

DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN POR FERMENTACIÓN DE BIOMASA DE *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Andrés Díaz¹, Johan Sáenz¹ y Alba Marina Cotes¹

¹Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica
adiaz@corpoica.org.co

Introducción

El diseño de un bioproceso para la producción a escala laboratorio de biomasa de cualquier microorganismo implica el conocimiento previo del proceso en sí (condiciones típicas de fermentación tales como temperatura, pH, agitación, aireación y condiciones nutricionales tales como concentraciones de fuentes de carbono, nitrógeno, sales, inductores de crecimiento, etc.) y de la experticia y la experiencia del personal involucrado en este tipo de desarrollos. A medida que se cuenta con mayor información de calidad se minimiza el tiempo y el esfuerzo (logístico, de personal y de tiempo) requerido para alcanzar el objetivo de producción. Este último está relacionado directamente con los requerimientos o condiciones de las operaciones unitarias “aguas abajo” del proceso de fermentación, que incluyen procesos de separación, concentración, purificación y formulación de la biomasa.

En el presente proyecto se llevó a cabo el diseño, estandarización y validación del proceso de producción masiva de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 que demostró en ensayos previos un elevado potencial para el control del agente causal de la raya necrótica del fique e inductor de crecimiento vegetal. En función de los lineamientos mencionados anteriormente, se planteó una estrategia secuencial de diseño de experimentos clásico para la determinación de las condiciones nutricionales y fisicoquímicas adecuadas para la producción de biomasa de este

microorganismo. Esto implicó el montaje secuencial de experimentos a nivel de laboratorio y su respectivo análisis estadístico con fundamentos biológicos para dilucidar la dirección correcta.

Selección de la estrategia experimental

Para llevar a cabo el diseño de un medio de cultivo para el crecimiento de un microorganismo específico existen varias estrategias que han sido ampliamente usadas:

1. Intercambio de componentes: en la que se evalúan diferentes componentes del medio (fuentes de carbono, nitrógeno, sales, etc.), una a la vez. Es una técnica sencilla pero poco eficiente que implica un número muy grande de experimentos y consume mucho tiempo y mano de obra; además, no permite dilucidar las interacciones entre los diferentes componentes.

2. Un factor a la vez: es similar a la técnica anterior pero en este caso se evalúan diferentes niveles o concentraciones de cada componente del medio; esto implica un conocimiento previo del proceso, para llegar a determinar un número reducido de componentes a evaluar. Presenta los mismos problemas asociados con la estrategia de intercambio de componentes, pero aún sigue siendo aplicada en algunos casos.

3. Búsqueda en la literatura: en la que se hace una búsqueda retrospectiva acerca de bioprocesos similares y se "toma prestado" un medio de cultivo base que ya ha demostrado altos rendimientos o productividades del microorganismo en cuestión. Es una de las estrategias más usadas debido a su facilidad, pero no siempre se alcanza reproducibilidad de condiciones experimentales o resultados experimentales.

4. Mimetismo biológico: en esta se calculan o cuantifican las necesidades nutricionales del microorganismo, haciendo uso de la composición elemental de la biomasa y de los diferentes componentes del medio de cultivo. Aunque es una estrategia rigurosa, depende de la disponibilidad de información confiable acerca de la composición del microorganismo y las materias primas, que no es lo usual; adicionalmente, el hecho de realizar el balance por componentes no asegura que se obtenga el resultado deseado o predicho.

5. Diseño de experimentos: se define como el proceso de planear todos los pasos que deben darse y el orden que debe seguirse en la recolección y posterior análisis de la información requerida para estudiar un problema de investigación. Esta, más que una estrategia, es una herramienta que se puede implementar en combinación con cualquiera de las estrategias mencionadas anteriormente. Permite lograr la mayor cantidad de información de alta calidad

de manera muy eficiente y con economía de tiempo, dinero, mano de obra e infraestructura.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y en función de la experiencia previa y la experticia del personal de investigación del área de Fermentaciones del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB, de Corpoica, se tomó la decisión de aplicar la estrategia del mimetismo biológico en combinación con las herramientas del diseño de experimentos y el uso de un componente del medio de cultivo base tomado de la literatura para diseñar un medio de cultivo para la cepa evaluada (Tabla 1).

La composición de la biomasa usada fue $CH_{1.79}O_{0.52}N_{0.22}$ (Durner *et al.*, 2000).

Se evaluó una fuente de carbono que ha sido ampliamente reportada para la producción de biomasa de rizobacterias y que no presenta interferencias en las operaciones unitarias “aguas abajo” o posteriores al proceso de fermentación.

También se evaluó una fuente de nitrógeno orgánico y una fuente de nitrógeno inorgánico, dado que se ha demostrado que el género *Pseudomonas* sp. requiere de estas dos fuentes de nitrógeno para activar sus procesos metabólicos orientados hacia la producción de biomasa (Durner *et al.*, 2000).

Tabla 1. Estrategia global aplicada para el diseño del proceso de producción de biomasa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Etapa	Objetivo	Descripción	Escala de aplicación	Diseño experimental aplicado
Exploratoria (screening)	Identificar los factores nutricionales importantes	Muchos factores Zona experimental desconocida	Microplaca de 96 pozos de 400 µL	Factorial completo
Estandarización y optimización	Construir un modelo predictivo	Pocos factores Zona experimental rodeando el óptimo	Erlenmeyer de 125 mL	Factorial completo
Validación a pequeña escala	Confirmar los resultados de las condiciones nutricionales	Solo factores clave Región óptima	Erlenmeyer de 500 mL	No aplica*
Validación a escala de biorreactor	Confirmar los resultados evaluando condiciones fisicoquímicas estándar	Solo factores clave Punto óptimo	Biorreactor Airlift de 20 L	No aplica*

* En estas etapas se evalúa la reproducibilidad de los valores obtenidos con los mejores tratamientos de las etapas previas.

Etapa 1: Ensayo exploratorio en microplaca de 400 µL

Para el diseño experimental se seleccionó un diseño factorial completo con tres niveles y un punto central más un control sin adición de sales (Tabla 2). La

experimentación se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos con un volumen nominal de 400 µL y un volumen de trabajo de 250 µL.

Utilizando la fórmula elemental de *Pseudomonas* sp. ($C_1H_{1,793}O_{0,522}N_{0,227}$), se calculó la cantidad necesaria de carbono y nitrógeno para producir 2 g/L de biomasa, lo que se consideró como el nivel cero para el diseño experimental y a partir del cual se determinaron los niveles superior (+50%) e inferior (-50%). La composición de la solución Stock de sales se tomó de Aboseaud y colaboradores (2006), ya que este autor la utilizó para optimizar la composición de un medio de cultivo para la producción de *Pseudomonas fluorescens*.

