

**RTS-9 plus**  
**Biorreator Multi-canal Pessoal com**  
**medição mão invasiva de DO, pH e**  
**pO<sub>2</sub>**



# Conteúdo

1. Sobre esta edição das instruções.....	2
2. Precauções de segurança.....	2
3. Informações Gerais.....	4
4. Primeiros passos.....	6
5. Calibração do sistema óptico DO.....	8
6. Sistema óptico de pH e O <sub>2</sub> e sensores de informação e calibração.....	9
7. Operação.....	11
8. Métodos recomendados para o cultivo de microrganismos.....	12
9. Recomendações para a criação de ambientes pessoais para o cultivo de microrganismos. Exemplos de resultados e pontos a serem considerados.....	13
10. Especificações.....	19
11. Manutenção.....	20
12. Garantia e Reclamações.....	21
13. Declaração de Conformidade UE.....	22

## 1. Sobre esta edição das instruções

1.1 A edição atual das instruções do usuário aplica-se às seguintes versões do biorreator multicanal pessoal:

- RTS-8 plus ..... Versão V.1A01

## 2. Precauções de segurança



**Cuidado!** Certifique-se de ter lido e entendido completamente o presente Manual antes de usar o equipamento. Por favor, preste especial atenção às seções marcadas por este símbolo.



**Cuidado!** As superfícies podem ficar quentes durante o uso.

## SEGURANÇA GERAL

- Use somente conforme especificado no manual de operação fornecido. A segurança de utilização do produto pode ser prejudicada se não for utilizado da forma indicada, ou se forem utilizados acessórios (tubos Falcon) que não correspondam às características exigidas
- A unidade não deve ser usada se cair ou danificar.
- Após o transporte ou armazenamento, mantenha a unidade sob temperatura ambiente por 2 - 3 h antes de conectá-la ao circuito elétrico.
- Armazenar e transportar a unidade a temperaturas ambientes entre -20°C e +60°C e humidade relativa máxima de 80%.
- Antes de utilizar quaisquer métodos de limpeza ou descontaminação, exceto os recomendados pelo fabricante, verifique com o fabricante se o método proposto não danificará o equipamento.
- Não faça modificações no projeto da unidade.
- O dispositivo é otimizado para trabalhar apenas com tubos de 50 ml e todas as outras formas de aplicação da unidade são proibidas.



**Cuidado!** A unidade é pesada (20 kg). É necessário levantar a unidade apenas segurando-a firmemente com as duas mãos sob os recessos laterais esquerdo e direito.

## SEGURANÇA ELÉTRICA

- Não conecte a unidade à tomada principal sem aterramento e não use cabo de extensão sem aterramento.
- Conecte-se apenas a uma fonte de alimentação com tensão correspondente à da etiqueta do número de série.
- Desconecte a unidade do circuito elétrico antes de se mover.
- Desligue a unidade desligando o interruptor de alimentação e desconectando a fonte de alimentação externa da tomada.
- Certifique-se de que o interruptor de alimentação na parte traseira da unidade e a ficha de alimentação são facilmente acessíveis durante a utilização.
- Esta unidade é controlada por PC. Certifique-se de que o próprio PC conectado esteja em conformidade com os padrões de segurança e EMC.
- Se o líquido penetrar na unidade, desconecte-o da fonte de alimentação externa e faça com que ele seja verificado por um técnico de reparo e manutenção.
- Não opere a unidade em instalações onde a condensação possa se formar. As condições de operação da unidade são definidas na seção **Especificações**.

## DURANTE A OPERAÇÃO

- Não opere a unidade em ambientes com misturas químicas agressivas ou explosivas. Entre em contato com o fabricante para possível operação da unidade em atmosferas específicas.
1. Durante a instalação, assegure espaços de pelo menos 15 cm das paredes da unidade para outros itens para garantir o funcionamento normal (em particular, para garantir uma ventilação adequada).

- Não opere a unidade se ela estiver com defeito ou tiver sido instalada incorretamente.
- Não utilizar fora das salas de laboratório.
- Não verifique a temperatura por toque. Use um termômetro.
- Sempre limpe e descontamine o soquete e a tampa após a operação.
- Tome cuidado ao operar perto dos encaixes dos tubos rotativos.

## SEGURANÇA BIOLÓGICA E QUÍMICA

- Durante o tratamento mecânico e térmico dos materiais, é possível a formação de gases e substâncias perigosas (incluindo inflamáveis) e devem ser tomadas precauções.
- É da responsabilidade do utilizador proceder à descontaminação adequada se o material perigoso for derramado ou penetrar no equipamento. Os meios de desinfecção devem ser tais que não haja reações químicas perigosas entre os materiais derramados e os agentes de limpeza. Se necessário, consulte o fabricante.
- O tubo do biorreator deve ser selado muito bem. Consulte **4.5** para obter instruções sobre como testar os tubos.



**Cuidado** O produto não se destina ao uso em ambientes perigosos e com materiais perigosos (quimicamente ativos/agressivos, explosivos etc.). Não misture líquidos inflamáveis se isso puder levar ao perigo.

É responsabilidade do cliente validar o sensor e transmissor sob condições de usuário final de acordo com as precauções de segurança da aplicação para garantir que o uso do sensor seja seguro e adequado para a finalidade pretendida.

A Biosan não se responsabiliza explicitamente por perdas diretas ou indiretas causadas pela aplicação desses sistemas de medição. Em particular, deve considerar-se que podem ocorrer avarias devido à vida útil naturalmente limitada do sensor, dependendo da respectiva aplicação. A configuração de estações de medição de backup é recomendada ao usar os sensores em aplicações críticas para evitar perdas consequentes. É responsabilidade do cliente instalar um sistema de segurança adequado em caso de falha do sensor.

## 3. Informações Gerais

**RTS-8 plus** é um biorreator pessoal que utiliza a tecnologia patenteada Reverse-Spin® que aplica agitação não invasiva, mecanicamente acionada, baixo consumo de energia, onde a suspensão celular é misturada pela rotação do tubo do biorreator Falcon de uso único em torno de seu eixo com uma mudança de direção do movimento de rotação, resultando em mistura e oxigenação altamente eficientes para cultivo aeróbico. Combinado com um sistema de medição de infravermelho próximo, fluorescência e luminescência, é possível registrar a cinética de crescimento celular, pH e O<sub>2</sub> de forma não invasiva em tempo real. Para pH e O<sub>2</sub>, são usados pontos de sensor de uso único inovadores dentro dos tubos.

