

## Producción Masiva de Microorganismos Biocontroladores

**M. Forero Lozano.** Programa Nacional MIP. Centro de Investigación Tibaitatá. Corpoica. Apartado Aéreo 240142 Las Palmas Santafé de Bogotá D. C. Colombia. E-mail: cbiologico@corpoica.org.co

La producción de microorganismos tiene una gran importancia en el hombre moderno por ser esta la solución a grandes problemas como los son: la alimentación, la salud, la recuperación y preservación de ecosistemas y el desarrollo de industrias no contaminantes.

En el manejo integrado de plagas es necesario tener metodologías que permitan la producción de microorganismos, ya que se conocen alrededor de 100.000 especies de microorganismos, de las cuales aproximadamente 1.500 se sabe que actúan como entomopatógenos. Estas metodologías de producción de microorganismos requieren los conocimientos de varias ciencias: la biología, la bioquímica y la ingeniería química.

El diseño de un proceso biológico, asociado a una estrategia de manejo integrado de plagas, tiene como partes fundamentales: conocer la información biológica del microorganismo referente a su metabolismo, conocer su actividad biocontroladora, diseño del medio de cultivo, diseño de los equipos utilizados en el crecimiento, la selección de la técnica de producción mediante fermentación y el conocimiento de la cinética de crecimiento.

La información biológica fundamental tiene que ver con los procesos de producción de energía (rutas metabólicas) y de respiración y las condiciones óptimas de crecimiento para poder identificar el requerimiento de nutrimentos como: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y requerimientos de nutrimentos específicos.

Cuando un microorganismo se introduce en un medio de cultivo, su actividad está relacionada con sus características fisiológicas y con las condiciones medioambientales que se le provean. Esta actividad puede expresarse de tres maneras, ligadas la una a la otra:

1. Reacciones de síntesis de biomasa (crecimiento): El sustrato carbonado es utilizado como material de construcción y generalmente como fuente de energía, describiéndose por la siguiente ecuación:

Sustrato carbonado



Sustratos minerales

2. Reacciones de bioconversión y de síntesis de productos: En muchos casos los microorganismos producen nuevos metabolitos o transforman las moléculas que se introducen en el medio de cultivo, mediante la ecuación:



3. Las reacciones de mantenimiento: Las reacciones que no conducen a la formación de biomasa o a la producción de metabolitos, se denominan reacciones de mantenimiento,

éstas en general, consisten en la oxidación total de los sustratos y pueden escribirse de acuerdo a la siguiente reacción:



La ecuación química siguiente representa el balance de crecimiento de un microorganismo, en el caso de una fermentación o producción de biomasa, cuando ésta es el único producto formado:



Diferentes fórmulas brutas para la biomasa han sido propuestas, pero en la mayoría de los casos, la composición en carbono de un microorganismo, es cercana a un 50% y la composición en nitrógeno es aproximadamente de 9%. El sustrato carbonado juega dos papeles en el proceso de crecimiento, el primero consiste en dar la energía necesaria para la síntesis de estructuras y mantenimiento celular bajo la forma de ATP. En segundo lugar, el sustrato sirve para la edificación de constituyentes celulares, en el cual se calcula el coeficiente de conversión del sustrato en biomasa  $Y_{x/s}$  (cantidad de biomasa en gramos formada a partir de 1 gramo de sustrato), que para sustratos glucídicos es igual a 0.5.

En cuanto a su actividad biocontroladora se debe conocer la habilidad que tiene el microorganismo para colonizar determinado ambiente (suelo, plantas, etc.), su capacidad para producir compuestos que son favorecedores o inhibitorias a otros microorganismos colonizadores y su capacidad para infectar insectos o producir toxinas letales para ellos. Para realizar la producción masiva de un microorganismo con propósitos de biocontrol, se debe definir si los propágulos que se requieren pertenecen a la fase vegetativa o reproductiva de éste, teniendo en cuenta su modo de acción. Para el caso de bacterias no esporulantes y levaduras, en general, se utilizan células vegetativas, mientras que para bacterias esporulantes p.ej. *Bacillus sphaericus* se utilizan esporas; si el microorganismo es esporulante y productor de cristales p.ej. *Bacillus thuringiensis*, se utilizan ambas estructuras. Con relación a la mayoría de hongos entomopatógenos y antagonistas, se utilizan esporas, dado que a éstas se les ha atribuido un rol primario en el proceso de infección del hospedero, excepto en el caso de Oomycetes y Zygomycetes, para los que se utilizan zoosporas o balistosporas respectivamente.