Tabla 2. Matriz de niveles usada en la evaluación del crecimiento del aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación

Nivel	Carbono (g/L)	Nitrógeno orgánico (g/L)	Nitrógeno inorgánico (g/L)	Stock de sales
-1	1,72	0,85	0,90	1X
0	3,44	1,69	1,80	
1	5,16	2,54	2,7	

Se prepararon 20 mL de una solución 10X de cada una de las concentraciones de la fuente de carbono, nitrógeno y sales listadas previamente con agua destilada; las soluciones fueron esterilizadas bajo condiciones estándar. Simultáneamente se preparó un inóculo del aislamiento de *P. fluorescens* Ps006 a una concentración de 1×10^7 UFC/mL, en solución salina al 0,85%.

El montaje de la microplaca se realizó en una cabina de flujo laminar, mezclando cada uno de los componentes en las diferentes concentraciones establecidas como niveles, para así obtener 10 tratamientos (Tabla 3). Para esto se mezclaron 25 µL de cada una de las soluciones de nutrientes preparadas (carbono, nitrógeno y sales) con 100 µL de agua destilada estéril. Finalmente se inocularon los pozos con 50 µL de la suspensión de la bacteria.

Adicionalmente a los 10 tratamientos mostrados en la Tabla 3, se ubicaron dos controles en la microplaca, uno que correspondía al tratamiento nueve sin inocular (por lo que se completó con 50 µL más de agua) y otro únicamente con agua destilada estéril. Se ubicó el tratamiento 10 en la placa con la finalidad de observar el efecto que tenía la ausencia de la solución de sales en la microfermentación. La placa se llevó a una agitación a 150 rpm durante 15 min y se tomó el tiempo cero expresado como absorbancia en un lector Asys Hitech Expert 93 a 405 nm y a 620 nm. Finalmente, la placa fue incubada a 30°C x 150 rpm y se realizó el monitoreo de la absorbancia cada 12 horas. Los tratamientos se ubicaron en bloques aleatorios sin usar los pozos del borde de la placa.

Tabla 3. Tratamientos evaluados para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación

Tratamiento	Carbono	Nitrógeno orgánico	Nitrógeno inorgánico
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	SSS*	SSS	SSS

*Nivel cero sin la solución stock de sales.

Se seleccionó una longitud de onda de 620 nm para la lectura de absorbancia, ya que permitió una lectura con más resolución (valores inferiores a 1,0) a través de todo el proceso de fermentación, durante las 48 horas evaluadas. Adicionalmente, se usaron los resultados experimentales de la hora 36, ya que presentaron el máximo para todos los tratamientos con los coeficientes de variación más bajos (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de absorbancia a 620 nm para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 evaluado en microfermentación

Ps006 (36 h)				Ps006 (36 h)			
Tratamiento	Absorbancia promedio	S	%CV	Tratamiento	Absorbancia promedio	S	%CV
1	0,754	0,019	2,519	8	1,337	0,039	2,898
2	0,765	0,044	5,745	9	1,117	0,029	2,599
3	1,267	0,021	1,679	10	0,972	0,110	11,361
4	1,247	0,015	1,192	11	0,064	0,006	9,785
5	0,887	0,044	4,947	12	0,043	0,007	17,237
6	0,720	0,071	9,832	13	0,040	0,001	2,532
7	1,356	0,031	2,255	--	--	--	--

El crecimiento del aislamiento Ps006 fue rápido, porque después de 16 horas, en algunos de los tratamientos, la lectura de la absorbancia (A_{620nm}) fue mayor a uno. Los tratamientos que incluían el nivel alto del extracto de levadura fueron los que presentaron una absorbancia más alta desde el inicio de la microfermentación.

El análisis de varianza indicó que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno orgánica fueron los factores estadísticamente significativos, de lo que se puede deducir que tienen el mayor efecto sobre la variable de respuesta absorbancia. La relación nitrógeno orgánico – inorgánico no presentó influencia significativa.

En el diagrama de Pareto (Figura 1) se observó más claramente cuáles fueron los factores que tuvieron incidencia sobre la variable respuesta. La fuente de nitrógeno orgánica (Factor B) fue el componente que más incidencia tuvo sobre la absorbancia, seguido, en menor proporción, por la fuente de carbono (Factor A). Los demás factores y sus correspondientes interacciones (combinaciones) no presentaron un efecto significativo sobre la variable respuesta para este aislamiento.

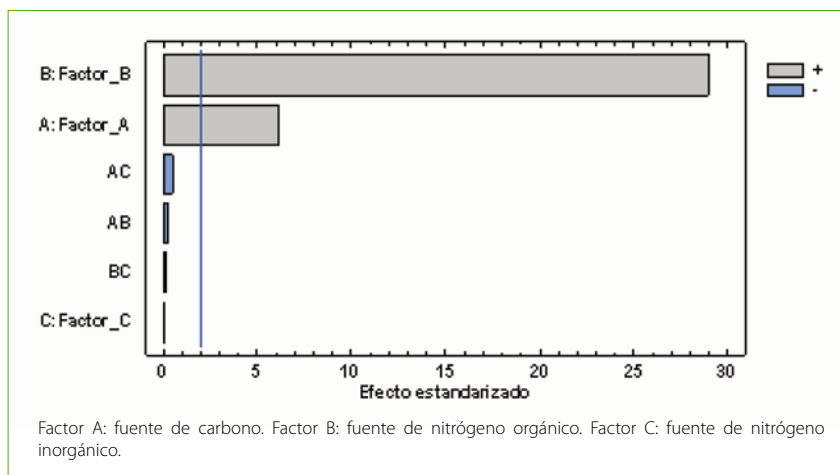


Figura 1. Diagrama de Pareto para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación.

Como se observa en la gráfica de cubo (Figura 2) la mayor respuesta de absorbancia se encuentra en el extremo inferior derecho ($A_{620nm} = 1.23314$) de la figura equivalente a la combinación de fuente de carbono alta, fuente de nitrógeno orgánico alta y fuente de nitrógeno inorgánico baja, por tanto, ya se tiene la evidencia experimental acerca de los niveles de nutrientes a utilizar en la etapa de estandarización en Erlenmeyer.

Dado que se aplicó un diseño experimental robusto de resolución IV, se logró la obtención de un modelo lineal con interacciones (Ecuación 1).

$$Absorbancia = 0,9459 + 0,0493A + 0,2340B - 0,0005C - 0,0021AB - 0,0041AC - 0,0015BC \quad (1)$$

$$R^2 = 97,12\%$$

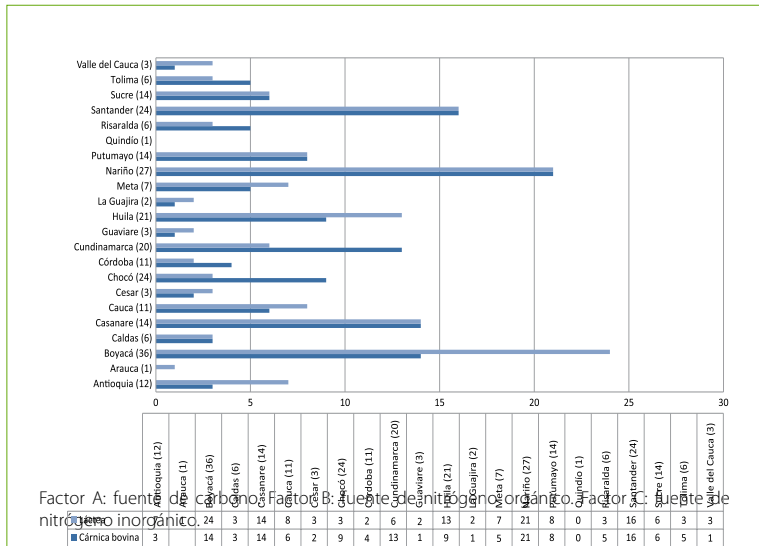


Figura 2. Gráfica de cubo para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación.