Embora o suprimento de O<sub>2</sub> seja um dos principais problemas no cultivo de organismos aeróbios, especialmente em condições limitadas de oxigênio, faltavam métodos

adequados para o monitoramento real do oxigênio dissolvido, e o suprimento suficiente de  $O_2$  era geralmente assumido. Sensores de oxigênio não invasivos inovadores integrados em tubos de falcão agora permitem o monitoramento on-line de oxigênio e fornecem novos insights sobre as atividades metabólicas.

O pH é um dos principais problemas no cultivo de células, leveduras ou bactérias. Tubos de cultivo limitados por sensores são amplamente aplicados no desenvolvimento de bioprocessos acadêmicos e industriais. Como métodos adequados para o monitoramento real do pH não estavam disponíveis, a amostragem com alta densidade de dados era difícil e interferindo com o crescimento. A medição não invasiva do pH em tempo real fornece novos insights sobre a atividade metabólica e as mudanças nas vias metabólicas.

#### **Vantagens dos pontos de sensor:**

- São pequenos.
- Seu sinal não depende da vazão da amostra.
- Eles podem ser fisicamente separados do sistema de medição, o que permite uma medição não invasiva.
- Podem ser utilizados em descartáveis.

Portanto, eles são ideais para o exame de pequenos volumes de amostras, para medições altamente paralelizadas em descartáveis e para aplicações biotecnológicas.

#### **O Biorreator Pessoal é aplicável em:**

- Microbiologia
- Biologia molecular
- Biologia celular
- Biotecnologia
- Bioquímica
- Biologia de Sistemas
- Biologia Sintética

#### **Aplicações típicas:**

- Cinética de crescimento em tempo real da fermentação
- Triagem de candidatos a clones
- Expressão proteica
- Experimentos de tensão e flutuação de temperatura
- Triagem e otimização de mídia
- Caracterização do crescimento
- Testes de inibição e toxicidade
- Controle de qualidade de cepas

#### **Características:**

- O cultivo paralelo permite economizar tempo e recursos para otimização de bioprocessos
- Biorreator controlado individualmente acelera processo de otimização
- Possibilidade de cultivar microrganismos microaerófilos e anaeróbios obrigatórios (condições anaeróbias não estritas)

- O princípio de mistura Reverse – Spin® permite a medição não invasiva de biomassa em tempo real
  - Sistema óptico infravermelho próximo permite registrar cinética de crescimento celular
  - Software gratuito para armazenamento, demonstração e análise de dados em tempo real
  - Design compacto com baixo perfil e espaço reduzido para aplicação pessoal
  - Controle de temperatura individual para aplicações em bioprocessos
  - Resfriamento ativo para controle rápido de temperatura, por exemplo, para experimentos de flutuação de temperatura
  - Perfil de tarefas para automatização de processos
  - Armazenamento de dados em nuvem para monitorar o processo de cultivo enquanto estiver longe ou usando um smartphone
  - A medição não invasiva de O<sub>2</sub> e pH permite o monitoramento preciso do metabolismo
- Atividades**

**Para usar totalmente os recursos do RTS-8 plus, o dispositivo deve estar conectado a um PC e ao software RTS-8 plus. O dispositivo não pode ser usado como uma unidade autônoma. Possibilidades de software:**

- Registro de crescimento celular em tempo real
- Medição e registro de pH e O<sub>2</sub> em tempo real
- Representação gráfica 3D de DO, pH, O<sub>2</sub> e taxa de crescimento ao longo do tempo ao longo da unidade
- Opção de pausa
- Opção Salvar/Carregar
- Opção de relatório: PDF e Excel
- Conecte até 1 unidade simultaneamente a 1 computador
- Opção de monitoramento remoto (requer conexão com a internet)
- Opções de ciclismo/criação de perfil
- Possibilidade de calibração manual do usuário para a maioria das células.

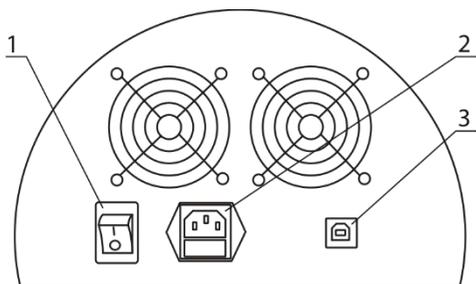
## 4. Primeiros passos

4.1 **Desembalando.** Remova cuidadosamente os materiais de embalagem e guarde-os para futura expedição e armazenamento da unidade. Examine cuidadosamente a unidade para verificar se há danos sofridos durante o trânsito. A garantia não cobre danos em trânsito.

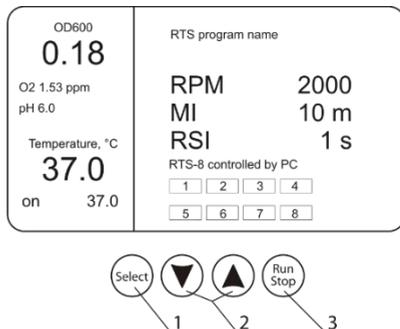
4.2 **Conjunto completo.** O conjunto de unidades inclui:

- **RTS-8 plus**, Biorreator multicanal ..... 1 un
- Tampas blackout com orifícios de ventilação ..... 8 unids
- Tubos TPP TubeSpin® Bioreactor, 50ml ..... 20 unids
- Tubos Estéreis TPP TubeSpin® Bioreactor, 50ml, com sensore de pH e O<sub>2</sub> ... 10 unids
- Folha de Dados de Calibração de pH e O<sub>2</sub> ..... 1–10 cópias

- Cabo de dados USB ..... 1 un
- Pen Drive USB com arquivos de instalação de software e manual ..... 1 un
- Cabo de alimentação ..... 1 un
- Manual de Operação, Declaração de Conformidade ..... 1 cópia



**Figura 1. Painel traseiro da unidade**



**Figura 2. Painel de Controle**

#### 4.3 Configurações.

- Coloque a unidade na superfície de trabalho uniforme e horizontal;
- Conecte o cabo de alimentação à tomada na parte traseira da unidade (fig. 1/2);
- Ligue o computador se ele estiver desligado;
- Conecte o cabo de dados USB à porta na parte traseira da unidade (fig. 1/3) e ao computador pessoal;
- Insira o Pen Drive USB no computador pessoal e instale o software seguindo o procedimento de instalação do software descrito no Manual de Instalação do Software.

