

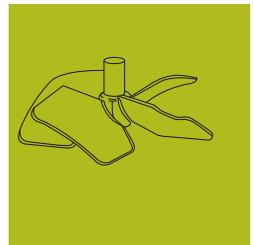
Domesticar microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero

Enrique Galindo, Carlos Peña y Leobardo Serrano-Carreón

Los microorganismos (bacterias, levaduras y hongos principalmente) crecen en el suelo, sobre nuestra piel, en nuestro intestino, en el mar y hasta en los volcanes submarinos y en los glaciares. Los microbios (y en particular las bacterias) están en prácticamente todos lados y son necesarios sobre todo para la descomposición de la materia orgánica en la tierra. Los microbios en general tienen una vida muy dura, ya que la comida (los nutrientes o sustratos) casi siempre escasea en la naturaleza. Los biotecnólogos (y en particular los bioingenieros) han hecho posible hacer crecer a los microbios en recipientes en donde es posible proporcionarles todo lo que necesitan, o bien darles sólo los nutrientes necesarios (o no darles otros) de tal manera que produzcan lo que nosotros queremos que produzcan (y casi siempre en cantidades y velocidades que son mucho más grandes que las que ocurren en la naturaleza). De eso se trata fundamentalmente la llamada tecnología de fermentación: cultivar artificialmente a los microbios bajo condiciones controladas y casi siempre en grandes cantidades. Cultivar células microbianas

fuera de su ambiente natural, como es el caso de los cultivos en biorreactores (o fermentadores), implica conocer y proveer las condiciones favorables para su crecimiento y para la generación de productos celulares de interés. Es decir, el desarrollo de un proceso fermentativo requiere necesariamente del aprendizaje de cómo proveer los estímulos necesarios para que las células trabajen en nuestro beneficio, lo que podría denominarse una “domesticación” de ellas.

En nuestro laboratorio¹ nos ha interesado cultivar microbios (para sacarles el mayor “jugo” posible) en fermentadores, tanto pequeños de laboratorio, como industriales de gran tamaño. Nos interesa lo que pasa dentro del fermentador, porque al saberlo podemos intentar controlar el ambiente inmediato que experimentan los microorganismos y, así, hacer que rindan lo que esperamos de ellos. Una regla básica de la tecnología de fermentaciones indica que si uno cuida a sus microbios (procurándoles su ambiente óptimo), ellos cuidarán de uno (produciendo compuestos o biomasa de utilidad para los humanos).



¹ Página del Grupo de Investigación: <http://pbr322.ceingebi.unam.mx/~Geg/>

Hemos domesticado microbios con varios propósitos. En un caso, nos interesa producir los propios microbios vivos en altas cantidades para usarlos como enemigos naturales de otros microbios que causan enfermedades en las plantas. Más adelante contaremos la historia de cómo hemos cultivado bacterias, levaduras y hongos que son útiles para controlar enfermedades del mango y del jitomate. En otros casos, nos ha interesado cultivar microbios bajo condiciones particularmente difíciles desde el punto de vista de suministro de nutrientes. Se trata de bacterias que producen polímeros, los cuales se usan como viscosificantes en varias aplicaciones (por ejemplo, en los aderezos para ensaladas). Estos polímeros, tan útiles en sus aplicaciones, complican el cultivo de los microbios, ya que elevan la viscosidad del caldo de cultivo, dificultando el suministro necesario de oxígeno. Un microbio rodeado de una solución viscosa, se comporta en forma muy diferente a uno que se encuentra suspendido en un líquido de baja viscosidad, como el agua pura. Y ya que al microbio sólo le importa su ambiente inmediato, el reto del bioingeniero es domesticar al microbio usando todo tipo de estrategias para lograr que el microbio esté “cómodo” o “incómodo” en el biorreactor, dependiendo si la comodidad o la incomodidad es lo que hace que produzca eficientemente lo que se requiere (más adelante relataremos lo hecho para lograrlo). Si esta complejidad debida a la viscosidad del caldo no fuera suficientemente retadora, hemos estudiado además procesos de cultivo en donde la situación es aún más complicada: donde hay más de una fase líquida (la acuosa y además un aceite), y en donde también hay una fase sólida que tiene un tamaño suficientemente grande como para complicar los fenómenos de suministro de oxígeno (y de otros nutrientes) dentro del biorreactor. Cuando las células microbianas son muy pequeñas (como en el caso de las bacterias y las levaduras), su tamaño no causa problemas para dispersarse o para homogenizar el sistema y proveer oxígeno suficiente al cultivo. Sin embargo, cuando se trata de hongos filamentosos, la si-