El grado de ajuste del modelo teórico generado fue bueno, ya que explicó el 97,12% de la variabilidad presentada en el experimento.

En conclusión, se determinó que la fuente de nitrógeno orgánico presentó el mayor efecto positivo sobre el crecimiento de *P. fluorescens* Ps006 en microplaca (expresado como absorbancia) y, por tanto, se evaluarán concentraciones más altas a nivel de Erlenmeyer de 125 mL. De forma similar, aunque el efecto no fue tan grande en magnitud, se evaluarán concentraciones más altas de la fuente de carbono a nivel de Erlenmeyer de 125 mL. La fuente de nitrógeno inorgánico se utilizará en adelante como parámetro en su concentración más baja, manteniendo constante su relación con la fuente de nitrógeno orgánico. El stock de sales también se usará como parámetro a partir de la experimentación en Erlenmeyer de 125 mL.

Con la información obtenida en el montaje anterior se propuso un nuevo diseño experimental en Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL.

Etapa 2: Ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL

Con la información obtenida en el montaje en microplaca se aplicó un nuevo diseño experimental factorial completo con dos factores y dos niveles con punto central, en Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL (Tabla 5), con el fin de tener una primera aproximación acerca del rango de trabajo ideal para los componentes nutricionales críticos, en este caso la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno orgánico.

Tabla 5. Matriz de niveles usada para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en Erlenmeyer de 125 mL

Nivel	Factor A (FC) (g/L)	Factor B	
		(FNO) (g/L)	(FNI)(g/L)
-1	5,16	2,54	0,9
0	10,32	5,08	1,8
1	15,48	7,62	2,7

Se prepararon 20 mL de una solución 10X de cada una de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno orgánico e inorgánico listadas en la Tabla 1 con agua destilada, adicionalmente se preparó una solución de diferentes sales y las soluciones fueron esterilizadas bajo condiciones estándar. Igualmente se realizó un inóculo de 1×10^7 UFC/mL en Tween al 0,5%, a partir de una caja crecida durante 48 h.

Cada Erlenmeyer contenía 25 mL como resultado de la adición de 2,5 mL de fuente de carbono, 2,5 mL de fuente de nitrógeno orgánico, 2,5 mL de fuente de nitrógeno inorgánico, 2,5 mL de solución de sales, 12,5 mL de agua destilada y 2,5 mL de inóculo. Las diferentes combinaciones de los niveles dieron como resultado cinco tratamientos, los cuales se montaron por triplicado (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos evaluados para el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Factor A	Factor B
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0

Los Erlenmeyer se dejaron en agitación a 170 rpm y 30°C durante 48 h. Al cabo de este tiempo se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} en Tween 0,5% y se sembraron 10 μ L de las tres últimas diluciones en cajas Petri con agar LB; las cajas fueron incubadas a 30°C, durante 24 h, tiempo en el que se hizo el recuento de las UFC (Tabla 7). El resto del medio de cultivo fue centrifugado en tubos de 30 mL, los cuales habían sido pesados con anterioridad, a 15.000 rpm durante 15 min; estos tubos fueron secados a 28°C, hasta obtener un peso constante (Tabla 7).

Por la Tabla 7 se concluyó que la viabilidad a las 16 horas de fermentación estuvo siempre por encima de 1×10^9 UFC/mL con un máximo de 2×10^{10} UFC/mL para el tratamiento tres. El límite mínimo para que el proceso de fermentación tenga

potencial de ser aplicado para la formulación de un bioproducto está en 1×10^{10} UFC/mL (Figura 5), por lo que se debe orientar la investigación en la cercanías de los niveles del tratamiento tres, que tiene el nivel bajo de la fuente de carbono y el nivel alto de la fuente de nitrógeno orgánico; adicionalmente, la magnitud de la biomasa seca es concordante con reportes de otros autores que son cercanos a 5 g/L (Lang y Wullbrandt, 1999).

Tabla 7. Viabilidad (UFC/mL) y biomasa (g/L) obtenidas para el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Log (UFC/mL)			Biomasa seca (g/L)		
	X	S	%CV	X	S	%CV
T1	9,851	0,073	0,74	1,60	0,080	5,00
T2	9,054	0,022	0,24	0,80	0,000	0,00
T3	10,204	0,046	0,46	4,56	0,260	5,71
T4	9,394	0,012	0,13	2,68	0,174	6,51
T5	9,439	0,185	1,96	2,72	0,220	8,10

X: promedio. S: desviación estándar. %CV: coeficiente de variación en porcentaje.

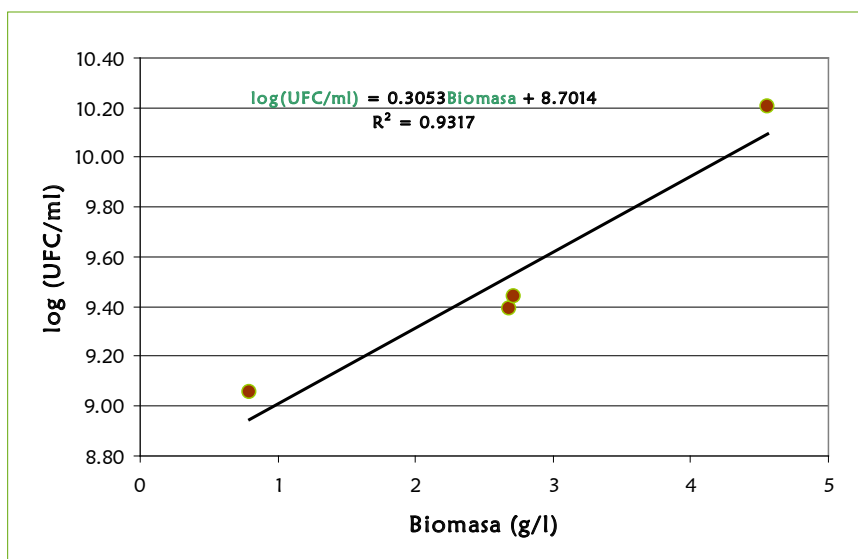


Figura 5. Relación entre viabilidad y biomasa seca para el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

Se observó una buena correlación lineal entre la viabilidad y la biomasa seca obtenida en los diferentes tratamientos, a excepción del tratamiento uno (dato no mostrado), en el que se presentó una desviación clara de la tendencia general, probablemente debida a problemas con la manipulación de la muestra

en la determinación de la biomasa. Este hecho es un indicio de que el medio de cultivo usado no presenta interferencias significativas representadas por sólidos en suspensión o por nutrientes residuales al final de la fermentación.