Para diseñar un medio de cultivo adecuado a un microorganismo en particular, es necesario conocer su fisiología y sus requerimientos nutricionales y físicos, dado que éstos varían de acuerdo a las especies. En términos generales la producción de biomasa microbiana es un proceso autocatalítico, el cual depende de cada microorganismo individual y de las condiciones fisicoquímicas del cultivo. El diseño del medio de cultivo es uno de los más importantes factores, ya que el medio no sólo debe satisfacer los requerimientos nutricionales y ambientales del microorganismo, sino también las condiciones técnicas y económicas del proceso, con el objeto de minimizar costos de separación y purificación y obtener un producto de máxima calidad y mínimo costo posible. El punto de partida hacia la determinación de los requerimientos nutrimentales y ambientales es la estequiometría sobre crecimiento y formación de producto. Los requerimientos mínimos de un nutrimento son calculados estequiométricamente.

El diseño preliminar de un medio de cultivo se hace conociendo la fórmula empírica de la bacteria y la concentración celular deseada ( $\text{g células secas} / \text{litro}$ ). Luego se selecciona la fuente de nutrimento para cada elemento que compone la bacteria y con base a la concentración celular deseada se calcula las cantidades de cada nutrimento. La necesidad de una sustancia nutritiva de interés se evalúa experimentalmente mediante una serie de fermentaciones

por lotes, en las cuales ese compuesto se suministra en cantidades limitadas, mientras los otros nutrientes son suministrados en exceso. A medida que aumenta la concentración de la sustancia nutritiva, esta se hace disponible en exceso y alguna otra se vuelve limitativa del crecimiento. En medio líquido, dependiendo del microorganismo, se pueden obtener estructuras unicelulares o pluricelulares que pueden formar agregados.

Adicionalmente, los microorganismos pueden producir exopolisacáridos o sustancias viscosas que afectan las características reológicas del medio de cultivo y la transferencia de masa (específicamente la transferencia gaseosa, y la interfase gas - líquido). La reología del medio del cultivo se expresa en términos de estrés de cizalla ( $\tau$ ). En medios de cultivo con consistencia parecida a la del agua,  $\tau$  incrementa a la rata de cizalla. Los fluidos en que la viscosidad permanece constante, se denominan fluidos Newtonianos.

La mayoría de cultivos de bacterias y levaduras presentan este comportamiento. Contrariamente, los hongos que crecen como largas hifas o que producen exopolisacáridos, presentan un comportamiento pseudoplástico. La transferencia de oxígeno en los medios de cultivo, está influenciada por la reología de éste, la transferencia de oxígeno disminuye cuando incrementa la viscosidad. El oxígeno es usualmente un factor crucial debido a su baja solubilidad (7 a 8 miligramos por litro); esta cantidad sólo es suficiente para los microorganismos durante algunas decenas de segundo, haciendo necesario airear continuamente el medio de cultivo, de acuerdo a las necesidades de oxígeno de cada microorganismo. Opuesto a esto, la fuente de carbono contenida en el medio de cultivo en una concentración del 3%, permite la producción de 15 gramos por litro de biomasa en varias horas. Es necesario tener en cuenta que la demanda máxima de oxígeno en un cultivo se sitúa al final de la fase exponencial. En primera instancia, la limitación de oxígeno, sólo se produce cuando la transferencia de este es inferior a la demanda. De otra parte, la concentración de oxígeno disuelto en el medio, varía a través del tiempo, siendo mínima al final de la fase exponencial. Además, la demanda de oxígeno por unidad de masa de microorganismo permanece constante durante la fase exponencial. Sin embargo, es posible que la transferencia de gas decrezca durante el crecimiento microbiano debido a la interfase gas-líquido causada por la presencia de microorganismos, o a metabolitos excretados. La optimización de un medio de cultivo es compleja debido a la gran cantidad de variables involucradas y se realiza mediante procedimientos estadísticos.