#### 4.4 Características do tubo do biorreator:

- Tubos Tipo Falcon. TPP TubeSpin® Bioreactor;
- Volume de trabalho possível 3 – 50 ml (sistema óptico funciona de 7,5 a 50 ml); -
- Forma cônica;
- 5 aberturas (A, B, C, D, E) de tamanho diferente acima do filtro de PTFE estéril permeável ao gás da tampa de rosca;
- As aberturas podem ser seladas e, com isso, a troca ajustada à necessidade;
- A troca gasosa estéril é garantida pela membrana filtrante de 0,22 µm;
- Mesmo com uma alta densidade celular, o fornecimento de oxigênio através das aberturas é suficiente;
- O tubo se encaixa em um rotor de centrifuga padrão de 50 ml.

4.5 Devido à especificidade da fabricação do tipo molde de tubos centrifugos de falcão, a estrutura helicoidal da rosca do parafuso das tampas pode variar e, dadas as condições vigorosas de mistura, o líquido pode derramar se o tubo não for fechado firmemente. Os tubos podem apresentar defeito, e o derramamento de líquido é possível aproximadamente 1 de 60 tubos.

Antes de iniciar o experimento e deixar o dispositivo, os tubos devem ser verificados quanto ao derramamento de líquido que ocorre em um período de pelo menos 2 minutos a 2000 RPM e 1 s<sup>-1</sup> Intervalo de Rotação Reversa (RSI) com tampa fechada. Se aparecerem

gotículas de líquido na superfície interna da tampa, a tampa de rosca está defeituosa e o tubo deve ser substituído.

#### 4.6 Alteração das características ópticas do tubo em função da temperatura:

Quando a temperatura do material plástico está mudando, ou seja, durante a mudança de temperatura de 30°C a cada hora, o material plástico do tubo muda as características ópticas em uma faixa de  $\pm 0,2$  DO<sub>600</sub>.

4.7 Os sensores de pH e O<sub>2</sub> com tubos Falcon vêm em um pacote leve e estanque. É necessário armazenar os tubos na embalagem estanque e usá-los somente antes do início do experimento ou calibração.

## 5. Calibração do sistema óptico DO

5.1 **Verificação de calibração.** O dispositivo é calibrado por software com *suspensões de células de tensão selvagens E.coli BL21* ou *S.Cerevisiae* para operação com tubo TPP TubeSpin® Bioreactor 50ml na faixa de temperatura de +15°C a +60°C.

Para verificar a conformidade da calibração, siga os procedimentos subsequentes:

- Conecte o dispositivo ao PC, inicie o software e selecione a calibração de fábrica;
- Pegue um tubo TPP TubeSpin® Bioreactor 50ml;
- Adicionar  $10 \pm 0,1$  ml de água destilada;
- Feche bem a tampa do tubo;
- Insira o tubo no soquete;
- Defina o intervalo de medição (IM) para 1 minuto;
- Pressione o botão **Play** no software;
- O dispositivo começará a medir em 1 minuto e deverá ser concluído após 30 a 60 segundos e o valor DO deverá aparecer na tela e no software;
- Se o valor DO for igual a 0 ( $\pm 0,1$  DO), o dispositivo corresponde às configurações de pré-calibração de fábrica e é adequado para uso.

### 5.2 Criando calibração do usuário

5.2.1 Obtenha amostras de suspensão celular em tubos Falcon de 50 ml com densidades ópticas típicas de seus experimentos. Se o DO máximo do seu experimento (fase estacionária) para 5 DO<sub>600</sub> então as amostras recomendadas são 0 (ddH<sub>2</sub>O água ou caldo de meio) 1, 2, 3, 4, 5, 6 DO<sub>600</sub>.

Meça DO no comprimento de onda desejado de cada suspensão celular em espectrofotômetro com diluições prévias adequadas. A proporcionalidade entre DO<sub>600</sub> e densidade celular existe apenas para DO<sub>600</sub>  $\leq 0,4$  (aproximadamente), recomendamos diluir amostras para o intervalo de 0,1-0,2 DO.

Multiplique os valores do fator de diluição para obter o DO das amostras.

Continuar para a página de manual do software **29**.

5.2.2 RTS-8 plus pode ser calibrado para detectar a luz dispersa de qualquer célula possível com qualquer forma e tamanho possíveis, mas devido à diferença de dispersão de luz em várias suspensões de células, não podemos garantir a faixa de medição declarada em todas as condições.

## 6. Sistema óptico de pH e O<sub>2</sub> e sensores de informação e calibração

### 6.1 Informações gerais

#### 6.1.1 Sensor óptico de oxigênio.

A luz de um LED excita o sensor óptico de oxigênio para emitir fluorescência. Se o sensor encontra uma molécula de oxigênio, o excesso de energia é transferido para essa molécula em uma transferência não radiativa, diminuindo ou extinguindo o sinal de fluorescência. O grau de extinção correlaciona-se com a pressão parcial de oxigênio do analito na matriz, que está em equilíbrio dinâmico com o oxigênio da amostra. A medição do tempo de decaimento é referenciada internamente.

#### 6.1.2 Sensor óptico de pH.

Os sensores ópticos de pH usam o método Dual Lifetime Referenced (DLR), que permite medições referenciadas internamente. Uma combinação de diferentes corantes fluorescentes detecta mudanças de intensidade no domínio do tempo. O tempo de vida da luminescência medido é uma superposição dos sinais de um indicador sensível do analito e de um indicador de referência inerte, onde ambos os indicadores exibem tempos de vida de luminescência muito diferentes e a luminescência do indicador sensível do analito pode ser suprimida pelo analito. É essencial para as medições pré-calibradas e a fácil paralelização das medições através da calibração idêntica de muitos sensores.

#### 6.1.3 Dependência da temperatura dos pontos sensores de O<sub>2</sub> e pH.

É necessário fazer correções de temperatura para os pontos do sensor na mesma temperatura de trabalho, por exemplo, 37°C para *E.coli* ou 30°C para levedura. Por exemplo, em pH 7 um desvio de 0,1 pH por 5°C pode ocorrer sem correção de temperatura adicional.

#### 6.1.4 Limitações.



**Cuidado!** Sensores não suportam solventes orgânicos.

As medidas podem ser influenciadas por moléculas fluorescentes como fluoresceína ou rodamina.

O sensor de pH funciona melhor em soluções com força iônica > 50 mM e capacidade tampão > 2 mM. Em caso de concentrações mais baixas de sal ou capacidade tampão, o pH pode flutuar ou ser exibido incorretamente.

Os tampões coloridos frequentemente utilizados para eletrodos de pH podem interferir com os sensores ópticos químicos. Por favor, não use tampões coloridos para calibrar sensores de pH ópticos químicos.