Tabla 8. Análisis de varianza para la viabilidad en el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Factor_A	1,86126	1	1,86126	97,15	0,0000*
B:Factor_B	0,394581	1	0,394581	20,60	0,0008*
AB	0,000280333	1	0,000280333	0,01	0,9059
Error total	0,210737	11	0,0191579		
Total (corr.)	2,46685	14			

* Indica diferencia significativa.

El análisis de varianza mostró que tanto la fuente de carbono como la fuente de nitrógeno presentaron un efecto significativo sobre la concentración final de *P. fluorescens* Ps006. Sin embargo, la interacción de estos dos factores no tiene un efecto significativo.

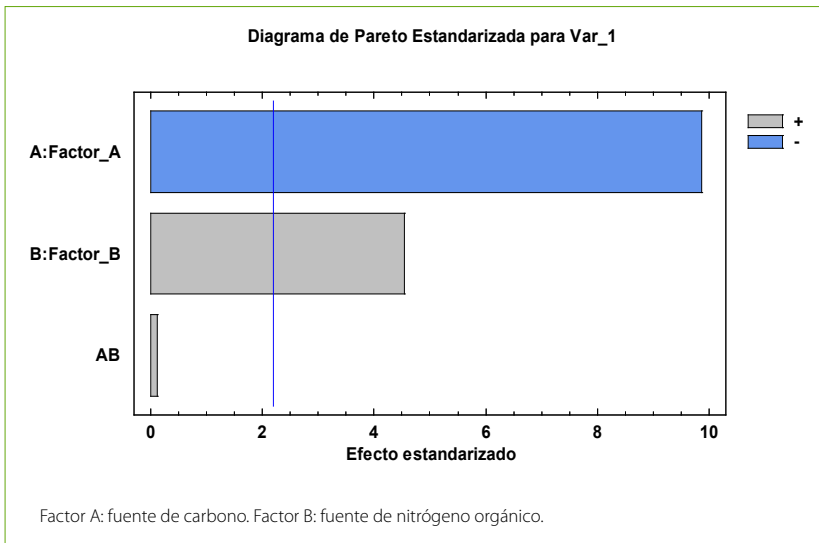


Figura 6. Influencia de factores nutricionales sobre el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 crecida en medio líquido en Erlenmeyer de 125 mL.

El diagrama de Pareto (Figura 6) demostró que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta, que la fuente de carbono tiene un efecto negativo aproximadamente dos veces mayor que el factor B o fuente de nitrógeno que tiene un efecto positivo. Este resultado indica

que la región experimental evaluada es adecuada para encontrar un punto óptimo para la fuente de carbono, pero no así para la fuente de nitrógeno, que aún puede ser aumentada en concentración aunque en una proporción mucho menor a la obtenida en el ensayo previo (efecto estandarizado = 29 en microplaca versus efecto estandarizado = 4,5 en Erlenmeyer de 125 mL). Igualmente se observa que la relación entre los factores A y B no tiene un efecto significativo.

Por otro lado, con el fin de dilucidar el efecto de la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de biomasa de *P. fluorescens* Ps006, se llevó a cabo un análisis de comparación de medias de los tratamientos evaluados en el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL, aplicando la técnica LSD con un nivel de confianza del 95%.

Se concluyó que el tratamiento tres (Figura 7) fue el mejor y presentó diferencias significativas con los demás tratamientos evaluados. Por tanto, la etapa siguiente de optimización debe enfocarse en las cercanías de los niveles usados en este tratamiento.

En la Figura 7 se presenta el análisis gráfico, además se discriminan las magnitudes de la relación Fuente de carbono/Fuente de nitrógeno; acerca de este último aspecto se analizó que la mejor respuesta se obtuvo con la concentración más alta de fuente de nitrógeno (relación C/N = 1/1,51), simultáneamente se determinó que, para iguales relaciones C/N (véanse los tratamientos T1, T4 y T5), el mejor efecto se observó con el tratamiento con la menor concentración de fuente de nitrógeno (T1) que tenía concentraciones de fuente de nitrógeno orgánico/fuente de nitrógeno inorgánico = [2,54g/L]/[0,90g/L].

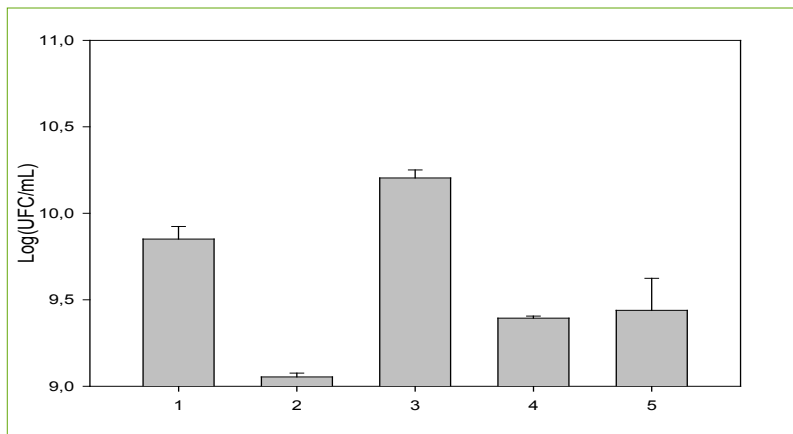


Figura 7. Análisis de comparación de medias de los tratamientos evaluados en el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al aplicar la técnica LSD con $\alpha=0,95$.

Teniendo en cuenta el análisis anterior, es claro que en la etapa siguiente de optimización se debe evaluar un rango de concentraciones de fuente de carbono intermedio dentro del espacio experimental que ya se evaluó en las dos etapas en combinación de concentraciones un poco más altas de la fuente de nitrógeno, dado que se mantiene la tendencia directamente proporcional con la respuesta.

A continuación se presenta la ecuación del modelo matemático, la cual está codificada por factores y niveles:

$$\begin{aligned} \text{Log (UFC/mL)} = & 9,58827 - 0,393833A \\ & + 0,181333B + 0,00483333AB \end{aligned} \quad (2)$$

R-cuadrada = 91,4573%

El grado de ajuste del modelo matemático generado (Ec. 1) es bueno, ya que para procesos biológicos un 90% de ajuste se considera aceptable; en este caso, el modelo explica el 91,4% de la variabilidad presentada en el experimento.

En la Tabla 9 se muestran los niveles que permitirían teóricamente optimizar la variable respuesta, si se aplicara el modelo matemático obtenido arriba, dentro del espacio experimental enmarcado por los niveles de los factores.

Tabla 9. Optimización de la concentración con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en Erlenmeyer de 125 mL

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Factor A	-1,0	1,0	-1,0
Factor B	-1,0	1,0	1,0

Meta: maximizar: Log (UFC/mL)

Valor óptimo = 10,1586

Del modelo se concluyó que la respuesta óptima se encuentra hacia el nivel bajo (-1) de la fuente de carbono y el nivel alto (+1) de la fuente de nitrógeno; esto es coherente con los análisis realizados previamente en esta etapa exploratoria en Erlenmeyer de 125 mL.