Los equipos utilizados usualmente en la producción de microorganismos se denominan biorreactores, los cuales deben verificar una serie de parámetros de importancia industrial como son: la temperatura, pH, oxigenación, mezclado y aepsia. Para ello deben estar constituidos principalmente por un tanque que contiene el medio de cultivo con controladores de: temperatura, aireación, oxígeno disuelto, agitación, espuma, nivel del medio, entre otros.

Los microorganismos se han producido mediante dos técnicas fundamentales: fermentación semisólida y fermentación sumergida. La mayoría de bacterias y de hongos pueden ser producidos masivamente, tanto en medio de cultivo líquido como semisólido. Sin embargo, para hongos, son pocos los reportes que existen en la literatura sobre la producción de conidios en medio líquido. La mayoría de veces, se producen blastosporas, que aunque pueden actuar eficientemente como unidades infectivas, en general, tienen una vida más corta que las de las conidias.

En una fermentación semisólida tradicional, el microorganismo se cultiva en una solución con nutrimentos líquidos absorbidos en pequeñas partículas de un acarreador sólido. Esto permite un área interfacial líquido-aire muy alta. Algunos de los acarreadores más comúnmente utilizados son: salvado de trigo, maíz molido, cacahuete picado, alfalfa, arroz, semilla de algodón y cascarillas de arroz y de avena. Estos componentes frecuentemente aportan nutrimentos, fundamentalmente una fuente de carbono. También se deben agregar aditivos

inorgánicos inertes, para prevenir la formación de grumos muy grandes o la compactación del lecho formado por el material sólido, así como para facilitar las posteriores operaciones de molienda. Con este fin se han empleado perlita, obsidiana molida, vermiculita, piedra pómez, cenizas volcánicas y tierra de diatomeas calcinada. Este método tiene las siguientes ventajas sobre la fermentación sumergida: el proceso es barato debido a que no requiere de equipo sofisticado, ni un control riguroso; además algunos procesos de fermentación sumergida no se llevan a cabo en condiciones de esterilidad, por lo tanto no requiere aire estéril y resulta muy barato comparativamente a otros métodos de fermentación, en costos de operación; el manejo de la fermentación es relativamente sencillo, una vez que se encuentran los parámetros adecuados de ajuste de mezcla antes del inicio de la fermentación; la obtención del producto final requiere solamente las operaciones de secado y molienda de la mezcla y adicionar algunos aditivos. Las desventajas del método son las siguientes: el proceso no permite la obtención de un producto con calidad constante; el proceso no permite el uso de controles adecuados de las condiciones de operación (oxígeno transferido, temperatura y pH); los rendimientos son relativamente bajos comparados con la fermentación sumergida.

La producción de microorganismos se realiza también por fermentación sumergida y es el método ampliamente usado para la producción de bioinsecticidas. La fermentación sumergida de microorganismos se ha intentado a nivel de laboratorio y de planta piloto, básicamente por tres métodos: por fermentación en lote, fermentación en lote alimentado y en cultivo continuo.

La alternativa más usada es la fermentación por lote. Esto se debe a las siguientes ventajas: la fermentación es sencilla desde el punto de vista de la operación del fermentador: se esteriliza y carga el fermentador, después se hace la fermentación y posteriormente se descarga el equipo, realizándose todo de una manera consecutiva; es factible esterilizar en el mismo fermentador y utilizar este mismo como tanque de sostenimiento de mosto con producto, mientras este se procesa, lo que disminuye el número de equipos totales necesario si el programa de producción no es muy ajustado y lo permite. La fermentación sumergida por lote es sencilla desde el punto de vista de la operación del fermentador: se esteriliza y se carga el fermentador, se hace la fermentación y posteriormente se descarga el equipo. Es posible esterilizar el medio de cultivo en el propio fermentador y utilizar este mismo como tanque de sostenimiento de caldo de cultivo con producto mientras éste se procesa. Esto disminuye el número de equipos necesarios, si no se tiene un programa de producción muy ajustado. El control del proceso es simple ya que se fijan al inicio de la fermentación la composición del caldo y del pH; se mantienen constantes la temperatura, agitación y alimentación de oxígeno. El tiempo de fermentación se fija hasta alcanzar la concentración celular deseada. En caso de problemas como contaminaciones, fallas en el control del proceso, aparición de lisis celular o eventual pérdida de la estabilidad genética, se limitan a un solo lote, lo que permite su corrección para el siguiente lote. En la fermentación sumergida por lote es posible efectuar fermentaciones utilizando una cepa diferente para cada lote. El escalamiento del proceso es simple y se ha sugerido que el mejor criterio de escalamiento es mantener constante la razón de transferencia de oxígeno (OTR).