Por favor, note que os sensores de pH não são adequados para medições em água doce ou torneira.

Os sensores precisam ser equilibrados antes do uso. Para fazer isso, você tem que encher o recipiente com sua mídia e esperar pelo menos 60 minutos para que o sensor possa se equilibrar.

A taxa de clareamento típica do sensor é de 0,035 pH por 1000 medições.

O desvio típico do sensor de O<sub>2</sub> < 0,03 % de O<sub>2</sub> em 30 dias (intervalo de amostragem de 1 min.).

6.2 **Verificação de calibração.** Cada lote de pontos de sensor é pré-calibrado, mas é necessário fazer calibração de um ou vários pontos para novos pontos de sensor para aumentar a precisão ou fazer correção por causa de 1) força iônica, 2) temperatura, 3) deriva, 4) clareamento fotográfico, 5) sensibilidade cruzada. Para verificar a calibração ou fazer correções, siga os procedimentos subsequentes:

- Conecte o dispositivo ao computador, inicie o software;
- Pegue um tubo TPP TubeSpin® Bioreactor 50ml tube com pontos de sensor;
- Adicionar 10 ± 0,1 ml de caldo de cultura com pH conhecido (para obter amostra com pH conhecido, consulte os protocolos de calibração manual do software, **páginas 32, 36, 40**) e O<sub>2</sub> conhecido (para obter amostra com O<sub>2</sub> conhecido, consulte os protocolos de calibração manual do software, **páginas 45, 46, 48**);
- Feche bem a tampa do tubo;
- Alinhe os pontos do sensor com as linhas indicadoras do soquete (figura 3);
- Insira o tubo no soquete;
- Ajuste o pH e O<sub>2</sub> MI para 1 minuto;
- Pressione o botão **Play** no software;
- O dispositivo começará a medir em 1 minuto e deve ser concluído após 5 a 60 segundos e os valores de pH e O<sub>2</sub> devem aparecer no visor e no software;

Se os valores de pH e O<sub>2</sub> forem iguais aos valores conhecidos adquiridos por protocolos de calibração de software, os sensores estão funcionando como pretendido.

## 7. Operação

### Recomendações durante a operação

- Remova o tubo Falcon do soquete do tubo antes de conectar ou desconectar a fonte de alimentação externa durante a operação.
- Inicie a operação aproximadamente 15 minutos após ligar o dispositivo. Algum tempo é necessário para a estabilização no modo de trabalho.
- 1. O posicionamento do tubo no soquete do tubo deve ser o seguinte: A marca de volumes do tubo TPP deve estar entre e oposta às duas marcações no rotor e os pontos do sensor devem estar alinhados com as duas marcações (figura 3); Esta posição permite que a luz de o laser deve ser transmitido sem interrupção por diferentes marcas apresentadas na superfície externa dos tubos e permite que o pH e a ótica de O<sub>2</sub> estejam no mesmo eixo que o ponto sensor.

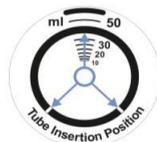


Figura 3. Posicionamento do tubo

- 7.1 Conecte o cabo de alimentação ao circuito elétrico.
- 7.2 Ligue a unidade pressionando o botão liga/desliga no painel traseiro (fig. 1/1).



**Nota.** Depois de ligar a unidade inicia o aquecimento e continua a manter a temperatura independentemente de outras operações.

- 7.3 Insira o tubo nos soquetes.
- 7.4 **Modo de controle do software.** Ligue o computador com o software instalado e continue trabalhando de acordo com o manual de operação do software.



**Nota.** Enquanto a unidade é controlada pelo PC, as teclas do painel frontal são limitadas em funções, apenas para funções das **teclas Run Stop**. A exibição da unidade mostra "RTS-8 controlado por PC".

- 7.5 **Modo manual.**
  - 7.5.1 Pressione a tecla **Select** (fig. 2/1) para ativar a possibilidade de mudar para um canal individual ou para um parâmetro (a caixa de canal ou parâmetro será realçado e piscando). A caixa de canal selecionada permanecerá piscando o tempo todo enquanto o dispositivo estiver ligado. As indicações das cores das caixas são as seguintes:
    - Marrom quando os canais não estão operando.
    - Amarelo quando um canal é ativamente selecionado pela **tecla Select** (com duração de 10 segundos), que permite alternar entre canais.
    - Verde quando os canais estão em operação.
    - Roxo quando o módulo óptico de pH e O<sub>2</sub> está operando.
  - 7.5.2 Use as teclas ▲ e ▼ (fig. 2/2) para mudar para um canal individual ou definir o valor necessário (a caixa será realçada e piscando).
  - 7.5.3 É possível definir pelas teclas ▲ e ▼ tempo entre medições de densidade óptica – MI, seleção de canal, velocidade de rotação (RPM), temperatura (°C), controle de temperatura (liga/desliga), Intervalo de Giros Reversos (RSI).
  - 7.5.4 Pressione a tecla **Run Stop** (fig. 2/3) para iniciar e parar a operação.



**Cuidado!** A parada de operação não interromperá o processo de aquecimento. Para parar de aquecer, a temperatura definida do processo deve ser diminuída manualmente até que a indicação "off" apareça.

- 7.6 Depois de terminar a operação, desligue a unidade com o interruptor de alimentação (fig. 1/1).
- 7.7 Desconecte o cabo de alimentação do circuito elétrico.

## 8. Métodos recomendados para o cultivo de microrganismos

- 8.1 **Anaeróbio facultativo *Escherichia Coli*:**  
2700 rpm (velocidade de giro do tubo),  
1 s<sup>-1</sup> (RSI),  
37° C (temperatura do soquete),  
7.5 ml (Volume de amostras no tubo de ensaio), 20 min., mas não menos (MI)
- 8.2 **Aeróbio termofílico *Thermophilus sp.*:**  
2700 rpm,  
1 s<sup>-1</sup> RSI,  
60° C  
15 ml  
20 min MI  
Taxa de evaporação a 60°C = 3,5 ml / 24 h (ajuste o parâmetro Volume de acordo para que o sistema de medição funcione corretamente)
- 8.3 **Aerotolerant anaerobe *L. acidophilus*:**  
0 rpm,  
0 s<sup>-1</sup> RSI,  
37° C,  
45 ml,  
20 min MI
- 8.4 **Levedura *S.Cerevisiae*:**  
2700 rpm,  
1s<sup>-1</sup>RSI,30°C  
7.5 ml  
20 min., mas não menos, MI
- 8.5 **Anaeróbio obrigatório *B. bifidum*:**  
0 rpm,  
0 s<sup>-1</sup> RSI,  
37° C  
50 ml (preenchido ao máximo)  
20 min MI

8.6 É possível ao utilizador final contactar o fabricante para aconselhar ou sugerir um microrganismo ou estirpe necessária a testar. Entre em contato com o departamento de P&D da Biosan através destes endereços de e-mail:

science@biosan.lv, igor@biosan.lv,

Igor Bankovsky, Consultor Biotecnólogo em Questões de Aplicação.