En conclusión, se determinó que la fuente de nitrógeno orgánica continuó presentando un efecto positivo sobre el crecimiento de *P. fluorescens* Ps006 en Erlenmeyer de 125 mL y, por tanto, se evaluarán concentraciones más altas para la optimización a nivel de Erlenmeyer de 125 mL. Para la fuente de carbono se obtuvo un efecto negativo que indica que el valor óptimo se sobrepasó y se debe encontrar con concentraciones más bajas a las evaluadas. La relación fuente de

nitrógeno orgánico/fuente de nitrógeno inorgánico se sigue utilizando como parámetro en un valor de 2,8/1. El stock de sales también se sigue usando como parámetro en el valor definido en el ensayo de microplaca.

Etapa 3: Ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL

Con la información obtenida en el montaje anterior, se aplicó un nuevo diseño experimental factorial completo con tres factores a dos niveles en Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL (Tabla 10).

Tabla 10. Matriz de niveles usada para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL

Nivel	Factor A (FC) (g/L)	Factor B	
		(FNO) (g/L)	(FNI)(g/L)
-1	2,52	3,87	1,35
0	5,04	7,62	2,7
1	7,56	11,43	4,05

Se prepararon 20 mL de una solución 10X de cada una de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno orgánico e inorgánico listadas en la Tabla 10, con agua destilada; adicionalmente se preparó una solución de diferentes sales; las soluciones fueron esterilizadas bajo condiciones estándar. Igualmente se realizó un inóculo de 1×10^7 UFC/mL en Tween al 0,5%, a partir de una caja crecida durante 48 h.

Cada Erlenmeyer contenía 25 mL como resultado de la mezcla de los siguientes componentes: 2,5 mL de fuente de carbono, 2,5 mL de fuente de nitrógeno orgánico, 2,5 mL de fuente de nitrógeno inorgánico, 2,5 mL de solución de sales, 12,5 mL de agua destilada y 2,5 mL de inóculo. Las diferentes combinaciones de los niveles dieron como resultado nueve tratamientos, los cuales se montaron por triplicado (Tabla 11).

Tabla 11. Tratamientos evaluados para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL

Tratamiento	Factor A	Factor B
1	1	0
2	-1	-1
3	-1	1
4	0	1
5	0	-1
6	0	0
7	1	-1
8	-1	0
9	1	1

Los Erlenmeyer se ubicaron en un shaker con agitación de 170 rpm y 30°C durante 48 h. Al cabo de este tiempo se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} en Tween 0,5% y se sembraron 10 μ L de las tres últimas diluciones en cajas de agar LB; las cajas fueron incubadas a 30°C, durante 24 h, tiempo en el que se hizo el recuento de las UFC (Tabla 12). El resto del medio de cultivo fue centrifugado en tubos de 30 mL, los cuales habían sido pesados con anterioridad, a 15.000 rpm, durante 15 minutos; estos tubos fueron secados a 28°C, hasta obtener un peso constante para determinar la biomasa seca (Tabla 12).

Tabla 12. Viabilidad y biomasa obtenida para el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Log (UFC/mL)	CV (%)	Biomasa seca (g/L)	CV (%)
1	10,31	0,07	3,52	8,96
2	10,22	0,27	2,00	3,81
3	10,35	0,66	4,16	4,85
4	10,02	0,83	5,20	1,23
5	10,29	0,04	1,84	6,65
6	10,30	0,51	3,48	9,27
7	10,09	0,31	2,08	3,85
8	10,26	0,45	2,24	7,77
9	10,36	0,47	5,16	9,75

%CV: coeficiente de variación en porcentaje.

Se observó que los resultados de viabilidad obtenidos son, por mucho, mejores a los obtenidos en la etapa exploratoria, porque el promedio de todos los tratamientos estuvo por encima de 1×10^{10} UFC/mL (Tabla 12) y, además, el promedio general de todos los tratamientos fue significativamente superior al obtenido en la etapa dos ($1,7 \times 10^{10}$ UFC/mL vs $3,9 \times 10^9$ UFC/mL). El valor máximo obtenido fue de $2,3 \times 10^{10}$ UFC/mL para el tratamiento nueve; el límite mínimo para que el proceso de fermentación tenga potencial de ser aplicado para la formulación de un bioproducto está en 1×10^{10} UFC/mL, por lo que cualquiera de los tratamientos evaluados en esta etapa cumpliría con los requerimientos para la formulación de este.

Al analizar los resultados de la Tabla 12 se observó que, en promedio, la biomasa seca obtenida es significativamente diferente a la obtenida en la etapa dos (3,30 g/L vs 2,47 g/L). El valor máximo se obtuvo con el tratamiento cuatro con 5,2 g/L de biomasa seca y que correspondió al nivel base de la fuente de carbono y al nivel alto de la fuente de nitrógeno.

Ya que no se observó una relación lineal entre la viabilidad (expresada como Log (UFC/mL)) y la biomasa seca obtenida en los diferentes tratamientos, para los análisis estadísticos posteriores se usó como variable de respuesta la viabilidad, ya que se espera que presente una interferencia mucho menor que la biomasa seca.

Tabla 13. Análisis de varianza para la viabilidad en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Factor_A	0,00288852	1	0,00288852	0,20	0,6613
B: Factor_B	0,00824259	1	0,00824259	0,57	0,4614
AA	0,0241999	1	0,0241999	1,66	0,2132
AB	0,0158318	1	0,0158318	1,09	0,3106
BB	0,0272589	1	0,0272589	1,87	0,1876
Bloques	0,0104885	2	0,00524423	0,36	0,7026
Error total	0,277127	19	0,0145856		
Total (corr.)	0,366037	26			

*Indica diferencia.

El análisis de varianza mostró que ninguno de los dos factores (fuente de carbono y fuente de nitrógeno orgánico) o su interacción presentó un efecto significativo sobre las células viables al final del proceso de fermentación con la cepa de *P. fluorescens* (Tabla 13). Esto es un indicativo de que el espacio experimental explorado está en las cercanías de lo óptimo y que el rango de los factores fue dilucidado con éxito.

En el diagrama de Pareto (Figura 8) se comprobó que ninguno de los factores presentó un efecto significativo, al igual que su interacción. La interacción entre

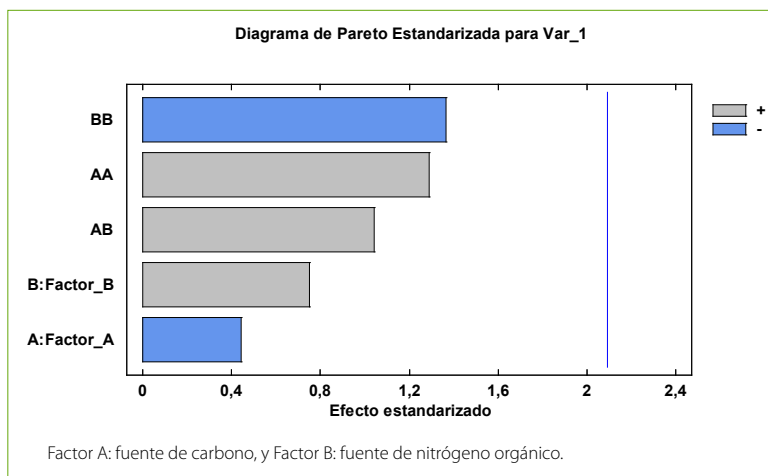


Figura 8. Influencia de factores nutricionales sobre el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 crecida en medio líquido en Erlenmeyer de 125 mL.

