://www.photonicsolutions.co.uk/datasheets/idqt/id150.pdf>.
28. Xiao D, Zhao S, Yuan H, Yang X. CE detector based on light-emitting diodes. *Electrophoresis*.2007; 28:233-242.
29. Brunatti C, Martín A. María. Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano. [Consultada 15 de febrero de 2012]. Disponible en: <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>
30. Method # 180.1. Turbidity (Nephelometric), 1978:4-4. [Consultada 30 de marzo del 2012]. Disponible en: http://www.umass.edu/tei/mwwp/acrobat/epa180_1turbidity.pdf
31. Cox RP, Miller M, Bang Nielsen J, Nielsen M, Kirk Thomsen J. Continuous turbidometric measurements of microbial cell density in bioreactors using a light-emitting diode and a photodiode. *Journal of Microbiological Methods*.1989; 10: 25-31.
32. Sandra R, Cordero A, Caralli A. Diseño y construcción de un instrumento para determinar la concentración de glucosa. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. *Revista de Ingeniería UC*. 2006; 13: 35-44.
33. Ching-Huang H, Gwo-Ching C, En-Ting L, Yu-Jing L, Jia-Jin J. Measurement of intrinsic optical backscattering characteristics of cells using fiber-guided near

- infrared light. *Biomedical Engineering Online*. 2010; 9:12. Published online 2010 February 25. [Consultada 14 de febrero de 2012]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850905/>
34. Madrid Rossana E, Felice Carmelo J, Valentinuzzi Max E. Analizador automático de crecimiento microbiano por medición simultánea de impedancia y turbidez. 2000:30-33. [Consultada 9 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.herrera.unt.edu.ar/revistacet/antiores/nro18/pdf/n18inv04.pdf>
 35. Ulber R, Frerichs JG, Beutel S. Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Anal Bioanal Chem*. 2003 Jun; 376(3):342-8. [Consultada 9 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728296>
 36. Kennedy MJ, Thakur MS, Wang C, Gregory N, Stephanopoulos. Estimating Cell Concentration in the Presence of Suspended Solids: A Light Scatter Technique. *Biotechnology and Bioengineering*. 1992; 40:875-888.
 37. Hernández A, Marín M. New turbidimetric method for estimating bacterial growth in heterogeneous media. *Process Biochemistry*. 2002; 37: 1125-1128.
 38. Sun Wang N. Measurements of Cell biomass concentration. Department of Chemical & Biomolecular Engineering. [Consultada 5 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab9c.htm>
 39. Finesse LLC. Improved Process Measurement & Control. [Consultada 11 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.finesse.com/files/pdfs/app-tech-notes/TruCell.TN.AUvsOD.pdf>
 40. Finesse LLC. Improved Process Measurement & Control. Accurately Monitor High Range (>350 OD) Bacterial Fermentation Using In-Line Cell Density [Consultada 11 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.finesse.com/files/pdfs/app-tech-notes/TruCell.TN.AUvsOD.pdf>
 41. Wu P, Ozturk J D, Blackie JC, Thrift C, Naveh D. Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995; 45, (6):495-502.
 42. Finesse, LLC. Cell Density Measurement Primer. [Consultada 11 de junio de 2012]. Disponible en <http://www.finesse.com/files/pdfs/app-tech-notes/TruCell.TN.CellDensityPrimer.pdf>
 43. Tutorial Fermentación. [Consultada 6 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.ncsu.edu/checs/media/Fermentation.pdf>
 44. Ingber G, Atterbury W, Barnes R. System for Conducting the Identification of Bacteria in Urine. US Patent 20110008825, January 13th, 2011.
 45. Zesch W, Bopp M, Pawlak M. Multianalyte determination system and methods. US Patent 7879598. February 1st, 2011.
 46. Eom I-Y, Dasgupta, PK. Frequency-selective absorbance detection: Refractive index and turbidity compensation with dual-wavelength measurement. 2006; 69(4):906-913.
 47. Song JM, Kwon HT. Photodiode array on-chip biosensor for the detection of *E. coli* O157:H7 pathogenic bacteria. *Methods in molecular biology*. 2009:325-335.
 48. Rangel D, Méndez E, Mijangos G, Rodríguez R y Castaño V. M. Diseño y construcción de un sistema optoelectrónico Portátil para pruebas de detección de sólidos suspendidos en Sistemas acuosos. Congreso Nacional de Instrumentación, Querétaro Qro., México; 2000.
 49. Novak L, Neuzil P, Pipper J, Zhang Y, Lee S. An integrated fluorescence. *Lab Chip*, 2007: 27–29. [Consultado el 26 de Junio del 2012]. Disponible en:

