

Monitorización del crecimiento de microorganismos en sistemas cerrados utilizando espectroscopia de impedancia eléctrica

R.A. Olguín-Sánchez,*
J.A. Rojas-Rendón,*
M.J. Díaz-Campillo,**
Y. Salazar*

* Departamento de Ingeniería Eléctrica-Electrónica, Instituto Tecnológico de Durango.

** Lab. de Biotecnología de la División de Estudios de Postgrado, Instituto Tecnológico de Durango.

Correspondencia:

Y. Salazar.

Blvd. Felipe Pescador Núm. 1830,

Ote. Durango, Dgo. 34080.

Tel: 8-17-23-03. Fax: 8-29-09-00

E-mail: ysalazar@itdurango.edu.mx

Artículo recibido: 19/marzo/2009

Artículo aceptado: 2/noviembre/2009

RESUMEN

Actualmente la supervisión de procesos biológicos opta por la optimización de tiempos y costos de producción. Lo que involucra la monitorización de microorganismos en sus diferentes etapas de crecimiento. Por lo tanto, el objetivo es obtener curvas de crecimiento en línea como función de los cambios de magnitud de impedancia ($|Z|$) y ángulo de fase (Φ), empleando espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS). Para ello, se implementó un sistema de medición constituido por un analizador LCR y un front-end. Se utilizó la técnica de medida de EIS tetrapolar con un rango de frecuencia de 20 Hz a 200 kHz. Se realizaron medidas en 3 distintos medios: agua destilada, Caldo de nutrientes y Caldo de nutrientes con inóculo de levaduras tipo *Saccharomyces cerevisiae*. Las medidas de EIS se validaron con el conteo de microorganismos por medio de la cámara de Neubauer. Los resultados muestran que el inóculo de levaduras presenta un $\Delta|Z|$ y $\Delta\Phi$ de 2.1% y 0.05° en la fase de retardo, 9.6% y -0.15° en la fase de crecimiento, 1.3% y -0.04° fase estacionaria y -3.35% y -0.1° en la fase de muerte, con respecto del caldo de nutrientes. La evolución del $\Delta|Z|$ y Φ respecto al tiempo a una frecuencia de 200 kHz con relación al conteo celular presentan un índice de correlación de 0.95. Por lo tanto, la monitorización de crecimiento de microorganismos en línea por el método de EIS, resulta un método viable para el seguimiento y visualización de las diferentes etapas de crecimiento del cultivo de microorganismos respecto al tiempo.

Palabras clave: Espectroscopia de impedancia eléctrica, impedancia eléctrica, microbiología de impedancia, biomasa.

ABSTRACT

Nowadays, the supervising of biological process is trying to use the time and production costs optimization. This process involves the microorganism monitoring throughout the biomass growing stages. Therefore, the objective of this study is to obtain the time behavior of the biomass concentrations as function of the impedance changes: both in the magnitude ($|Z|$) and in the phase (Φ). The impedance was monitored by the electrical impedance spectroscopy (eis). To do this, a measurement system was implemented using a lcr impedance-meter and a front-end. The measurement technique uses an eis with four poles. The frequencies used in the system are within the range of 20 hz a 200 khz. Three different culture media were used to

perform the monitoring: distilled water, nutrients broth and nutrients broth strengthen with inoculums of the yeast known as *saccharomyces cerevisiae*. The eis measurements were validated through the microorganism counting performed in a Neubauer chamber. The achieved results shown that the inoculated broth has a change of 2.1% and 0.05° regarding to the $\Delta|Z|$ and $\Delta\Phi$ respectively in the delay phase. The growing phase has changes of 9.6% and -0.15° in the same variables while the steady state phase showed different values: 1.3% and -0.04°. The death stage was characterized by changes of 3.35% and -0.1° in the same impedance elements. These variations were obtained with respect to the nutrients broth. The time evolution of $\Delta|Z|$ and Φ measured with a frequency of 200 kHz has a correlation index of 0.95 with respect to the cell's counting. Therefore, the on-line monitoring of the microorganism concentration using the eis method seems to be a viable method to determine and visualize the different developing stages of cells cultures.

Key Words: Electrical impedance spectroscopy, electrical impedance, microbiology impedance, biomass.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la supervisión de procesos biológicos opta por la optimización de tiempos y costos de producción, así como la exactitud en los procesos industriales, además de ser una herramienta de optimización para los procesos de ingeniería de tejidos a través de la monitorización de cultivos celulares¹.

El proceso de crecimiento de microorganismos cobra importancia, ya que desde la antigüedad a la fecha el hombre ha estado relacionado con la actividad de estos seres vivos para beneficio propio, por lo que en los últimos años se ha enfocado en el estudio de caracterización de éstos. La medición del crecimiento de microorganismos (Figura 1),

en sus diferentes etapas de crecimiento se ha convertido en una prioridad por tener el máximo control permisible debido a la aplicación a la que se ha destinado, principalmente en áreas como la biomédica¹⁻³, ambiental⁴, minera⁵ y alimenticia⁶.

Los métodos de medición del crecimiento microbiano, en muestras líquidas, se dividen en dos: métodos directos e indirectos.

Los métodos directos se basan principalmente en técnicas de laboratorio como la determinación de peso seco y por lo general, requiere de largos periodos de tiempo para cuantificación de la biomasa e impide la monitorización de este parámetro en tiempo real.