El cultivo por lote presenta varias desventajas. Es menos productivo cuando se compara con los otros métodos sobre la base del volumen de mosto empleado y al tiempo de fermentación. Esto se debe a que se alcanzan concentraciones celulares menores que con el lote alimentado y además, un porcentaje grande del tiempo de fermentación se pierde en la fase lag y en el inicio del crecimiento logarítmico. Sólo en las últimas horas de fermentación se produce la mayoría de la biomasa. Se requiere habilidad de operación para obtener calidades iguales de lote a lote de producción, a veces empleando el procedimiento de modificar las condiciones de operación para cada lote, que deben seleccionarse sobre la marcha dependiendo de como se comporta la fermentación. Las escalas de producción grandes

requieren fermentadores y equipos de almacenamiento con volúmenes mayores que los empleados para un cultivo continuo.

La técnica de fermentación por lote alimentado consiste en un sistema fermentativo que es fundamentalmente un cultivo por lote, en el que la fase de crecimiento logarítmico se prolonga con el procedimiento de agregar medio de cultivo fresco y concentrado al tanque cuando la fermentación ha alcanzado esta fase, retrasando con ello la llegada de la fase de desaceleración del crecimiento. Por esta técnica se obtienen concentraciones celulares y productividades mayores a las del cultivo por lote. Lo primero debido a que se permite un crecimiento adicional con un menor incremento de volumen y lo segundo por que una porción mucho mayor del tiempo de fermentación se emplea en la producción de biomasa. También se minimizan los efectos de inhibición por sustrato. Mediante el cultivo por lote alimentado se puede tener problemas de efectos de inhibición del crecimiento, ya sea por concentración de metabolitos excretados al medio o por inhibición por sustrato, si la alimentación no se hace al régimen adecuado. Requiere, además, la determinación más exacta de cuáles son los nutrientes limitantes que se van adicionar para controlar el crecimiento, sobre todo si el método de alimentación no conlleva a un control por retroalimentación. En este caso, se necesitaría contar con los parámetros muy bien determinados de la velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), el rendimiento celular con base en sustrato ( $Yx/s$ ) y la constante de utilización del sustrato ( $K_s$ ).

Se requiere determinar cual debe ser el método de alimentación de los nutrientes seleccionados. Si el método de fermentación no tiene control por retroalimentación, se debe desarrollar un modelo que prediga el crecimiento y proponga el método de alimentación a seguir (Alimentación lineal o a velocidad constante, alimentación intermitente o por pulsos, alimentación con incremento de velocidad exponencial, etc.)

También es necesario el uso de métodos y equipos sofisticados de control del proceso y de la adición del nutriente limitante, sobre todo si el control es por retroalimentación.

La fermentación mediante cultivo continuo es otra técnica utilizada para producir microorganismos, donde se alimenta medio fresco y se retira producto simultáneamente. Con esta técnica es posible tener un control de la velocidad de crecimiento del microorganismo y al menos teóricamente esta velocidad puede mantenerse por un tiempo indefinido. En el interior del fermentador, tanto la concentración celular como las condiciones de operación pueden mantenerse constantes y dependen de la velocidad de dilución, que puede manipularse con facilidad. Esto permite una investigación más adecuada de la respuesta fisiológica del microorganismo a cambios ambientales, ya que éstos pueden fijarse con bastante exactitud. De manera similar, permite una determinación más precisa de las constantes cinéticas. Se necesitan equipos comparativamente más pequeños para emplearse en escalas de producción bastante mayores que con respecto a los otros métodos mencionados. Utilizando esta técnica, el periodo prolongado de operación con inyección continua de nutrientes y de aire, que requieren estar estériles, producen mayores posibilidades de contaminación. Si aparecen problemas de concentración celular en espumas, agregación de células o depósito en las paredes de acumulaciones celulares la fermentación puede desestabilizarse, llegándose a un eventual lavado del recipiente.