## 9. Recomendações para a criação de ambientes pessoais para o cultivo de microrganismos. Exemplos de resultados e pontos a serem considerados

### 9.1 Especificidades da distribuição de temperatura (psicrófilos, mesófilos, termófilos).

As temperaturas ideais de crescimento dos microrganismos são divididas em três grupos principais (ver fig. 4):

- Psychrophiles (I) – obligate (1) and facultative (2);
- Mesophiles (II);
- Thermophiles (III) – thermotolerant (3), facultative (4), obligate (5) and extremophile (6). Thick line mark represents optimal growth temperature.

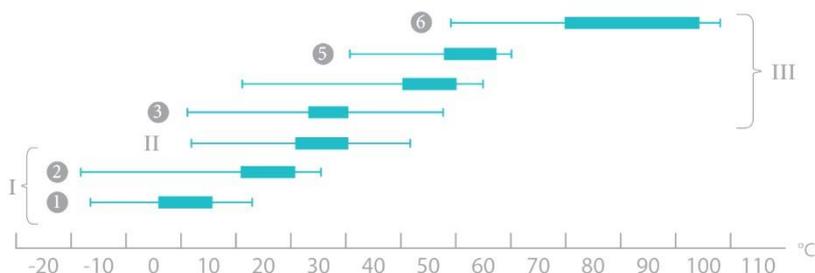


Figura 4. Limites de temperatura e zonas ótimas de crescimento de procariontes e sua classificação.

9.1.1 Para psicrófilos, que são cultivados a temperaturas de 15°C +2°C abaixo do ambiente, o dispositivo deve ser instalado em uma câmara fria ou uma câmara refrigerada. Apesar do resfriamento ativo do dispositivo, a temperatura real do reator sempre será diferente da temperatura real da amostra por causa de sua rotação.

9.1.2 Para microrganismos mesófilos, o dispositivo pode ser situado à temperatura ambiente.

9.1.3 Para microrganismos termofílicos, o dispositivo pode ser situado à temperatura ambiente.

### 9.2 Crescimento celular em função da intensidade de rotação.

Sabe-se que a aeração afeta o crescimento e a taxa de crescimento de microrganismos aeróbios. O RSI e o RPM afetam a taxa de consumo de oxigênio no biorreator. Resultados obtidos na fig. 5 e fig. 6 indicam que a taxa máxima de divisão celular é

detectada no RSI de  $1 \text{ s}^{-1}$  a uma velocidade de 2700 rpm. O aumento da pausa entre spins reversos reduz a taxa de crescimento celular e o rendimento de DO, atingindo ~44% do valor máximo (RSI  $1 \text{ s}^{-1}$ ), quando RSI is  $8 \text{ s}^{-1}$ .

9.2.1 Legenda do experimento (fig. 5.): O biorreator multicanal RTS-8 plus foi usado com Laser de 850 nm, volume de Terrific Broth (TB) em tubo Falcon 50 ml foi 10 ml, RSI 1, 2, 4, 8  $\text{s}^{-1}$ , MI 10 min, RPM 2000, temperatura  $37^\circ \text{C}$ , tubo TPP Bioreactor.

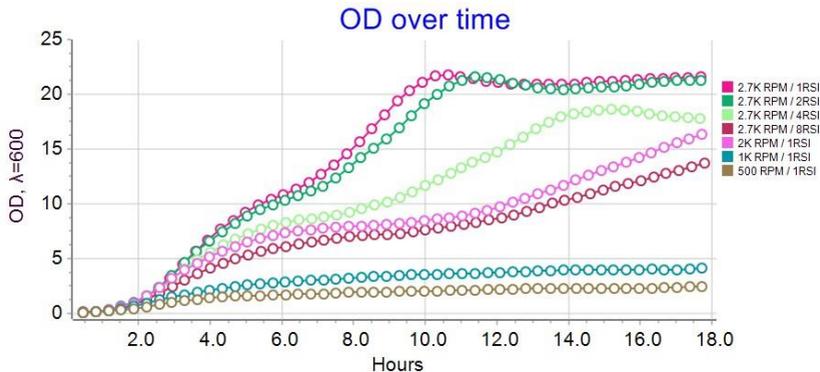


Figura 5. Influência do Intervalo de Giro Reverso e RPM na Cinética de Crescimento ( $\Delta OD_{\lambda=600\text{nm}}/\Delta t$ ) vs Tempo de fermentação (h).

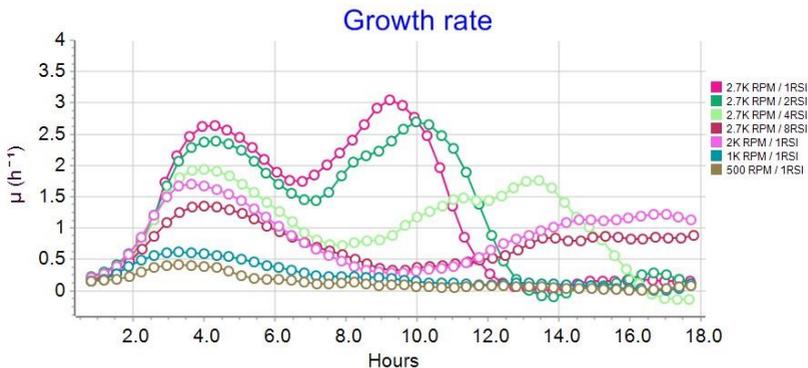


Figura 6. Influência do Intervalo de Giro Reverso e RPM na Cinética de Crescimento ( $\Delta OD_{\lambda=600\text{nm}}/\Delta t$ ) vs Tempo de fermentação (h).

### 9.3 Aeração e tipos de tubos recomendados.

Para microrganismos aeróbios, recomenda-se o uso de tubos que são fornecidos pela TPP - Biorreator TubeSpin® 50 ml. Para obter ótimos resultados de crescimento de anaeróbios aerotolerantes, é necessário selar a tampa de rosca do Biorreator TPP TubeSpin® 50 ml por fita adesiva ou usar tubos Falcon TPP 50 ml que estão disponíveis sem saídas de ar. O usuário também pode usar tubos de centrifuga padrão do tipo Falcon de 50 ml, levando em conta que o material do tubo será tão transparente quanto o tubo do Biorreator TPP TubeSpin® ou deve criar calibração do usuário.