Un método indirecto es la técnica de medición de la impedancia eléctrica o bioimpedancia⁷. La

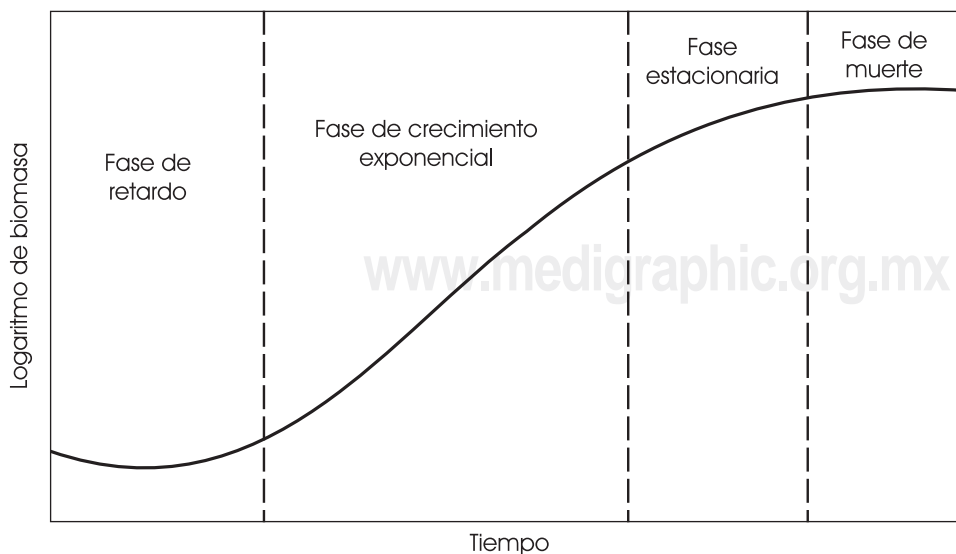


Figura 1. Curva de crecimiento de un cultivo cerrado (Batch).

técnica de impedancia eléctrica define dos métodos de aplicación a la microbiología, la microbiología de impedancia (MI) y la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS, por sus siglas en inglés Electrical Impedance Spectroscopy).

La microbiología de impedancia (MI), también llamada microbiología de impedancia clásica, se define como el monitoreo por impedancia del crecimiento de microorganismos. Éste puede realizarse colocando dos electrodos de metal sumergidos en un medio de cultivo inoculado, midiendo entre ellos la impedancia bipolar a una frecuencia fija mientras crecen los microorganismos presentes⁸. En él se miden los cambios de conductancia del medio o de capacidad de interfase debidos a la actividad metabólica de los microorganismos presentes en un medio de cultivo. Es decir, no se mide directamente la presencia de células, sino su actividad metabólica.

En cambio la espectroscopia de impedancia eléctrica mide las propiedades dieléctricas de un medio en función de la frecuencia, es decir, consiste en una serie de mediciones de impedancia eléctrica de una muestra a diferentes frecuencias, regularmente en el rango de 10 kHz hasta 10 MHz. El método de medida de EIS se ha implementado en áreas de investigación como la biomédica⁹, metalúrgica (caracterización de materiales ferrosos)¹⁰ y la industria alimenticia¹¹.

Los estudios basados en la medición de biomasa con EIS se centra en las características de la dispersión β , que está centrada en la región de radiofrecuencia del espectro electromagnético, se debe principalmente a la carga y descarga de la capacidad de la membrana celular, y es una propiedad exclusiva de las células con membranas intactas, esto es, de las células viables¹². La magnitud de esta dispersión está dada por el número de células presentes¹³.

Este método se basa en el fenómeno de la reactancia capacitiva, producida por el comportamiento eléctrico de la membrana celular al paso de una corriente alterna a través de ella en cada célula viva (Figura 2).

Los elementos no-biomasa, como burbujas, gotas de aceite, sólidos en suspensión y necromasa (materia orgánica muerta), presentes en un fermentador no contribuyen a los cambios de permitividad relativa¹⁴.

En la actualidad, las aplicaciones de medida de impedancia eléctrica, en la monitorización de microorganismos, ha sido empleada en la industria del vino espumoso y análisis de fangos activos^{15,16}.

Hoy en día, se cuenta con equipos electrónicos de laboratorio que miden la impedancia eléctrica de una gran variedad de materiales, y son capaces de determinar diferentes parámetros (impedancia eléctrica en magnitud y ángulo de fase, resis-