- <http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/Lab%20on%20a%20Chip/lab%20on%20a%20ship%20v.1n.12007p.27-29.pdf>
50. Mylvaganam S, Jakobsen T. Turbidity sensor for under water applications. [Consultado 27 de junio de 2012]. Disponible en: http://www.commttec.com/Library/Technical_Papers/SinglePointDoppler/Turbidity%20Sensor%20Design%20and%20performance.pdf
 51. Veale EL, Irudayaraj J, Demirci A. An on-line approach to monitor ethanol fermentation using FTIR spectroscopy. *Biotechnol Prog.* 2007; 23(2):494-500.
 52. Picart P, Bendriaa L, Philippe D, Habib H, Durand M-J, JouvanneauL, Thouand G. New bioreactor for *in situ* simultaneous measurement of bioluminescence and cell density. *Review Scientific Instruments.* 2004; 75(3):9.
 53. Debreczeny M. P, Timothy Davies E. Non-Invasive Biomass Monitor with Wide Linear Range. [Consultado 14 de junio de 2012]. Disponible en <http://www.buglab.com/docs/OnLineODMeasurement.pdf>
 54. Finesse LLC. Cell Density Measurement Primer. OD⁶⁰⁰ vs. AU Measurements in Fermentation Cell Density. [Consultado 12 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.finesse.com/files/pdfs/app-tech-notes/TruCell.TN.AUvsOD.pdf>
 55. Fung Daniel YC. Rapid Methods and Automation in Microbiology. Inaugural Issue. 2009; 1:20-8.
 56. BugLab. Applikon Biotechnology [Consultado 18 de junio de 2012]. Disponible en: http://www.applikon-biotechnology.co.uk/index.php?option=com_content&view=article&id=151&Itemid=273
 57. BugLab LLC. BE2100 Noninvasive Biomass Monitor. [Consultado 19 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.applikon-biotechnology.co.uk/images/stories/BugLab/BE2100Datashet.pdf>
 58. DASGIP Information and Process Technology GmbH. Optical Density Module, Online Cell Growth Monitoring via Optical Density. [Consultado 20 de junio de 2012]. Disponible en: http://www.dasgip.com/media/content/catalog/pdf/DASGIP_EFlyer_Products_OD4_en.pdf
 59. DASGIP Optical Density Module OD4. [Consultado 20 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.bioresearchonline.com/doc.mvc/Cell-Growth-Monitor-OD4-0001>
 60. Mettler Toledo. TurbiditySensors.InPro 8200 (Dual Fiber) [Consultado 29 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.vci-analytical.com/biopharm/optical/InPro%208200%20Dual%20Fiber%20OD%20Sensor%20cat%20pages.pdf> nombre autor o firma?
 62. Mettler Toledo GmbH, Process Analytics. Transmitter Trb8300 & InPro@8000 Sensor Series. Technical Data. [Consultado el 29 de junio del 2012]. Disponible en: http://us.mt.com/dam/mt_ext_files/Editorial/Generic/2/TD_Turbidity_System_backscattered_Editorial-Generic_1096026395500_files/td_turbidity_systemtrb8300andinpro8000e528002461096026395500.pdf nombre autor o firma?
 62. Mettler Toledo GmbH, Process Analytics.InPro 8000 Sensor Series.Trb 8300 Transmitter Series. [Consultado 29 de junio de 2012]. Disponible en: <http://pdf.nel.com.tr/katalog/2-PROSES%20KONTROL/5-BULANIKLIK%20S%C4%B0STEMLER%C4%B0/1->

Geni%C5%9F%20Spectrum%20Single%20Fiber/%C4%B0LER%C4%B0%20SER%C4%B0/Turbidity_Flyer.pdf

63. Ferrelli J and Mueller A. Fermentación and Cell Growth Monitoring using NIR Probes. [Consultado 29 de junio de 2012]. Disponible en:
<http://www.isa.org/~tarhe/ISA%20Meeting%20Notice%201108.pdf>