#### 9.4 Resultados de exemplo de medição de pH e pO<sub>2</sub>

Os tubos Falcon do biorreator de uso único foram preenchidos com meio nutriente e cobertos com tampas de rosca providas de aberturas respiratórias especiais, as quais foram fechadas com uma membrana semipermeável ao oxigênio. Em seguida, esses tubos de 50 ml foram colocados em RTS-8 plus e o processo de fermentação foi iniciado sincronicamente.

O volume de trabalho foi de 10 ml, a temperatura de cultivo foi de 37°C, o intervalo de medição (IM) dos sensores foi a cada 20 minutos, o intervalo de rotação reversa (RSI) do tubo 1 vez por segundo, a intensidade de rotação dos tubos - de acordo com as assinaturas das legendas (fig. 9). A intensidade da aeração foi alterada alterando-se a velocidade de rotação ou velocidade angular ( $\omega$ ) do tubo do biorreator em faixas discretas de  $\omega = 1000$  rpm (curva verde),  $\omega = 1500$  rpm (verde claro),  $\omega = 2000$  rpm (curva rosa) e  $\omega = 2700$  rpm (curva roxa).

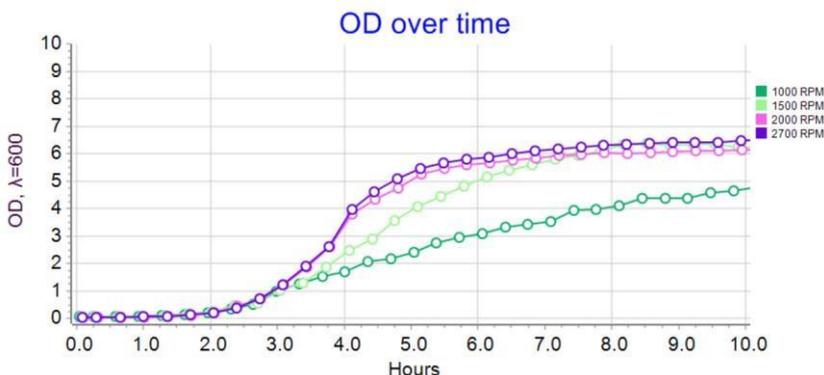


Figura 7. Influência da velocidade de rotação na dinâmica de crescimento celular em meio LB

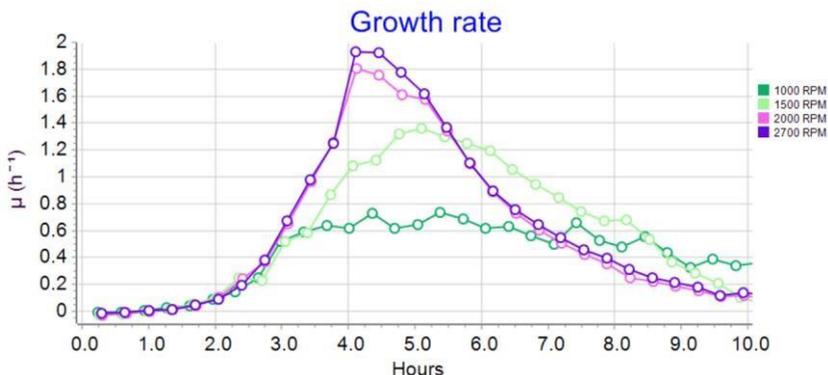
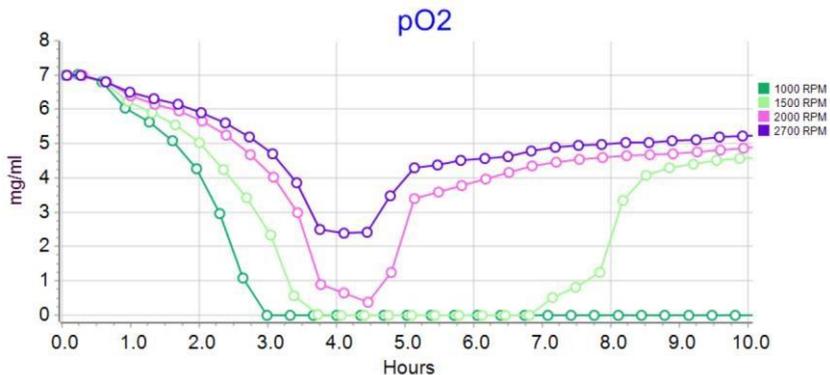
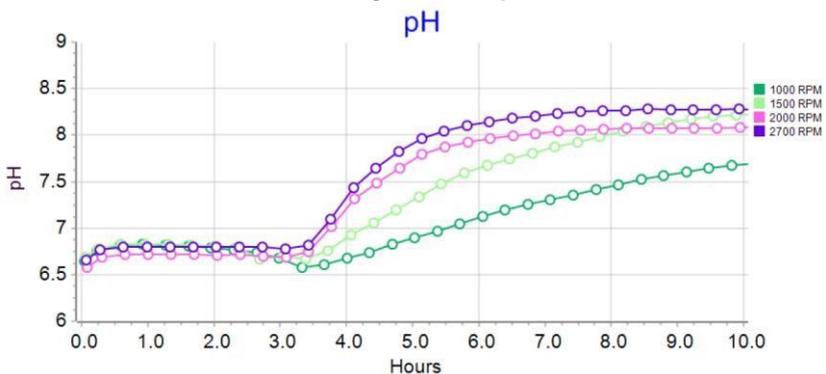


Figura 8. A influência da velocidade de rotação do tubo (a intensidade da aeração) na taxa de crescimento específico da biomassa das células.



**Figura 9. Influência da velocidade de rotação do tubo na dinâmica da mudança na concentração de oxigênio na suspensão celular.**



**Figura 10. Influência da velocidade de rotação na dinâmica de mudança de pH no meio de cultura**

Consideremos os dados obtidos da dependência da mudança na taxa de crescimento do consumo de oxigênio e do pH do meio nutriente com a taxa de rotação do tubo. A partir dos dados obtidos (ver fig. 9), fica claro que um aumento na velocidade de rotação do tubo leva a uma aceleração da taxa de crescimento da densidade óptica do meio nutriente (DO600) e, portanto, das células cuja concentração (em mg/ml) corresponde aos valores de DO600. A maior diferença na concentração celular é para 4-5 horas de cultivo e, após 10 horas, a DO de todas as variantes é comparada na região de 6,0-6,5 DO600, que é o máximo rendimento possível de biomassa de células de *E. coli* BL21 no meio LB.