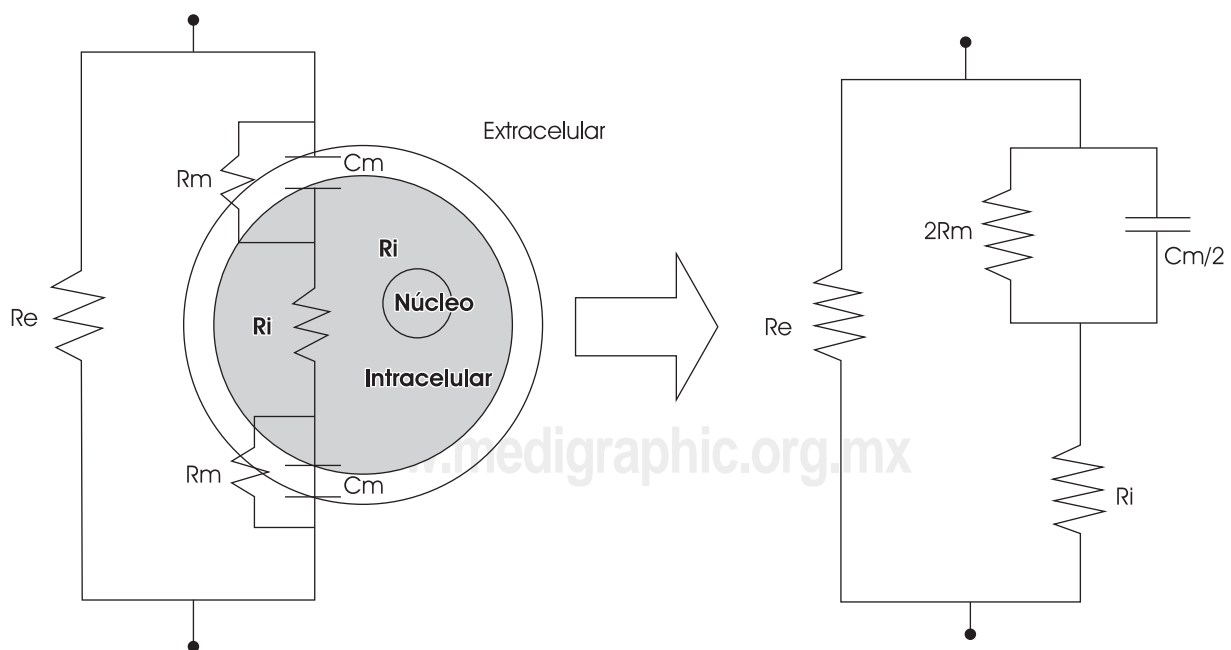


Figura 2. Modelo eléctrico aproximado equivalente al comportamiento de una célula al paso de corriente alterna (Rabbat, 1988).

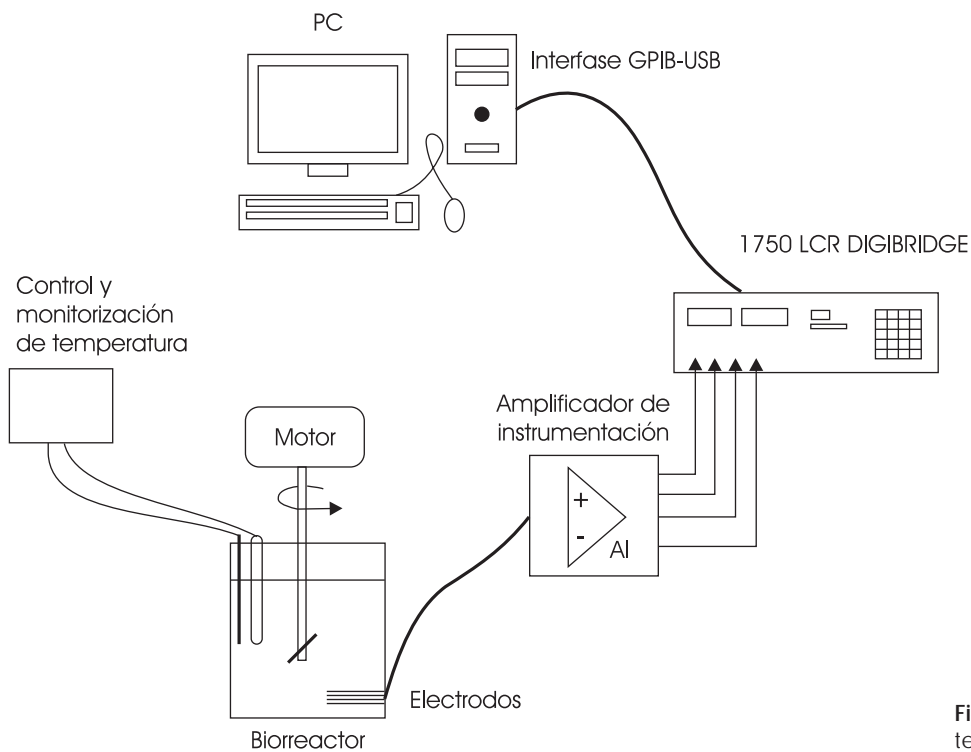


Figura 3. Esquema general del sistema de medida.

tencia, capacitancia e inductancia) con gran velocidad y exactitud, al igual, permiten realizar este tipo de medidas a diferentes frecuencias y voltajes. Estas características permiten diseñar e integrar sistemas de medida de impedancia eléctrica.

Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo es monitorizar en tiempo real muestras líquidas para determinar el crecimiento de microorganismos por medio de un sistema de medida de impedancia eléctrica en un sistema de crecimiento cerrado (Batch).

II. METODOLOGÍA

El sistema (Figura 3), está integrado por un analizador 1,750 LCR que realiza medidas de impedancia eléctrica en un rango de frecuencias de 20 Hz a 200 kHz, a un voltaje de prueba de 100 mV, programado y controlado por medio del puerto GPIB, y medición de impedancia eléctrica por el método tetrapolar (4 electrodos).

La interfase (front end), está constituida por un amplificador de instrumentación para adaptar las impedancias. Se ha diseñado con una ganancia diferencial de tal manera que permita obtener un CMRR alto.

Los electrodos utilizados son de acero inoxidable (tipo 304) de 1.1 mm de diámetro, 50 mm de

longitud y con una separación entre electrodos de 5 mm. Están montados en un bioreactor (recipiente plástico) de 1,000 ml de volumen a una altura proporcional de 1/5 de la altura total del bioreactor.

El método de medida tetrapolar de impedancia consiste en inyección de corriente por los electrodos de los extremos (H_{cur} , L_{cur}) y la detección de potencial entre los electrodos internos (H_{pot} , L_{pot}).

El crecimiento de la levadura requiere de una temperatura constante y estable de 28 °C, por lo que se emplea un control de temperatura que permite tener una temperatura óptima en el bioreactor plástico, necesaria para que el microorganismo crezca de manera eficiente (la descripción del sistema de control de temperatura se describe en Mar-Luna¹⁷). La agitación interna se realiza por medio de un motor de corriente directa con una velocidad de agitación fija de 120 rpm; según las investigaciones de Soley et al a la agitación a esta velocidad no afecta el valor del parámetro de $|Z|$ y Φ ¹⁸.

La computadora personal tiene instalado el software de programación de entorno gráfico para el control, adquisición y despliegue de datos; así como los controladores para la interfase GPIB-USB.