tuación es muy diferente. Estos hongos crecen en largos filamentos (llamados hifas), que pueden aglomerarse en colonias densas llamadas *pellets* y, por lo tanto, afectan dramáticamente las condiciones de mezclado del sistema. Para entender estos sistemas de fermentación de alta complejidad, hemos usado como modelo de estudio la producción de aromas frutales (o fungicidas) por el hongo *Trichoderma harzianum*. Este hongo es también un potente agente biológico para controlar enfermedades de plantas ocasionadas por otros hongos, de los cuales *Trichoderma* es enemigo natural. Otra vez, como al microbio sólo le importa lo que pasa cerca de él, nos hemos concentrado en estudiar este proceso en el nivel microscópico. Así que nos las ingeniamos para ver y fotografiar lo que está pasando dentro del fermentador; esto es, establecer cómo interactúa el hongo con las burbujas de aire y con las gotas de aceite que se forman, uno de los nutrientes principales del hongo.

En síntesis, en las páginas que siguen se mostrará, a través de algunos ejemplos de nuestro laboratorio, la búsqueda y los retos que enfrenta un bioingeniero al desarrollar mejores y más eficientes procesos de fermentación.

Los retos del bioingeniero

La producción industrial de los derivados de la biotecnología ha sido posible en buena medida gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo celular en gran escala: *tecnología de fermentación*. Dichas técnicas han permitido el establecimiento de las condiciones para el cultivo de células microbianas, vegetales y animales, para la síntesis de toda una gama de metabolitos de interés en los diferentes sectores de la industria (química, farmacéutica, textil, de alimentos, etc.). El corazón de estas técnicas de cultivo es el fermentador o biorreactor, que es el recipiente en donde se promueve el crecimiento de organismos para la síntesis de diversos productos biotecnológicos. La función principal de un fermentador es la de proveer un ambiente controlado para alcanzar el crecimiento y la forma-

ción óptima de productos, o ambos. Además, el fermentador tiene como objetivo garantizar una condición estéril, que permita únicamente el cultivo de la especie biológica de interés.

Los fermentadores pueden variar en tamaño, desde 0.1-10 L (laboratorio) hasta 400,000 L (industrial). Las dimensiones del fermentador dependen de su proceso y operación. Por ejemplo, los cultivos celulares operados en lote (sistemas de cultivo en donde sólo se adicionan nutrientes al principio de la fermentación y el volumen se mantiene constante), requieren fermentadores mayores a los que se usan en los cultivos continuos o semi-continuos (sistemas con adición continua de nutrientes y volumen variable). A nivel de investigación, el fermentador más empleado, tanto en la academia como en la industria, es el matraz. Se usa ampliamente para la evaluación y desarrollo de diversos cultivos celulares. Una ventaja de los matraces agitados, es que se pueden llevar a cabo un gran número de experimentos para establecer el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento y rendimiento de los microorganismos. Por su parte, los fermentadores industriales presentan un alto grado de equipamiento, incluyendo sistemas de agitación y dispersión de aire para garantizar una buena oxigenación del medio y un eficiente mezclado, así como sensores para conocer el cambio de las variables del cultivo tales como: la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, la concentración celular, entre otros.

En los últimos años se han logrado avances significativos en el diseño de los fermentadores, así como en el grado de control que se ejerce durante el proceso de fermentación, abriendo la posibilidad del cultivo de toda una variedad de organismos, particularmente aquellos que han sido modificados genéticamente.

La aireación y el mezclado son las operaciones más importantes que se busca satisfacer en el fermentador pues una proporciona oxí-

geno al cultivo (en procesos aerobios) y el otro mantiene cierta homogeneidad en los parámetros fisicoquímicos.² En los fermentadores de laboratorio, la satisfacción de la demanda de oxígeno y un mezclado eficiente pueden lograrse sin mayor dificultad. Pero a mayor escala el proceso se complica. A medida que se incrementa el tamaño del equipo, se incrementan las diferencias de los parámetros de cultivo y la presión hidrostática cambia drásticamente. Lo anterior puede llevar a graves consecuencias en el rendimiento y calidad del producto o metabolito de interés. La problemática se complica cuando la viscosidad del cultivo aumenta significativamente como resultado de la producción de polímeros o por el incremento en la masa celular (cultivos de hongos filamentosos).