E agora vamos observar os dados obtidos nas coordenadas da taxa de crescimento da biomassa das células dependendo do tempo de fermentação (see fig. 10).

A partir da figura 8, pode-se ver que um aumento em  $\omega$  de 1000 para 1500 e depois 2000 rpm leva a cada passo a um aumento de 0,7 vezes na taxa máxima de crescimento da biomassa de células (o valor é expresso em  $OD_{600}/h^{-1}$ ). Um novo aumento de  $\omega$  2000 rpm para  $\omega$  2700 rpm não leva a um aumento na taxa de crescimento

específica. Portanto, em um único meio LB a 10 ml do volume de trabalho do biorreator, as condições de aeração alcançadas em  $\omega$  2000–2700 rpm para essa cepa não são limitantes. Ao mesmo tempo, a faixa abaixo de  $\omega$  2000 rpm leva às condições limitantes de oxigênio. Além disso, os dados apresentados na fig. 8 confirmam as observações acima mencionadas.

A partir dos dados apresentados na fig. 9, observa-se que durante a transição da cultura para a fase logarítmica de crescimento, observa-se aumento na intensidade do consumo de oxigênio do meio consumido para geração aeróbia de ATP. Se em condições de aeração intensiva (correspondendo a  $\omega = 2000$  rpm e  $\omega = 2700$  rpm) a cultura celular não cai em choque hipóxico, então para intensidade de aeração correspondente a  $\omega$  a partir de 1500 e abaixo, observa-se hipóxia - isto é, um estado em que a OTR é menor do que a intensidade do consumo de oxigênio pela cultura. É interessante notar que essa transição é observada em concentrações celulares no meio correspondentes aos valores apresentados na Tabela 2.

A Tabela 2 é de interesse prático e pode servir de orientação para ampliação do bioprocessos.

**Tabela 2. Dependência da concentração celular na qual a hipóxia é observada a partir da intensidade de rotação do tubo.**

$\omega$ (rpm)	$\mu_{\max}$	DO600
2700	1.95	4
2000	1.8	3.75
1500	1.35	2.5
1000	0.7	1.75

Agora vamos considerar o que acontece com o pH do meio nutriente durante a fermentação e como este parâmetro é afetado pela intensidade da aeração.

É necessário observar duas seções da dependência do pH com o tempo de fermentação:

1) retenção estável do pH na faixa de pH inicial de 6,8, 2) alcalinização do meio nutriente para pH 8,3 a partir do momento da limitação da oxigenação. A partir dos dados obtidos, conclui-se que a alteração por microrganismos do pH do meio não é uma resposta à limitação de oxigênio (hipóxia), mas é resultado de outro processo não associado a processos aeróbios. Como a fonte de carbono para o ciclo do ácido tricarbóxico é, via de regra, os cetoácidos que resultam da desaminação e desamidação dos aminoácidos presentes no LB (hidrolisado triptolítico da proteína do leite da caseína), então torna-se compreensível quanto à alcalinização do meio nutriente para pH 8,3 – o ponto de deslocamento de equilíbrio da solução de amônia  $\text{NH}_4\text{OH}$  em relação ao gás amoníaco  $\text{NH}_3$  após 4 a 5 horas de fermentação.

9.5 As células que são usadas para calibração de fábrica são *E.coli BL21 (recém-cultivada usando meio TB durante a noite)* ou cepa selvagem *S.Cerevisiae (recém-cultivada usando meio YPD durante a noite)*.

#### 9.6 Influência da fase de crescimento da calibração de fábrica no erro de medição alcançável de calibração do usuário

Durante a transição de crescimento das células da fase exponencial para a estacionária, uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas ocorrem, incluindo a diminuição

do volume celular e a mudança da forma celular. Portanto, se as células são tomadas para medição referente usando espectrofotômetro em diferentes estágios da fase estacionária, então a correção da medição pode ser pior do que o especificado. Além disso, os resultados de medição DO de espectrofotômetros diferem entre si e dependem da configuração óptica, como o tamanho da abertura, por exemplo. Portanto, é requisito para aplicação do mesmo espectrofotômetro de medição DO para repetibilidade dos resultados.

### **9.7 Calibração do usuário**

A calibração depende do tamanho e volume da célula. A calibração de um tipo de microrganismo não pode ser utilizada com precisão para outro tipo de microrganismo de outro tamanho e forma. O dispositivo pode ser calibrado no comprimento de onda de referência desejado para atender às necessidades do usuário, mas a faixa de medição especificada completa não pode ser garantida. As calibrações de fábrica são realizadas utilizando células de *E.coli* BL21 (fase estacionária) e células silvestres de *S. Cerevisiae* (fase estacionária).

## 10. Especificações

A unidade é projetada para operação à temperatura ambiente de +4°C a +40°C em uma temperatura sem condensação e umidade relativa máxima de 80% para temperaturas de até 31°C diminuindo linearmente a 50% de umidade relativa a 40°C.

A Biosan está comprometida com um programa contínuo de melhoria e se reserva o direito de alterar o projeto e as especificações do equipamento sem aviso prévio.

### 10.1 Especificações de medição óptica

Fonte de luz.....	Laser
Comprimento de onda ( $\lambda$ ), nm .....	850 $\pm$ 15
Faixa de medição, OD <sub>600</sub> .....	0–100
Faixa de medição de calibração de fábrica, OD <sub>600</sub>	
<i>E. coli</i> .....	0–50
<i>S. Cerevisiae</i> .....	0–75
Erro de medição alcançável de calibração do usuário, OD <sub>600</sub>	
0.1–6 .....	$\pm$ 0.3
6–50 .....	$\leq$ 5%
50–75 .....	$\leq$ 10%
Medição em tempo real, intervalo de medição, min .....	1–60
Resolução de configuração de tempo, min .....	1

### 10.2 Especificações do sensor de O<sub>2</sub>

Faixa, % O <sub>2</sub> .....	0–100%
Exatidão, a 20.9 %, em % O <sub>2</sub> .....	$\pm$ 0.4
a 0.2 %, em % O <sub>2</sub> .....	$\pm$ 0.05
Desvio a 0% O <sub>2</sub> .....	< 0.03 % O <sub>2</sub> no prazo de 30 dias (intervalo de amostragem de 1 min)
Faixa de temperatura, °C .....	até 40
Tempo de resposta (t <sub>90</sub> ), segundos .....	< 6
Limite de detecção, % O <sub>2</sub> .....	0.03
Resolution, a 20.9 %, em % O <sub>2</sub> .....	$\pm$ 0.1
a 0.2 %, em % O <sub>2</sub> .....	$\pm$ 0.01