En fermentaciones que presenten etapa de esporulación, se pueden presentar asincronías en la esporulación, dependiendo de la velocidad de dilución, obteniéndose así, medios en los que la bacteria se encuentra en toda una variedad de estados fisiológicos distintos. Esto conlleva a la necesidad de emplear cultivos continuos que contemplan varias etapas, de las cuales, por lo menos una sirve para el crecimiento vegetativo y otra para la esporulación.

Cuando se producen microorganismos en medio líquido, en cada fermentación, las cantidades de sustrato a ser aplicadas al fermentador deber ser determinadas mediante reacciones estequiométricas. Las ecuaciones que relacionan el balance de cada componente en la composición de un microorganismo y el crecimiento esperado de éste cuando se cultiva en un sustrato particular, se utilizan para calcular los diferentes coeficientes estequiométricos y para estimar los mínimos requerimientos de sustrato en una fermentación dada. Esta ecuación deberá variar para cada microorganismo. Una vez definidos los requerimientos de éste, la cinética de crecimiento deberá ser estudiada en el medio de cultivo elegido. Cuando el microorganismo crece a un determinado intervalo de tiempo (dt), la biomasa incrementa a un valor dX, proporcional a la cantidad de microorganismo presente (X) y la magnitud de dt.

$$dX = \mu X dt \quad (1)$$

La rata de crecimiento específica, es la medida básica de todas las fermentaciones. Cuando  $\mu$  es constante, la integración de la ecuación 1 daría:

$$\ln X = X_0 + \mu t \quad (X_0 = \text{biomasa inicial}) \quad (2)$$

El tiempo en que la biomasa se duplica (tg) es calculado a partir de la ecuación 2, teniendo en cuenta que  $X = 2X_0$ . Otro parámetro importante del crecimiento, dependiente del sustrato s es el rendimiento en biomasa  $Y = dX/ds$ . Los cocientes metabólicos son:

$$q = \frac{1}{X} \frac{ds}{dt} = \frac{\mu}{Y}$$

Cuando un microorganismo es producido en fermentador, mediante cultivos por lote (batch), su curva de crecimiento estaría dividida en las siguientes seis etapas: Fase de latencia, fase de aceleración, fase exponencial, fase de desaceleración, fase estacionaria y fase de decadencia. Cuando el sustrato es el factor limitante, la ecuación de Monod es la más utilizada.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_x + S} \quad (3)$$

$\mu_m = \mu$  (máxima rata de crecimiento específico,  $K_s =$  constante de saturación).

Los cultivos continuos, permiten la producción continua de microorganismos mediante la adición controlada de medio de cultivo. En este caso, el incremento de la biomasa, el cual es igual al crecimiento en la cuba de fermentación, menos la salida de un determinado volumen de caldo de fermentación.

$$V dX = Q_0 X_0 dt + \mu X dt V - k_D X V dt - Q_s X dt \quad (4)$$

V = volumen de la cuba; Q = rata de flujo de caldo de cultivo a la entrada ( $Q_0$ ), y a la salida ( $Q_s$ ) del fermentador;  $X_0$  = biomasa a la entrada;  $k_D$  = rata de mortalidad.

La rata de transferencia de oxígeno  $dSO_2$  se caracteriza por el coeficiente de transferencia gaseosa  $K_{La}$ , definido por la siguiente ecuación:

$$\frac{dSO_2}{dt} = K_L a (SO_2^* - SO_2) \quad (5)$$

$K_L$  = resistencia específica del oxígeno a la difusión;  $a$  = área interfacial específica;  $SO_2^*$  = máxima concentración de oxígeno;  $SO_2$  = concentración real de oxígeno.