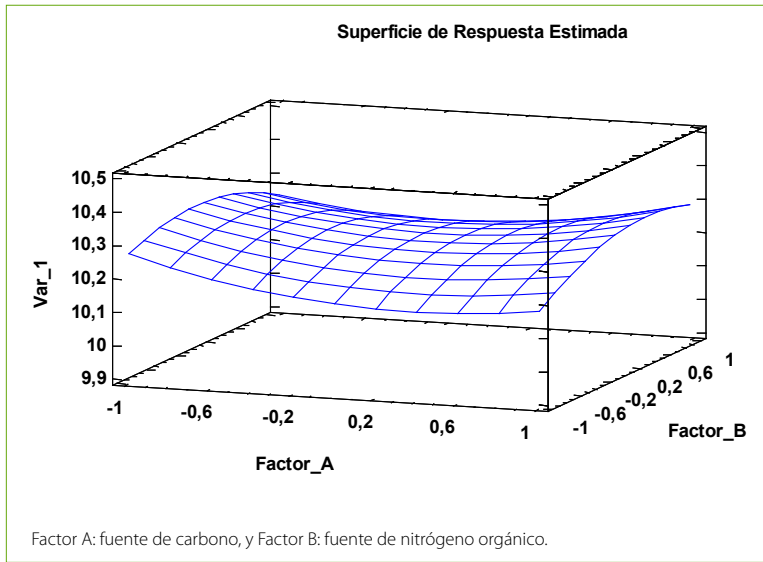


Figura 9. Grafica de superficie de respuesta del efecto de las fuentes nutricionales sobre la viabilidad de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

las fuentes de carbono y nitrógeno presentó la mayor magnitud, mientras que la fuente de nitrógeno mostró un efecto positivo y la fuente de carbono un sentido negativo, pero en magnitud similar.

En la superficie de respuesta (Figura 9) se puede observar el espacio experimental del montaje. La geometría obtenida fue plana, debido a que los tratamientos se comportaron de una manera similar, sin embargo, se observa un máximo para la fuente de nitrógeno, cercano al nivel base (0), para la fuente de carbono se observa un “valle” en el nivel base (0) y valores máximos en los extremos (nivel -1 y 1), por lo que se debe complementar este análisis gráfico con el diagrama de Pareto y el análisis de comparación de medias, para la toma de decisiones.

En la Figura 10 se pueden observar los grupos homogéneos formados a partir del análisis de comparación de medias, aplicando la técnica LSD (mínima diferencia significativa), con un nivel de confianza del 95%. El tratamiento nueve fue el que presentó la mayor respuesta (con $2,3 \times 10^{10}$ UFC/mL), y el tratamiento cuatro, la menor (con $1,9 \times 10^{10}$ UFC/mL); dentro del grupo homogéneo, con la mejor respuesta se ubicaron los tratamientos codificados como T1, T3, T5, T6 y T9, mientras que los tratamientos codificados como T4 y T7 presentaron la peor respuesta y fueron estadísticamente diferentes al resto.

Para la relación carbono/nitrógeno de 8,5 (tratamientos T2, T6 y T9) se presentó una relación directamente proporcional, es decir, a medida que se aumentó la concentración de la fuente de nitrógeno se observó un aumento en la

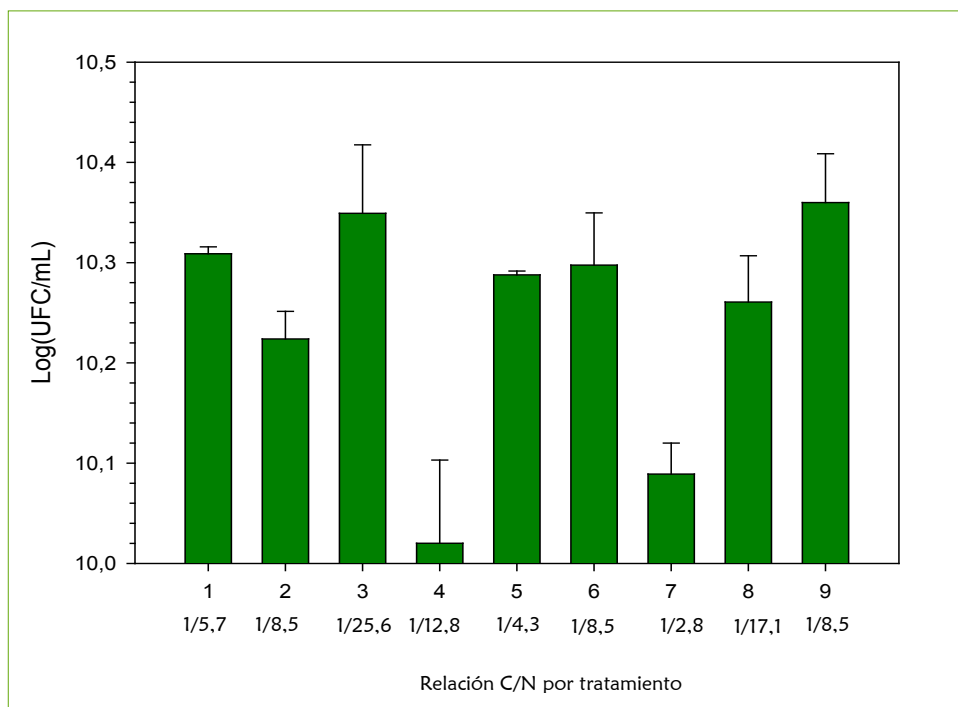


Figura 10. Análisis de comparación de medias de los tratamientos evaluados en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al aplicar la técnica LSD con $\alpha=0,95$.

concentración bacteriana expresada como UFC/mL. Por otro lado, también se observó que las mejores respuestas en viabilidad se obtuvieron con relaciones de C/N bajas o altas, mientras que con relaciones de C/N intermedias se obtuvieron los peores resultados; esto apunta hacia la conclusión de que el balance nutricional del medio de cultivo es un factor crítico para la obtención de viabilidades óptimas.

Posteriormente, se aplicó un algoritmo de optimización; los resultados se presentan en la Tabla 14, se obtuvo un valor de 2,52 g/l para la fuente de carbono y de 9,89 g/l para la fuente de nitrógeno, con una relación de C/N de 3,92, cercana a la obtenida con el tratamiento cinco, en el que se obtuvo una concentración final de $1,9 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹.