### 10.3 Especificações do sensor de pH

Faixa, pH .....	4.0–8.5
Exatidão a pH 7, pH.....	$\pm$ 0.10
Desvio, pH por dia .....	< 0.005
Faixa de temperatura, °C .....	até 40
Tempo de resposta <sup>1</sup> (t <sub>90</sub> ), segundos.....	< 120

---

<sup>1</sup> Sensor equilibrado mantido em solução bem agitada a + 37 °C

## 10.4 Especificações de temperatura<sup>1</sup>

Intervalo de configurações, °C .....	+15...+60
Ponto de intervalo de controle inferior, °C .....	15 abaixo ambiente
Ponto de faixa de controle superior, °C .....	60
Resolução de configuração, °C .....	0.1
Estabilidade, °C .....	± 0.3
Sample temperature accuracy, °C	
20 °C ... 37°C.....	± 1
< 20 °C .....	± 2
> 37 °C .....	± 2

## 10.5 Especificações gerais

Soquetes de tubo .....	8
Intervalo de volume de trabalho de amostra, ml .....	3–50
Volume de trabalho de amostra para que o sistema óptico funcione conforme especificado, ml .....	7.5–50
Faixa de velocidade, rpm .....	150–2700
Resolução de ajuste de velocidade, rpm .....	1
Intervalo de tempo de rotação inversa, seg	
150–250 rpm .....	0
250–300 rpm .....	2–60
300–2700 rpm .....	0–60
Tela .....	LCD
Dimensões totais (L × P × A), mm .....	690×350×300
Peso <sup>2</sup> , kg .....	20
Corrente de entrada .....	AC 230 V, 50 Hz
Consumo de energia .....	3.15 A / 500 W

## 11. Manutenção

- 11.1 Se a unidade precisar de manutenção, desconecte-a da rede elétrica e entre em contato com a Biosan ou seu representante Biosan local.
- 11.2 Todas as operações de manutenção e reparo devem ser realizadas apenas por pessoal qualificado e especialmente treinado.
- 11.3 O etanol padrão (75%) ou outros agentes de limpeza recomendados para limpeza de equipamentos de laboratório podem ser usados para limpeza e descontaminação da unidade.
- 11.4 Limpe o rotor do dispositivo de gotículas líquidas e possíveis contaminações após o término da fermentação.

<sup>1</sup> Em temperatura ambiente estável de 20 a 25 °C

<sup>2</sup> Preciso dentro ±10%

- 11.5 Troca de fusíveis. Desconexão do circuito elétrico. Remova o plugue de alimentação da parte traseira da unidade (fig. 1/2). Puxe o suporte do fusível aplicando alavancagem no recesso (figura 11). Retire o fusível do suporte. Verifique e substitua pelo fusível correto, se necessário, **M** 3,15 A para 230 V e **M** 8,0 A para 120 V (tipo **M** - intervalo de tempo: Médio ).

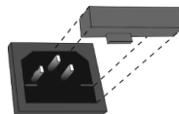


Figura 11. Troca fusível

## 12. Garantia e Reclamações

- 12.1 O Fabricante garante a conformidade da unidade com os requisitos das Especificações, desde que o Cliente siga as instruções de operação, armazenamento e transporte.
- 12.2 A vida útil garantida da unidade a partir da data de sua entrega ao Cliente é de 24 meses. Para obter a garantia estendida, consulte **12.5**.
- 12.3 A garantia cobre apenas as unidades transportadas na embalagem original.
- 12.4 Se algum defeito de fabricação for descoberto pelo Cliente, uma reclamação de equipamento insatisfatório será compilada, certificada e enviada para o endereço do distribuidor local. Visite a seção **Suporte técnico** em nosso site no link abaixo para obter o formulário de solicitação.
- 12.5 Garantia estendida. Para o **RTS-8 plus**, o modelo da classe *Smart*, a garantia estendida é um serviço pago. Entre em contato com seu representante Biosan local ou nosso departamento de serviços através da seção de **Suporte técnico** em nosso site no link abaixo.
- 12.6 A descrição das classes de nossos produtos está disponível na seção **Descrição da classe de produto** em nosso site no link abaixo.

**Suporte técnico**



[biosan.lv/en/support](https://biosan.lv/en/support)

**Descrição da classe de produto**



[biosan.lv/classes-en](https://biosan.lv/classes-en)

12.7 As informações a seguir serão necessárias caso seja necessário um serviço de garantia ou pós-garantia. Preencha a tabela abaixo e guarde para seus registros.

Modelo	Número de série	Data da venda
<b>RTS-8 Plus,</b> Biorreator pessoal multicanal com medição em tempo real de DO, pH e pO <sub>2</sub> não invasivo		

12.8 **Data de produção.** A data de produção é colocada no número de série, na etiqueta da unidade. O número de série consiste em 14 dígitos denominados XXXXXYYMMZZZZ, onde XXXXXX é o código do modelo, YY e MM – ano e mês de produção, ZZZZ – número da unidade.

## 13. Declaração de Conformidade UE

13.1 Biorreator multicanal pessoal com medição em tempo real de OD, pH e pO<sub>2</sub> não invasiva **RTS-8 Plus** está em conformidade com as seguintes legislações relevantes da União:

<b>LVD 2014/35/EU</b>	<b>LVS EN 61010-1:2011</b> Requisitos de segurança para equipamentos elétricos para medição, controle e uso em laboratório. Requisitos gerais.
<b>EMC 2014/30/EU</b>	<b>LVS EN 61326-1:2013</b> Equipamentos elétricos para medição, controle e uso em laboratório. Requisitos da EMC. Requisitos gerais.
<b>RoHS3 2015/863/EU</b>	Diretiva relativa à restrição do uso de determinadas substâncias perigosas em equipamentos elétricos e eletrônicos.
<b>WEEE 2012/19/EU</b>	Diretiva relativa aos resíduos de equipamentos elétricos e eletrônicos.

13.2 A Declaração de Conformidade está disponível para download na página do modelo relevante em nosso site pelos links abaixo, na seção **Downloads**:



**RTS-8 Plus**

**Biosan SIA**

Ratsupites 7 k-2, Riga, LV-1067, Latvia

Phone: +371 67860693, +371 67426137

Fax: +371 67428101

**<https://biosan.lv>**

Edição 1.17 – Maio de 2022