Sistema de medición de impedancia

El sistema de medición de impedancia eléctrica realiza un barrido de frecuencias en un espectro de 20 Hz a 200 kHz con 10 frecuencias por década, espaciadas logarítmicamente. Se programa con un voltaje de prueba pre-establecido. El sistema adquiere la magnitud de impedancia ($|Z|$) y ángulo de fase (Φ) de la solución de prueba por triplicado para cada frecuencia de análisis, en intervalos de 15 minutos durante 30 horas. El barrido frecuencial tarda 130 segundos en promedio en la adquisición de datos. En esta configuración el sistema permite almacenar continuamente los datos medidos.

Muestras líquidas

Las muestras líquidas que se midieron con el sistema son:

1. Agua destilada (400 ml), se realizaron 4 medidas de 27 a 30 °C con incrementos de 1 °C, sin agitación.
2. Caldo de nutrientes para el cultivo de microorganismos (1,000 ml). Su composición es dextrosa (20 g/l), peptona de caseína (5 g/l), peptona de carne (5 g/l), y agua destilada. El caldo de nutrientes se midió a 28 °C con agitación de 120 rpm antes de llevar a cabo la inoculación del medio, esto con el propósito de que el caldo de nutrientes se utilice como la referencia «cero» para el análisis de los datos.
3. Cultivo de microorganismos (1,000 ml). Caldo de nutrientes con inóculo de levaduras tipo *Saccharomyces cerevisiae*. Las medidas se realizaron en las mismas condiciones que el caldo de nutrientes (28 °C, 120 rpm). El tiempo de monitorización es de 30 h continuas con el sistema de medida.

Para validación del crecimiento de microorganismos se tomaron muestras de la solución con una pipeta de precisión de 100 μ l por triplicado cada hora. El conteo celular se realizó por medio de la técnica de la cámara de Neubauer.

El análisis descrito en los puntos 2 y 3 se realizaron para cuatro diferentes experimentos en sistema cerrado o tipo Batch.

Análisis de datos

Los datos de $|Z|$, Φ obtenidos por el sistema se analizarán en dos formas: en función del tiempo y de la frecuencia. Para determinar los incrementos de $|Z|$ se calculan a partir de la ecuación 1.

$$\Delta|Z| = \frac{|Z|_{\text{caldo con inóculo}} - |Z|_{\text{caldo con nutrientes}}}{|Z|_{\text{caldo con nutrientes}}} \times 100\% \quad \text{Ec. 1}$$

Mientras que la variación en Φ por la ecuación 2.

$$\Delta\phi = \phi_{\text{caldo con inóculo}} - \phi_{\text{caldo con nutrientes}} \quad \text{Ec. 2}$$

Además, para el análisis en frecuencia se identifican las cuatro etapas de crecimiento microbiano para un análisis independiente de cada una.

El índice de correlación se determinará a partir de los conteos celulares de cada uno de los cultivos respecto a $\Delta|Z|$ y $\Delta\Phi$.

III. RESULTADOS

3.1 Agua destilada

Los resultados que se muestran en la Figura 4 corresponden a la magnitud de la impedancia eléctrica ($|Z|$). En ella se observa un decremento en el

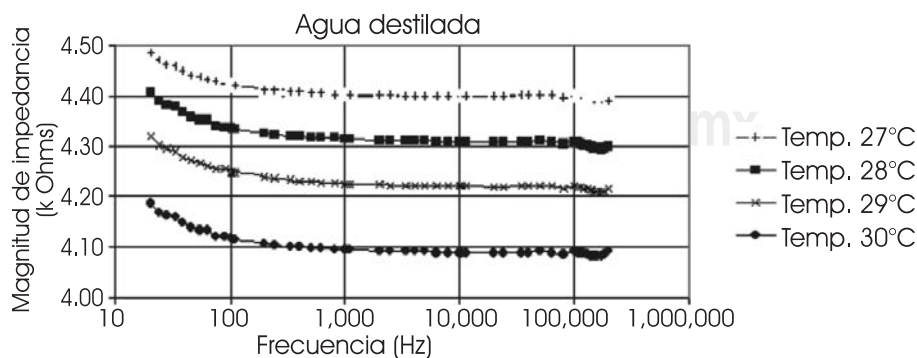


Figura 4. Espectro de magnitud de impedancia del agua destilada en función de la temperatura.

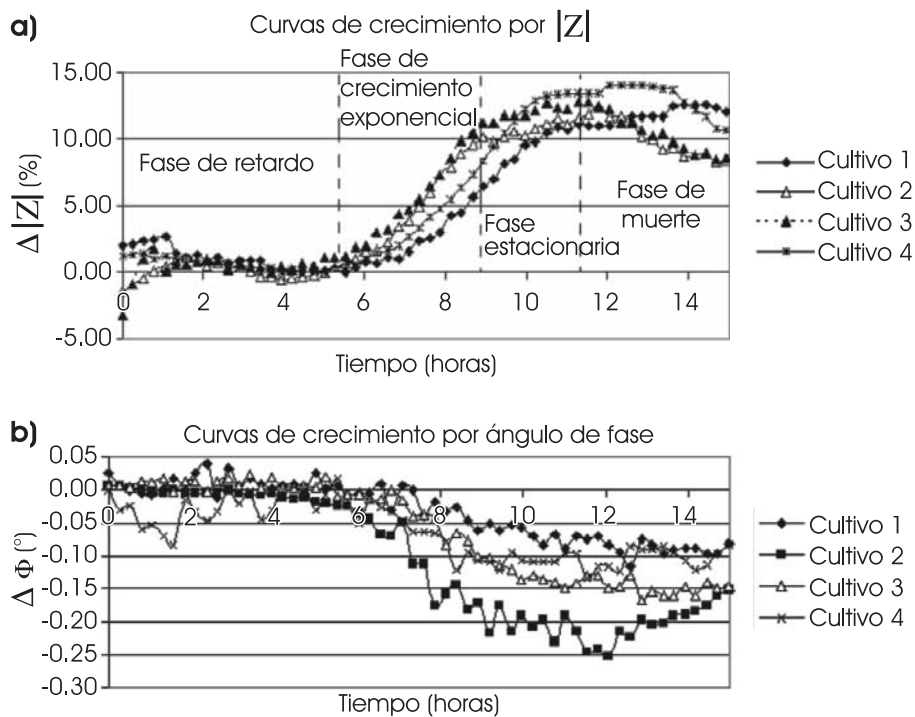


Figura 5. Evolución temporal de $|Z|$ y Φ para los cuatro experimentos a 200 kHz.