La viscosidad es una medida de la capacidad que un material tiene para fluir. El agua, que es el componente mayoritario de los medios en donde se cultivan los microorganismos, tiene baja viscosidad. Muchos productos que usamos en la vida cotidiana tienen alta viscosidad (la salsa *catsup*, algunos aderezos, la mayonesa). De hecho, la alta viscosidad de estos productos se debe a que se les ha agregado un polímero (o *goma*) que produce un microorganismo por fermentación. Otros productos, como los refrescos que contienen pulpa de alguna fruta, también son viscosos. Sin embargo, en este caso, la viscosidad se debe a la presencia de sólidos (de la fruta) suspendidos en una solución acuosa. Lo mismo sucede cuando un microorganismo filamentosos (que es una partícula sólida suspendida) se cultiva en fermentadores y se reproduce al grado de aumentar su concentración en el medio de cultivo y tornarlo viscoso.

Los cultivos microbianos, ya sea que produzcan polímeros o que desarrollen altas concentraciones de biomasa miceliar, tienen una característica peculiar: su viscosidad depende de cómo se agita o se pone en movimiento el fluido. Usualmente, mientras más se agite un

² Galindo, E., "Aspectos de Ingeniería en fermentaciones: cómo mezclar gases, líquidos y sólidos", en *Descubrimientos y aportaciones científicas y humanísticas mexicanas en el siglo veinte*, Academia Mexicana de Ciencias, 2007.

caldo de fermentación conteniendo polímeros o biomasa miceliar, menor será su viscosidad. Por ello, se dice que se trata de una viscosidad “aparente”, ya que no se puede definir un valor específico de ella si no se conocen exactamente las condiciones bajo las que se está agitando el fluido, lo que se conoce como *velocidad de deformación*, y la cual depende de la velocidad de rotación del sistema de agitación y de su geometría. Esta propiedad adelgazante de los fluidos explica en parte porqué son muy útiles ciertas soluciones de polímeros. Cuando la salsa *catsup*, por ejemplo, está en la botella (en reposo y sin deformación alguna) su viscosidad es muy alta y no sale fácilmente. Para que fluya, habitualmente golpeamos la botella (aumentamos la velocidad de deformación) y entonces logramos que la salsa salga. Esperamos de una buena *catsup* que tenga consistencia (viscosidad) para que no se desparrame por todo el plato. Esta propiedad, que se llama técnicamente *pseudoplasticidad*, es muy útil en muchas otras aplicaciones (en los fluidos de perforación de pozos petroleros, en la aplicación de agroquímicos por medio de avionetas, en los lápices labiales, etc.).

La alta viscosidad y el hecho de que su comportamiento sea *pseudoplástico* es una ventaja en varias de las aplicaciones; sin embargo constituye una dificultad técnica importante cuando lo que se torna viscoso es un caldo de cultivo en un fermentador. En estos casos, el trabajo del bioingeniero es lograr que todo (o la mayoría) del volumen del caldo de fermentación se encuentre bien mezclado. Si no mezclamos bien el líquido existirán zonas “muertas” (de poca o nula agitación), lo que conducirá a un menor rendimiento.

Microbios en un ambiente viscoso

En nuestro grupo de investigación hemos estudiado estos aspectos usando un proceso de fermentación que genera muy altas viscosidades del caldo de cultivo: la producción de la goma

xantana por una bacteria llamada *Xanthomonas campestris* (la cual produce enfermedades en ciertas plantas precisamente por su capacidad de generar alta viscosidad de sus soluciones, pero es inocua para el hombre). La xantana se usa ampliamente en varias industrias, incluyendo la alimentaria, farmacéutica y petrolera, en donde se emplea como aditivo viscosificante (pero *adelgazante*). Entre los aspectos que hemos estudiado se encuentra el uso de varias geometrías de elementos de agitación (llamados impulsores) para lograr mezclar eficientemente, y al menor consumo energético posible, el caldo viscoso (el cual incrementa su viscosidad aparente hasta en 10 000 veces en el transcurso de un cultivo).³ Hemos encontrado, por ejemplo, que son más eficientes los impulsores de diámetro grande (aunque de giro lento) que los pequeños (de giro rápido), que son lo que se usan en la mayor parte de los procesos de fermentación industrial. También hemos encontrado que impulsores de diseños en forma de “ventilador” son más eficientes para mezclar el fluido y lograr dispersar el aire (que contiene oxígeno, necesario para la respiración de la bacteria).