Tabla 14. Niveles teóricos para optimizar la concentración del aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	Concentración (g/L)
Factor A	-1,0	1,0	-1,0	2,52
Factor B	-1,0	1,0	-0,110381	7,20 : 2,69

Valor óptimo: Log (UFC/mL) = 10,3237

A continuación se presenta la ecuación del modelo cuadrático codificado:

$$\begin{aligned} \text{Log (UFC/mL)} = & 10,2467 - 0,0126678A + 0,0213991B \\ & + 0,0635084*A^2 + 0,0363224AB - 0,0674029B^2 \end{aligned} \quad (3)$$

R-cuadrada = 24,29%

El modelo matemático no presentó un buen ajuste, por tanto, el análisis se debe enfocar a los análisis directos sobre los datos experimentales generados, no sobre los predichos. Sin embargo, es claro que los efectos de los factores individuales y sus interacciones son consistentes con los obtenidos en el diagrama de Pareto (Figura 8).

En conclusión, según los resultados del análisis de comparación de medias (Tabla 14), el análisis de las respuestas en función de la relación de C/N (Figura 9) y las viabilidades obtenidas, se tomó la decisión de continuar con una validación en el tiempo de los mejores resultados obtenidos (tratamientos T3 y T9), usando un volumen mayor.

Etapa 4: Ensayo de validación en Erlenmeyer de 500 mL

Los mejores tratamientos seleccionados en la etapa anterior (T3 y T9) se validaron en Erlenmeyer de 500 mL, dos veces en el tiempo, para determinar la reproducibilidad de los resultados a una escala mayor.

La metodología seguida fue similar a la aplicada en la etapa tres; se utilizó 100 mL del medio de cultivo correspondiente a cada tratamiento, se ubicó en Erlenmeyer de 500 mL para mantener la relación de volúmenes dentro del sistema y se llevó a cabo el proceso de fermentación bajo condiciones idénticas. Al finalizar se evaluó de nuevo la concentración final obtenida y la biomasa bacteriana.

En la Tabla 15 se presentan los resultados obtenidos en concentración bacteriana y en biomasa:

Tabla 15. Concentración (expresada como UFC/mL) y biomasa (expresada como g/L) obtenida para el ensayo de validación en Erlenmeyer de 500 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

	Log (UFC/mL)			Biomasa seca (g/L)		
	X	S	%CV	X	S	%CV
T3	10,212	0,1171	1,147	3,397	0,0074	8,677
T9	10,764	0,074	0,691	4,357	0,0113	10,159

Se observó que los resultados obtenidos en concentración son consistentes en el tiempo y tienen coeficientes de variación inferiores al 2%. En el caso de

la biomasa, para la primera repetición en el tiempo se obtuvieron coeficientes de variación relativamente altos (superiores al 10%), que fueron atribuidos a problemas asociados con la técnica de cuantificación de la biomasa seca obtenida después de la centrifugación de las muestras de biomasa húmeda. Sin embargo, esta posible fuente de error experimental se eliminó para la segunda repetición en el tiempo y se obtuvieron resultados consistentes y con un coeficiente de variación inferiores al 10%.

Al graficar los datos experimentales obtenidos en Erlenmeyer de 125 mL y los obtenidos en las dos réplicas en Erlenmeyer de 500 mL se presentó un coeficiente de variación entre 10% y 12% para el factor biomasa y un coeficiente de variación entre 1% y 2% para el factor concentración (expresada como UFC/mL); estos resultados indican que existió reproducibilidad adecuada, especialmente del factor más crítico que es la concentración final de la bacteria, ya que este parámetro es usado como línea base para el proceso de formulación del bioproducto (Figuras 11 y 12).

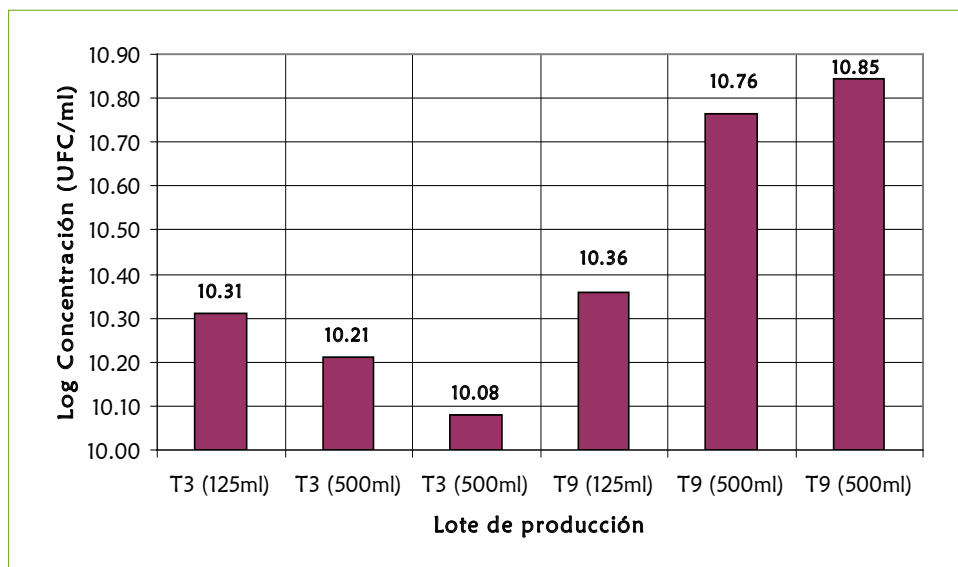


Figura 11. Viabilidad (UFC/mL) obtenida en diferentes volúmenes con dos tratamientos previamente seleccionados (T3 y T9), para la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

Dado que se cumplió con el requisito de reproducibilidad en el tiempo para el proceso de fermentación a nivel de laboratorio con la bacteria *P. fluorescens* Ps006, se procedió a llevar a cabo un montaje a nivel de banco, usando un biorreactor Airlift que fue previamente diseñado y puesto en marcha en trabajos anteriores en el Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica (Flórez, 2002).

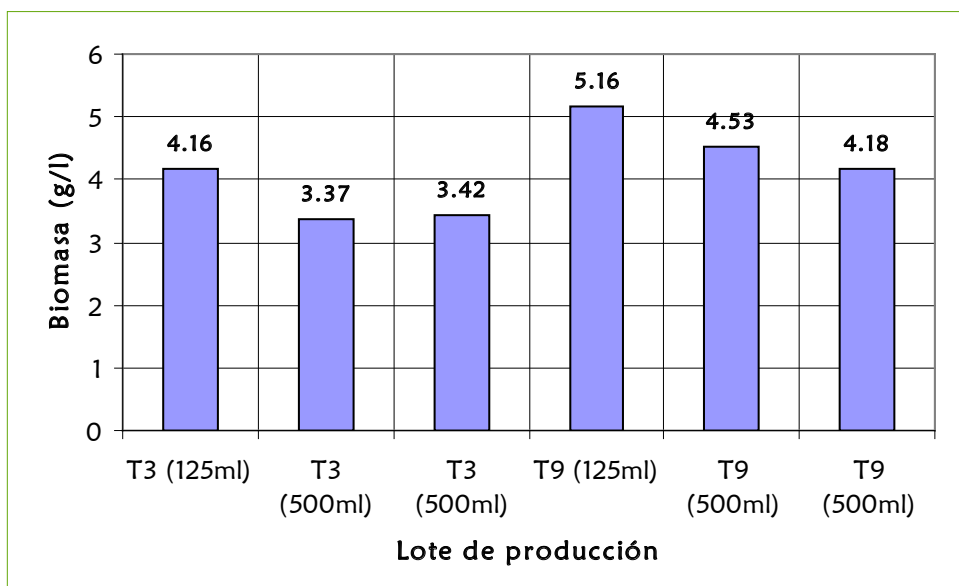


Figura 12. Biomasa (g/L) obtenida en diferentes volúmenes con dos tratamientos previamente seleccionados (T3 y T9), para la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

En conclusión, se seleccionó el tratamiento nueve por presentar consistentemente los mejores resultados en magnitud, tanto de concentración como de biomasa, en comparación con el tratamiento uno, en los dos volúmenes evaluados a nivel de laboratorio.