valor de $|Z|$ de $60 \pm 21 \Omega$ por incremento de 1°C , constante en todo el espectro de frecuencias. El ángulo de fase no presenta cambios respecto a la temperatura, es decir, se mantiene constante en todo el espectro.

3.2 Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*

Las curvas trazadas en la Figura 5, representan el crecimiento de microorganismos de cuatro cultivos analizados mediante la medición de EIS. Estas gráficas de crecimiento son valores medidos de magnitud de impedancia ($|Z|$) (Figura 5a) y ángulo de fase (Φ) (Fig. 5b) para una frecuencia de análisis de 200 kHz respecto al tiempo de crecimiento de los experimentos. El trazo de curvas de crecimiento se analizó a 200 kHz debido a que los incrementos de $|Z|$ y Φ son máximos respecto al tiempo que otras frecuencias inferiores.

En la Figura 5, se presenta el incremento porcentual de $|Z|$ y ángulo de fase, el tiempo de análisis es menor que al que fue sometido el sistema de medición y es de 15 horas. En esta figura, se delimitan las cuatro etapas de crecimiento de microorganismos, de acuerdo a la Figura 1, con base al promedio de los tiempos

de las curvas de $|Z|$ de los diferentes cultivos. Por lo que el tiempo de la fase de retardo es de 0 a 5.5 h; la fase de crecimiento exponencial de las 5.5 a 9 h; la fase estacionaria de las 9 a 11.6 h y la fase de muerte de 11.6 a 15 h. El $\Delta|Z|$ máximo obtenido es del $12 \pm 1\%$ durante la fase estacionaria.

En la Figura 6, se trazan las curvas de crecimiento de microorganismos de los cuatro cultivos, por medio del método de conteo de cámara de Neubauer. En estas curvas se puede observar que las tendencias de crecimiento son similares a las que presenta el incremento de $|Z|$, y la forma opuesta del Φ (Figura 5).

Para el análisis por el método de EIS fue necesario delimitar cada una de las etapas de crecimiento, según la Figura 1, de cada una de las curvas de los cultivos analizados. Esto permite visualizar el comportamiento de los espectros de frecuencia al cambio de $|Z|$ y el ángulo de fase (Φ).

En las Figuras 7, 8, 9 y 10, se muestran las gráficas de los espectros de frecuencia de $|Z|$ y Φ de cada una de las fases de crecimiento, teniendo como frecuencias de análisis de 10 kHz a 200 kHz únicamente.

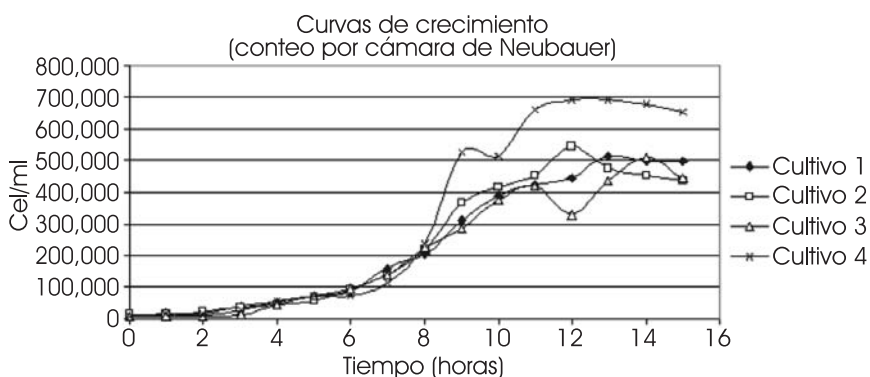


Figura 6. Curvas de crecimiento de microorganismos por método de conteo por cámara de Neubauer.

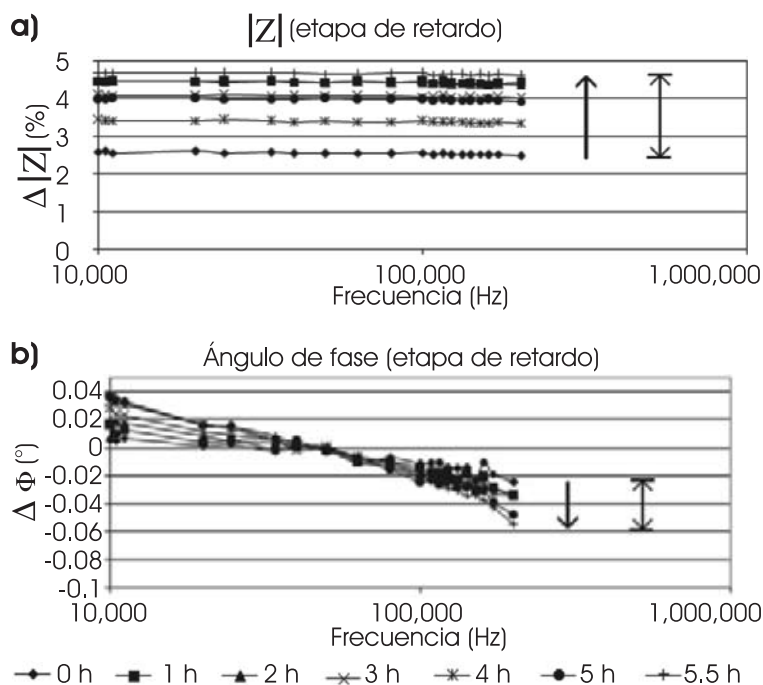


Figura 7. Espectros de $|Z|$ y ángulo de fase de la fase de retardo.