Las células dentro de un biorreactor pueden tener diferentes comportamientos, tanto en su morfología como en su fisiología, dependiendo de las condiciones hidrodinámicas en las cuales se cultiven. Así, por ejemplo, en el caso de *Azotobacter vinelandii* (una bacteria productora de polisacáridos), nuestro grupo ha reportado que en cultivos mal mezclados, tanto en matraces como en fermentadores, la bacteria tiende a formar agregados multicelulares, los cuales incrementan en tamaño conforme el cultivo progresa (**figura 1**). Durante las etapas finales de cultivo se han observado agregados de más de 100 micras, los cuales representan hasta 5% de la población total de bacterias. En contraste, bajo condiciones de un mezclado más eficiente (alta velocidad de agitación), la bacteria se desarrolla de manera individual y no se detecta la formación de agregados multicelulares.

³ Galindo, E., “Aspects of the process for xanthan production”, en *Food and Bioproducts Processing*, núm. 72, 227-237, 1994.

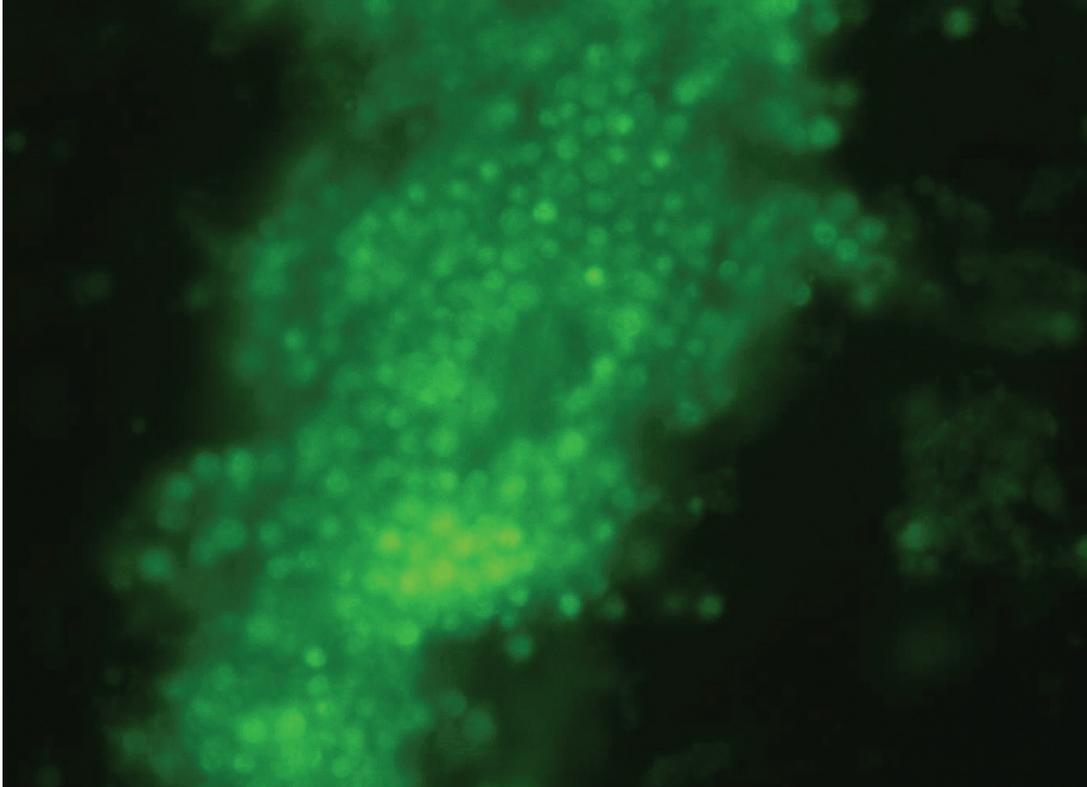


Figura 1.
Agregados multicelulares de *Azotobacter vinelandii*.