Los bioinsecticidas que se fabrican hasta el momento son mezclas de microorganismos y de los residuos de la fermentación, más los componentes que se agregan para facilitar su aplicación en campo. Debido a esto, no existe una necesidad imperiosa de obtener un producto con altos niveles de pureza, como puede ocurrir con otros productos biotecnológicos (aditivos alimenticios y productos farmacéuticos, entre otros). Sin embargo, debido a que las concentraciones microorganismos en el caldo de cultivo al final de la fermentación son bajas, es necesario llevar a cabo un proceso de separación dirigido fundamentalmente a incrementar la concentración hasta los valores del producto utilizable para las formulaciones.

La separación de la bacteria puede hacerse utilizando técnicas como: floculación, filtración y centrifugación. La floculación en general puede lograrse con adición de sales inorgánicas que afectan la fuerza iónica del medio y las cargas eléctricas de las partículas, solventes orgánicos que secuestran a la molécula del solvente, polímeros de alto peso molecular que pueden formar redes moleculares y cambios de pH que acercan las partículas a su punto isoeléctrico. Este método presenta las siguientes desventajas: largos tiempos de operación con bajo rendimiento (65% de volumen original se separa como sobrenadante en 48 horas); poca capacidad de empaquetamiento del flóculo; flóculos que se resuspenden con facilidad. Estos inconvenientes provocan riesgos de contaminación por el largo tiempo de operación.

La filtración se ha realizado utilizando filtros de marcos y platos (filtros prensa), con diferentes ayudas filtrantes. Las pastas separadas por este medio contienen no sólo los microorganismos y sólidos residuales de la fermentación, sino también el filtro empleado, lo que puede considerarse como un inconveniente. Las pastas o tortas resultantes son secadas en secadores de bandeja y se combinan con diluyentes inertes y se formulan.

En la operación de centrifugación se emplean, industrialmente, centrifugas de flujo continuo, de alta velocidad, normalmente diseñadas para separar biomasa de sus caldos de fermentación. En algunos casos se utilizan centrifugas de discos, con boquillas o con descarga intermitente.

El método de flotación se utiliza para obtener por separado microorganismos y esporas de microorganismos mediante la formación de espumas, aprovechando el diferente comportamiento tensoactivo de ambos componentes.

El secado de los productos depende del método de separación, frecuentemente las pastas obtenidas por filtración se secan en secadores de bandeja de circulación forzada con aire caliente o al vacío y con temperaturas entre 40 a 50°C. Si se emplea una centrifugación como primera etapa de separación, los concentrados resultantes pueden someterse a una formulación previa y después se secan en secadores por aspersion a 175 °C de temperatura

de entrada del aire y 90-100 °C de temperatura de salida. A pesar de la elevada temperatura, este método es muy utilizado debido a que la rapidez del proceso conserva adecuadamente la viabilidad de muchos microorganismos. Igualmente, el secado se realiza en secadores de lecho fluido en los que, además del efecto del secado por aspersión, se presenta otro efecto de secado debido al aire caliente que circula en contracorriente con respecto al flujo de aspersión formando así un lecho de aire en el que las partículas se mueven constantemente. Este tipo de secado tiene la ventaja de ser muy rápido y las temperaturas de secado son menores que las del secado por aspersión.

### **Bibliografía**

- Latge, J.; Moletta, R. 1988. Biotechnology. In: Atlas of entomopathogenic fungi. Eds. R. Samson, Hary Evans, J. Latgé. Springer Verlag, Berlin. 152-164.
- Keller, R.; Dunn, I. J. 1977. Fed batch microbial culture: models, error, applications. *Journal of Applied Chemical and Biotechnology* 28, 504-514.
- Khachatourians, G. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: *Hanbook of Applied Mycology. Humans, animals and insects*. Eds. D. Arora, L. Ajeilo, K. Mujerji. Marcel Dekker Inc. New York. 548-611.
- Navarro, J. M.; Goma, G. 1976. Fermentation continue: Théorie et applications à la préparation des boissons fermentées. *Série Synthèses bibliographiques*. De. APRIA, Paris.
- Thonard, P. 1988. *Memorias del curso de bioingeniería*. Facultad de Ciencias Agronómicas de Gembloux. Bélgica. 300 pp.