Fase de retardo

En la Figura 7a se muestra el comportamiento de la $|Z|$. En ella se observa que los espectros de $|Z|$ tienen una tendencia de decremento en el porcentaje, esto se debe a que los microorganismos se adaptan a las características físicas y químicas del medio de crecimiento (acidez, temperatura, agitación, etc.). Cada espectro mostrado en la gráfica representa cada hora de análisis y tienen un rango de cambio en porcentaje del 2.06% para un tiempo de análisis de 5.5 horas aproximadamente. En la Figura 7b, se muestra el ángulo de fase para la etapa de retardo. Por debajo de 20 kHz el espectro

de frecuencia tiene comportamientos inductivos y el análisis del ángulo de fase se efectúa en frecuencias mayores a 20 kHz (hasta 200 kHz). Se puede observar que existe un decremento en el ángulo, lo que indica un incremento en la reactancia capacitiva (comportamiento tipo capacitivo); con un cambio de -0.05° a 200 kHz.

Fase de crecimiento (crecimiento exponencial)

En la Figura 8a, se muestran los espectros que corresponden a la fase de crecimiento. En la gráfica que muestra el incremento en $|Z|$, y presenta un cambio, en porcentaje, del 9.6% pasada la etapa

de retardo. Cada uno de los espectros presenta en cambio por cada hora de análisis hasta el límite de inicio de la fase estacionaria o de estabilidad.

En el ángulo de fase (Φ) (Figura 8b), se puede observar que el espectro después de la frecuencia de 20 kHz tiene una tendencia de incremento ne-

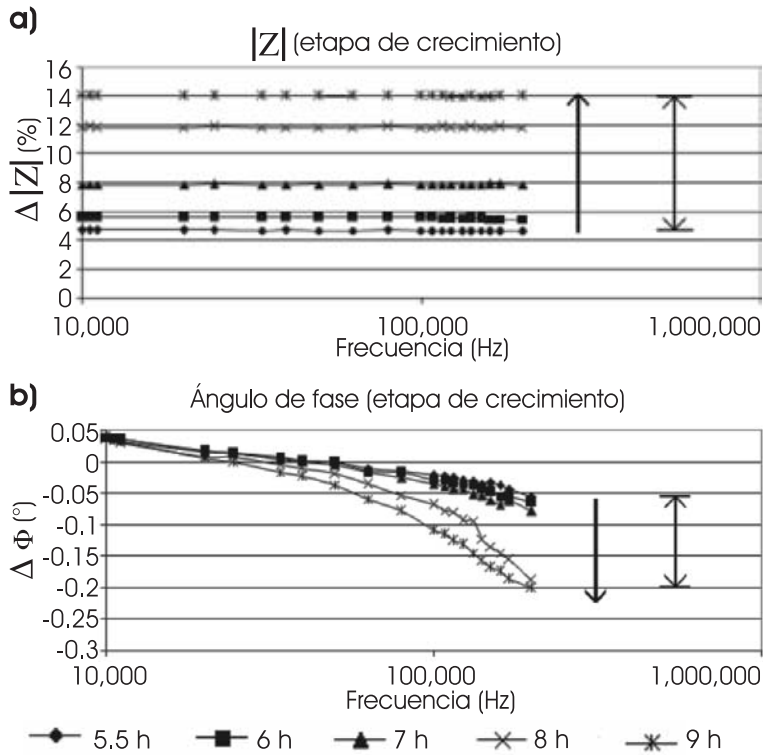


Figura 8. Espectros de $|Z|$ y ángulo de fase de la fase de crecimiento.

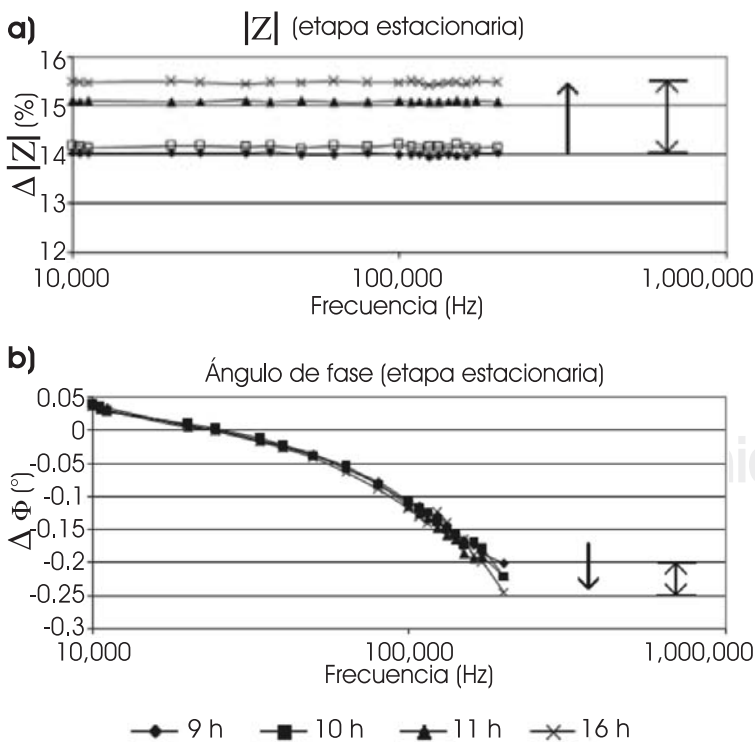


Figura 9. Espectros de $|Z|$ y ángulo de fase de la fase estacionaria.

gativa, por cada hora transcurrida el espectro presenta una mayor pendiente, con un incremento - 0.15° a 200 kHz, para un tiempo de análisis de 3.4 horas.