Por otra parte, cuando hemos cultivado hongos en fermentadores, hemos encontrado que la viscosidad del caldo es una función de la forma del hongo (generalmente en forma de agregados, constituidos por largas células llamadas *hifas*) y que estas estructuras pueden ser dañadas por la acción de los elementos de agitación. En consecuencia, nuestras investigaciones han permitido establecer, por ejemplo, los valores máximos a los que se puede agitar un sistema, sin dañar las células del hongo, pero manteniendo una alta productividad del producto que nos interese (por ejemplo un antibiótico o un aroma frutal).

El biorreactor bajo la lupa

El fermentador (o biorreactor) tiene dos objetivos primordiales: a) proporcionar oxígeno a las células que se están cultivando en suspensión y b) mantener las condiciones ambientales básicas (como temperatura, oxígeno disuelto y pH) en los niveles que sean óptimos para la producción del metabolito de interés. Para lograr esto, un fermentador típico tiene, en primer lugar, que dispersar un gas (aire, que contiene oxígeno) en un líquido (normalmente agua, en la que se disuelven otros nutrientes esenciales, como azúcares y proteínas). Esto se logra burbujando aire (que ha sido previamente filtrado para evitar introducir contaminaciones al cultivo) dentro del tanque fermentador y dispersando el gas dentro del medio acuoso, mediante el uso de impulsores que rompen las burbujas de gas (que se está inyectando al tanque) en burbujas lo más pequeñas posibles. Lo anterior tiene el propósito de maximizar el área superficial que el gas tiene en contacto con el líquido (para una misma cantidad total de gas, un conjunto de burbujas pequeñas tienen mucho más área que una burbuja grande). Esto es muy importante, ya que mientras el área disponible sea mayor, más fácil y eficiente será transferir el oxígeno de las burbujas de gas al seno del líquido. Hay que tener en cuenta que el oxígeno es un gas muy poco soluble, ya que sólo se pueden disolver, a temperatura ambiente, no más

de 8 mg por cada litro de medio acuoso. En consecuencia, hay que suministrar continuamente aire para satisfacer la demanda de oxígeno del microorganismo. Este proceso se hace más complejo e ineficiente cuando la viscosidad del caldo se incrementa.

Por otra parte, hay ciertos cultivos donde es necesario incorporar una segunda fase líquida (además de la fase acuosa). Éste es el caso, por ejemplo, cuando la fuente de carbono para el microorganismo proviene de un aceite. En vista de que el aceite es insoluble en agua, debe dispersarse, en forma similar a lo que se tiene que hacer con el aire. El reto del bioingeniero es entonces lograr que el aceite se disperse en el mayor número de gotas del menor tamaño posible, con el fin de maximizar el área de transferencia. Así, el microorganismo podrá asimilar los componentes del aceite de una forma más eficiente. En nuestro laboratorio hemos usado, como modelo de estudio de estos sistemas, el proceso de fermentación para la producción de aromas frutales por el hongo *Trichoderma harzianum*. En este caso, la fuente de carbono es aceite de ricino, el cual hay que dispersar, junto con el aire y la biomasa, en la fase acuosa.

Si bien la dispersión del aire y el aceite es un proceso que se lleva a cabo macroscópicamente por los impulsores, al microorganismo lo único que verdaderamente le importa es su microcosmos inmediato. Es por ello que una parte de nuestros esfuerzos de investigación los hemos dedicado a estudiar cómo se comporta un sistema multifásico en el nivel microscópico. Para ello, lo primero que hemos hecho es desarrollar instrumentos que nos permitieran ver lo que estaba pasando dentro del tanque. El principal problema técnico reside en el hecho de que las dispersiones suceden a velocidades muy altas. Para resolver este problema, hemos empleado dos estrategias: usar una luz estroboscópica (esto es, un flash que centellea en una forma muy rápida) o bien usando una cámara que es capaz de tomar hasta 5000 fotos en un segundo. En ambos casos, ello nos permite *congelar* los eventos que suceden a