Etapa 5: Ensayo de producción de biomasa a nivel de biorreactor Airlift de 20 litros

Con la información obtenida durante el desarrollo del medio de cultivo (Etapas 1-4), se estandarizó la composición de nutrientes para la producción masiva de biomasa de la rizobacteria *P. fluorescens* Ps006 (Tabla 16).

Tabla 16. Composición del medio de cultivo estandarizado para ser evaluado en biorreactor Airlift para producción de biomasa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Factor A (Fuente de carbono) (g/L)	Factor B	
		(Fuente de nitrógeno orgánico) (g/L)	(Fuente de nitrógeno inorgánico) (g/L)
1*	7,56	11,43	4,05

*Corresponde al tratamiento nueve de la etapa cuatro.

Se usó un criovial conteniendo *P. fluorescens*. Ps006 proveniente de la colección banco de trabajo; la reactivación se llevó a cabo en agar LB, durante 48 h, a 28°C;

a partir de este pase se inocularon cuatro Erlenmeyer de 1000 mL, los cuales contenían 500 mL del medio de cultivo. Estos inóculos se dejaron en incubación a 175 rpm, durante 24 h, a 28°C, y se les determinó la viabilidad mediante recuento en placa (Tabla 17).

Tabla 17. Viabilidad del inóculo de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 para la producción de biomasa en biorreactor Airlift

UFC/mL			Log (UFC/mL)					
R1	R2	R3	R1	R2	R3	X	S	%CV
1,21x10 ⁸	1,64x10 ⁸	1,47x10 ⁸	8,0828	8,215	8,167	8,155	0,067	0,82

Por otra parte, el biorreactor Airlift se llevó a esterilización a 121°C y 15 Lb de presión, durante 15 min. Simultáneamente se prepararon 18 L de medio fresco; este volumen de medio fue esterilizado bajo las mismas condiciones mencionadas arriba. En cabina de flujo laminar y bajo condiciones estériles se llevó a cabo el llenado y posterior inoculación del biorreactor, usando el inóculo obtenido del paso anterior.

La fermentación se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura: 28°C, controlada mediante el uso de un controlador PID análogo, acoplado a una resistencia. Aireación: ajustada manualmente a un valor de 0,70 vvm, previa filtración y humidificación del mismo. Tiempo de fermentación: 48 h, según los datos experimentales en Erlenmeyer.

Se realizó un muestreo al final de la fermentación, utilizando el puerto destinado para tal fin, acoplado a una bomba peristáltica. Para la determinación de la viabilidad se tomaron 25 mL del caldo de fermentación en un Erlenmeyer estéril y para la cuantificación de biomasa seca se tomaron 100 mL del caldo de fermentación, por cuadruplicado, para ser posteriormente separados usando una centrífuga.

Tabla 18. Viabilidad (expresada en UFC/mL) para el ensayo de la producción de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en biorreactor Airlift

Hora	UFC/mL			Log(UFC/mL)					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	X	S	%CV
0	1,21x10 ⁷	1,64x10 ⁷	1,47x10 ⁷	7,083	7,215	7,167	7,155	0,06689	0,93
48	1,10x10 ¹⁰	9,90x10 ⁹	1,19x10 ¹⁰	10,041	9,996	10,076	10,038	0,05461	0,54

La concentración de células inicial en el fermentador fue aproximadamente de 1x10⁷ UFC/mL, igual que como se había hecho en las anteriores pruebas para optimizar el medio de cultivo. En el muestreo final, a las 48 h se observó turbidez del medio, sin presentar olores fuertes; la concentración en este tiempo

fue aproximadamente de $1,09 \times 10^{10}$ UFC/mL; se esperaba que la concentración en este tiempo fuera mayor de 1×10^{10} UFC/mL, como se había obtenido en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL. Por otra parte, en trabajos posteriores se evaluarán las condiciones fisicoquímicas en biorreactor (aireación) que pueden llegar a incrementar los niveles de concentración final.

Tabla 19. Biomasa (gramos) para el ensayo de la producción de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en biorreactor Airlift

Hora	Biomasa (g/L)						
	R1	R2	R3	R4	X	S	%CV
48	4,4	3,8	5,7	3,5	4,35	0,01	6,92

La biomasa seca obtenida mediante centrifugación sigue una tendencia similar a la concentración, llegando al punto más alto probado a las 48 h.

En la literatura únicamente existe información acerca de la remoción de contaminantes en aguas negras con *Pseudomonas* sp. en biorreactores tipo Airlift, pero son escasos los datos acerca de la producción de biomasa en dicho fermentador, por lo que no se tiene referencia con los posibles resultados encontrados en este montaje, ni es posible su comparación.

La mayor cantidad de biomasa que se obtuvo en el fermentador Airlift fue de 4,35 g/L, valores similares a los alcanzados en Erlenmeyer de 500 mL, que fueron aproximadamente de 4,5 g/L, en promedio; esto demuestra que hay reproducibilidad del proceso y se mantienen las magnitudes adecuadas para satisfacer los requerimientos de los procesos *downstream* a la fermentación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta técnica de secado de la biomasa puede tener varias interferencias provenientes del medio de cultivo.

Conclusión

Se llevó a cabo el diseño, estandarización y validación exitoso del proceso de producción de biomasa de *P. fluorescens* Ps006 mediante fermentación líquida. Los niveles de concentración de células viables y de biomasa obtenidos son adecuados para ingresar a las operaciones unitarias relacionadas con la formulación de un bioproducto.

Referencias bibliográficas

1. Abouseoud, M. Maachi, R. Amrane, A. Boudergua, S. & Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 223. Pp. 143-151.
2. Durner, R. Witholt, B. & Egli, T. 2000. Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in con-

- tinuous culture at different dilution rates. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (8). Pp. 2408-3414.
3. Flórez, J. 2002. *Diseño y puesta en marcha de un reactor Airlift para la producción masiva de microorganismos de interés en control biológico*. Tesis de Ingeniería Química. Fundación Universidad de América. Bogotá, Colombia.
 4. Lang, S. & Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids-biosynthesis. Microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51. Pp. 22-32.
 5. Sastoque, L. 2010. *Producción, caracterización y evaluación de la actividad biológica de biosurfactantes (Rhamnolípidos) a partir de rizobacterias de fique (Furcraea sp.)*. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 146 p.