Fase estacionaria

Esta etapa nos indica que la fase de crecimiento exponencial termina reflejada en el incremento de porcentaje de $|Z|$ (Figura 9a), con un cambio de 1.3%, para un tiempo de análisis de 2.6 horas. En esta etapa la $|Z|$ tiene una tendencia de incremento mínima.

En ángulo de fase (Figura 9b), al igual que la $|Z|$, tiene una tendencia de incremento negativa en un valor de -0.044° después del valor final de la fase de crecimiento a 200 kHz.

Fase de muerte

En esta etapa el cambio de $|Z|$ se vuelve negativo. Los espectros que presenta la Figura 10a muestra un decremento porcentual de -3.35% (después de la fase estacionaria), para un tiempo de análisis de 3.5 horas.

El ángulo de fase mostrado en los espectros de la Figura 10b, tiene una tendencia positiva, lo que indica una disminución en el valor de la reactancia capacitiva debido al decremento de mi-

croorganismos viables en el medio de cultivo. Este decremento es de 0.1° después de la etapa de estabilidad.

En la Figura 11 se muestra el valor promedio de $|Z|$ de los cuatro cultivos (rombos negros) y el valor promedio del conteo celular (círculos blancos).

IV. DISCUSIÓN

La monitorización en línea de los parámetros de impedancia, a una frecuencia de 200 kHz, permite tener un seguimiento del crecimiento de microorganismos en el cual se identifican cada una de las etapas del proceso correlacionado con las técnicas de conteo celular.

La medición de la impedancia eléctrica del agua destilada permite identificar los efectos que tiene la temperatura en $|Z|$, por lo que es necesario implementar un control de temperatura para que las variaciones en impedancia sean originadas únicamente por el crecimiento de microorganismos y no por cambios en la temperatura.

El tiempo de crecimiento que se presenta en la Figura 5a, para $|Z|$, depende de la concentración inicial de microorganismos, ya que no se consideró este parámetro inicial para los cuatro experimentos y las curvas presentan un desplazamiento en el tiempo con un rango en promedio de 1 hora. El ángulo de fase de la Figura 5b, de los cuatro ex-

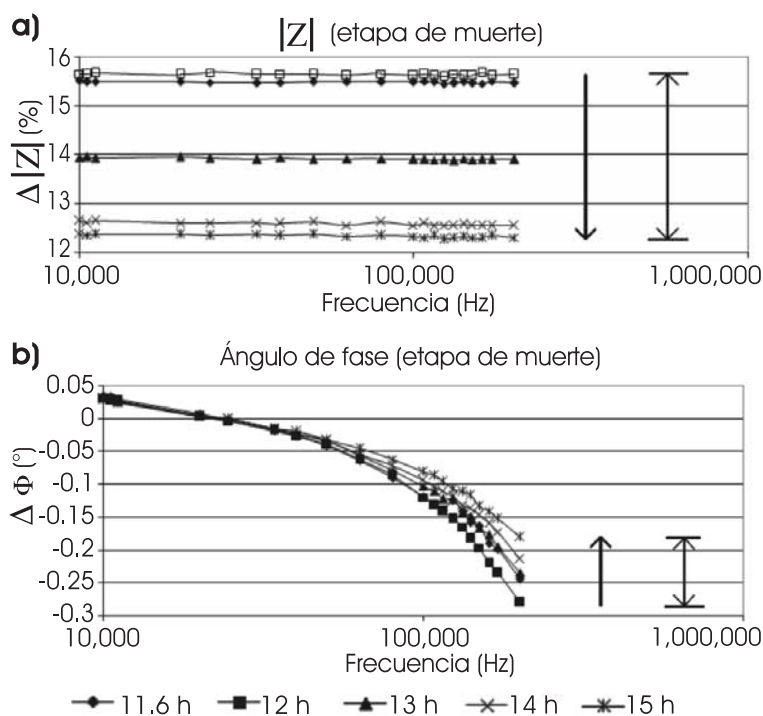


Figura 10. Espectros de $|Z|$ y ángulo de fase de la fase de muerte.

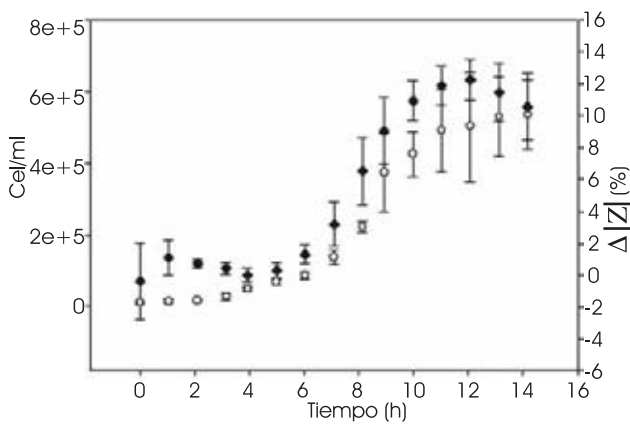


Figura 11. Evolución temporal de $|Z|$ y concentración de células por ml. $\Delta|Z|$ (rombos negros), conteo celular (círculos blancos).

perimentos no muestra desplazamiento en el tiempo, pero éste depende de la cantidad de microorganismos existentes en el medio de cultivo en el tiempo de inicio.