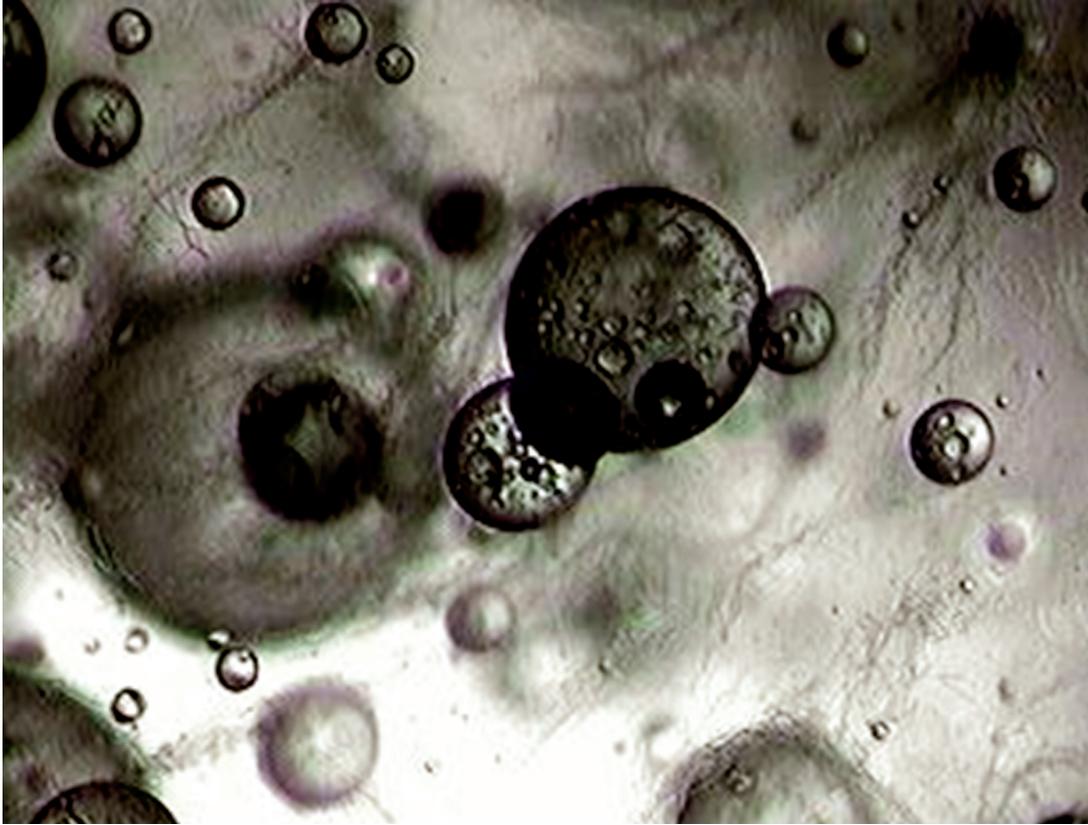


Figura 2.
Burbujas de gas atrapadas en gotas de aceite.

muy alta velocidad y, por lo tanto, fotografiarlos y luego analizarlos. Para ver los elementos de la dispersión (esto es, burbujas de gas y gotas de aceite), empleamos microscopios acoplados a cámaras de video. Usando estos equipos, además de técnicas que nos permiten analizar las imágenes obtenidas en forma automática, hemos podido estudiar y empezar a entender varios de los fenómenos que ocurren en estos sistemas altamente complejos de las fermentaciones multifásicas. Por ejemplo, hemos visto y documentado fenómenos muy interesantes que no se habían reportado antes. Uno de ellos es el hecho de que, bajo ciertas condiciones —por ejemplo la presencia de micelio disperso o pequeñas cantidades de proteínas—, una alta proporción de las burbujas de gas se encuentran atrapadas en las gotas de aceite (**figura 2**). Esto es muy relevante en términos de la transferencia de oxígeno, ya que el oxígeno contenido en una burbuja deberá primero transferirse al aceite (que es 800 veces más viscoso que el agua) para luego migrar a la fase acuosa, que es de donde el microorganismo lo puede aprovechar. Descubrimos también que mientras más biomasa haya, el diámetro promedio de las burbujas disminuye, lo que hace que el área para la transferencia de oxígeno se incremente. Otro fenómeno interesante que observamos es que el agua también se introduce en forma de pequeñas gotitas en las gotas de aceite, lo que hace particularmente complejo el fenómeno de dispersión y de transferencia de oxígeno. Para entender mejor estos fenómenos, hemos usado dos cámaras en forma simultánea (para obtener visión estereoscópica, como la de nuestros ojos), lo que nos ha permitido ver en tercera dimensión estas estructuras y sobre todo determinar sus coordenadas en el espacio (véanse detalles en el capítulo de Gabriel Corkidi), lo que a su vez contribuirá a entender y explicar los fenómenos en la forma como realmente suceden en tres dimensiones, y no sobre lo que se puede inferir del fenómeno de su proyección en dos dimensiones, procedimiento que usan las técnicas fotográficas convencionales.

Producción de alginatos bacterianos: ingeniería de calidad

Desde un punto de vista biotecnológico, los polisacáridos (compuestos formados de la unión de azúcares simples), son productos de valor agregado relativamente alto cuyo rango de aplicaciones se extiende cada vez más. En los últimos años se ha intensificado el interés en el uso de polisacáridos microbianos, principalmente propiciado por las propiedades únicas de estas moléculas (principalmente aquella relacionada con su capacidad como agente viscosificante y formador de geles) y la posibilidad de obtener un producto con altos rendimientos y una calidad constante. Dentro de este contexto, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado al estudio de diversos aspectos de la producción de polisacáridos microbianos, incluyendo a la xantana, cuyo ejemplo discutimos anteriormente y los alginatos, cuya historia contaremos a continuación.

Los alginatos son una familia de exopolisacáridos biológicos constituidos por dos tipos de azúcares: el ácido manurónico (M) y el ácido gulurónico (G). Se obtienen de forma natural de algas marinas y también son producidos por algunas bacterias como *Azotobacter vinelandii*, la cual se desarrolla de forma natural en el suelo y tiene la capacidad de fijar el nitrógeno de la atmósfera. Los alginatos producidos por bacterias difieren de los de origen algal en que los primeros presentan moléculas de acetilo en los residuos del ácido manurónico.

La importancia de los alginatos radica en su capacidad para formar soluciones viscosas y en la formación de geles, propiedades que en buena medida determinan la calidad del producto. Se puede decir que un producto de buena calidad es aquel que se caracteriza por la formación de geles flexibles y resistentes. Además, en la medida que el tamaño de la molécula (medido como el peso molecular) y la proporción de grupos acetilo se incrementan, las soluciones en las cuales se resuspende serán más viscosas. Más recientemente, se ha reportado que alginatos de bajo peso molecular (oligómeros) presentan propiedades inmunológicas impor-

tantes, por lo que ha despertado el interés de la industria bioquímica en desarrollar procesos de optimización en su producción.

Una de las desventajas de los alginatos que se obtienen de las algas es su alta heterogeneidad, ya que presentan un amplio rango de pesos moleculares y distribución de sus azúcares (G-M). Estas características son prácticamente imposibles de controlar en los procesos actuales, los cuales son altamente dependientes de las condiciones ambientales en las cuales crecen las algas, que a su vez definen las características químicas de estos polímeros. En este sentido, los alginatos que se obtienen por fermentación bacteriana representan una opción atractiva para la síntesis de productos con características moleculares específicas, que puedan ser orientados para su uso en el área químico-farmacéutica.

Nuestro grupo de investigación ha estado interesado en el entendimiento de los factores del cultivo de *Azotobacter vinelandii* que determinan la cantidad y sobre todo la calidad del alginato producido por la bacteria con el propósito de mejorar el proceso biotecnológico y lograr eventualmente hacerlo competitivo en términos industriales. Principalmente, hemos estudiado los efectos de parámetros de cultivo, como el oxígeno disuelto, el bióxido de carbono, el mezclado, componentes de medio de cultivo, así como la evaluación de diferentes cepas mutantes con mejores características para producir alginato. Además, hemos estudiado diferentes estrategias para poder llevar el proceso de una escala de laboratorio a un nivel de producción mayor. Una de las aportaciones más relevantes de nuestro grupo es haber demostrado cómo la concentración de oxígeno en el medio de cultivo, así como la velocidad a la que crecen los microorganismos, determinan de manera importante el tamaño y distribución de las moléculas de alginato que se producen.⁴ Hay que recordar que el peso mole-

cular impacta directamente en la viscosidad de las soluciones y, por lo tanto, en la calidad del producto. Hemos encontrado también que la manipulación de los componentes del caldo de cultivo, particularmente aquellos que se usan como reguladores del pH del medio, influyen en el porcentaje de grupos acetilos presentes en la molécula, impactando directamente en las propiedades viscosificantes de las soluciones de alginato. El conocimiento generado en nuestro grupo abre nuevas posibilidades en el diseño de procesos para producir alginatos hechos a la medida, y por lo tanto de alta calidad y valor agregado, los cuales puedan ser usados en aplicaciones específicas en diversos sectores industriales.