De acuerdo al comportamiento eléctrico de la capacitancia eléctrica que presenta la membrana celular y relación con los resultados que muestran en las Figuras 7b, 8b, 9b y 10b el ángulo de fase presenta este comportamiento debido a la existencia de una cantidad mayor de microorganismos viables, tal como lo muestran los resultados obtenidos por Bragós et al 2001, y esto se observa claramente en la Figura 9b, donde el cambio de Φ disminuye notablemente en comparación a la fase de crecimiento de la Figura 8b, indicando la disminución de sustrato (alimento) en el medio de cultivo. Este comportamiento se puede observar a alta frecuencias (0.01 a 10 MHz) como se cita en trabajos preliminares de otros grupos de investigación, sin embargo, a 200 kHz resulta viable para un seguimiento del crecimiento. Tal y como lo demuestra el índice de correlación de 0.95 tanto para la $\Delta|Z|$ como el $\Delta\Phi$ en relación al conteo celular realizado por el método de la cámara de Neubauer.

V. CONCLUSIÓN

El sistema de EIS implementado, aunado a variables controladas como agitación y temperatura, además del sistema de adquisición de datos, permiten tener la monitorización de un proceso continuo ininterrumpido. Lo que permite emplearlo de manera autónoma en procesos de monitoreo de larga duración.

El máximo crecimiento de las levaduras analizadas (*Saccharomyces cerevisiae*) en un sis-

tema cerrado equivale en promedio a un $\Delta|Z|$ del 12%.

Los parámetros de $\Delta|Z|$ y $\Delta\Phi$ a 200 kHz permiten la monitorización en línea de las diferentes etapas de crecimiento del cultivo de microorganismos respecto al tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bragós R, Sarro E, Fontova A, Soley A, Cairó J, Bayés-Genis A, Rosell J. Four versus two-electrode measurement strategies for cell growing and differentiation monitoring using electrical impedance spectroscopy. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2006; 1: 2106-9.
2. Rodríguez AAC, Cabrera LAI, Valencia Flores. Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica 2003; XXIV(1): 55-70.
3. Meneses MA, Rojas RL, Sifontes RS, López BY, Sariego RI. Aplicación de un método alternativo al conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de *Trichomonas vaginalis*. Revista Cubana Medicina Trop 2001; 53(3): 180-188.
4. Gemini V, Correa E, Gallegos A, Korol S. Degradación microbiana de 2,4-dinitrofenol en efluentes líquidos: efecto de factores bióticos y abióticos. Higiene y Sanidad Ambiental 2008; 8: 320-324.
5. Monge-Amaya O, Valenzuela-García JL, Acedo-Félix E, Certucha-Barragán MT, Almendáriz-Tapia FJ. Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). Revista Internacional de Contaminación Ambiental 2008; 24(3): 107-115.
6. Ferrer JR, Davalillo Y, Chandler C, Páez G, Mármod Z, Ramones E. Producción de proteína microbiana a partir de los desechos del procesamiento de la caña de azúcar (bagacillo). Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 2004; 12(2): 59-65.
7. Ivora A. Bioimpedance monitoring for physicians: an overview. Centre Nacional de Microelectrónica, Biomedical Applications Group. 2002.
8. Felice CJ, Clavin OE, Gallo B del V, Armayor MR, Spinelli JC, Valentinuzzi ME. Impedancimetric bacterial detection: theoretical and experimental aspects. Medical Progress Through Technology 1988; 14: 25-33.
9. Aberg P, Nicander I, Hansson J, Geladi P, Holmgren U, Ollmar S. 2004. Skin cancer identification using multifrequency electrical impedance-a potential screening tool. Dept. of Dermatology, Karolinska Univ. Hosp., Huddinge, Sweden.
10. Valenzuela R. Caracterización de materiales por espectroscopia de impedancias. Revista Cubana de Física 2002; 19(2): 81-84.
11. Bragós R, Eleviar J, Bujan J, Urpi P, Riu PJ, Rosell J. Distributed biomass density measurement system for a yeast production factory. Procc. ICEBI 2004 - XII international conference on electrical bioimpedance & v electrical impedance tomography. IEEE 2004: 49-52.
12. Schwan HP. Electrical properties of tissue and cell suspensions. In: Lawrence JH, Tobias CA. (eds) Advances in biological and medical Physics New York: Academic Press. 1957.

13. López G, Madrid y Carmelo JREF. Medidor de biomasa por espectroscopia dieléctrica. Dpto. de Bioingeniería – INSIBIO, CONICET – FACET, UNT - CC 327 (4000) Tucumán, Argentina.
14. Harris CM, Todd RW, Bungard SJ, Lovitt RW, Moris G, Kell DB. Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimation of microbial biomass. *Enzyme Microb Tech* 1987; 9: 181-186.
15. Elvira J, Bujan J, Urpi P, Bragós R. Medida en línea de biomasa viable mediante el uso de Espectroscopia de Impedancia Eléctrica» XII ICEBI Conference. Viena, 2004.
16. Hashimoto H, Miike H, Ebina Y, Miyaji T. A method detecting bacteria in culture medium by simultaneous measurement of electrical impedance and turbidity. *Technology Reports of the Yamaguchi University* 1979; 2(3): 291-299.
17. Mar-Luna Felix, Gamero-Inda Eduardo. 2008. Sensor por Software para la estimación del crecimiento de biomasa en bioprocesos. Congreso Internacional de Electrónica y Electrónica, Chihuahua, Chihuahua.
18. Soley A, Lecina M, Gmeza X, Cairó JJ, Riu P, Rosell X, Bragós R, Gòdia F. On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy. *Journal of Biotechnology* 2005; 118(4): 398-405.