El estrés y los hongos: el lado positivo

Todo organismo vivo colocado fuera de su hábitat natural experimenta condiciones ambientales que limitan su crecimiento. Un caso particular es el cultivo de células en biorreactores, donde las condiciones de cultivo no son necesariamente homogéneas (dentro del biorreactor) ni constantes (a través del tiempo). Durante el cultivo de células en biorreactores se producen cambios en el medio ambiente en cuanto a la temperatura, daños mecánicos debidos a la agitación, pH, concentración de oxígeno y nutrientes, etc. Todos estos cambios dentro del biorreactor “estresan” a las células que necesitan adaptarse a dichos cambios para poder reproducirse. De manera general, se puede decir que todo factor que influye negativamente en la capacidad de reproducción de las células puede considerarse como estrés. Durante un cultivo, las células consumen nutrientes para poder reproducirse. Cuando la concentración de alguno o varios nutrientes disminuye de tal forma que la velocidad de reproducción de las células también disminuye, hablamos de un estrés de tipo nutricional. Dependiendo

⁴ Galindo, E., et al., “Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*”, en *Microbial cell factories*, 6,7:1-16, 2007.

de la magnitud y la duración del estrés, éste puede considerarse como subletal, cuando las células son capaces de reproducirse, aunque a una menor velocidad, o letal, cuando el daño es tan importante que las células mueren. La gran mayoría de los metabolitos de origen fúngico de uso industrial son metabolitos secundarios; es decir, se producen una vez que el crecimiento celular disminuye o cesa. Así, los factores de estrés son herramientas muy importantes para el bioingeniero ya que le permiten controlar tanto el crecimiento como la producción de metabolitos secundarios y, en consecuencia, la productividad de los cultivos de hongos filamentosos. Entre los metabolitos secundarios más importantes producidos industrialmente por los hongos están los antibióticos (como la penicilina) y las enzimas (catalizadores biológicos muy utilizados en la industria).

El cultivo del hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* (figura 3), para la producción de la 6-pentil- α -pirona (6PP), un fungicida de amplio espectro, es nuestro modelo de estudio para comprender el efecto de los factores del estrés sobre la producción de metabolitos secundarios en cultivos fúngicos.⁵ El principal problema tecnológico para desarrollar un proceso económicamente viable para la producción de 6PP ha sido la toxicidad de la molécula hacia el hongo productor (*Trichoderma harzianum*), hablamos entonces de un estrés químico. Para solucionar este problema adicionamos un aceite (n-hexadecano) al medio de cultivo para extraer de manera continua la molécula que es poco soluble en el medio de cultivo (donde crece el hongo) y muy soluble en el aceite. Esto nos permitió incrementar la producción de la 6PP por arriba de su concentración tóxica, indicando que la adición de hexadecano permitió “liberar” al hongo de este estrés químico. Con este sistema de extracción se inició el estudio de un factor de estrés de tipo biológico sobre la producción del

antibiótico. En este caso se aprovechó la característica de *Trichoderma harzianum* de ser un hongo depredador de otros hongos. Debido a que la producción de la 6PP por *Trichoderma* es uno de sus mecanismos de ataque hacia otros hongos, llevamos a cabo cultivos donde *Trichoderma* es confrontado con *Rhizoctonia solani* (hongo fitopatógeno del tomate). En este caso demostramos que, en presencia de células muertas de *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma* incrementa hasta cinco veces su producción de 6PP.

El crecimiento de los hongos se lleva a cabo en forma de largas cadenas celulares que forman una red tridimensional compleja llamada micelio (similar a la que podemos observar en las raíces de plantas). Por esta razón los hongos cultivados en medio líquido, donde se utiliza agitación mecánica, pueden sufrir ruptura celular si la energía introducida por la agitación es mayor que la resistencia del micelio. A este tipo de estrés se le conoce como hidrodinámico. En vista de que las condiciones hidrodinámicas (es decir la velocidad y la dirección con que el medio de cultivo es mezclado) dentro del biorreactor juegan un papel muy importante en el crecimiento y el metabolismo de los cultivos de hongos, hemos estudiado el efecto de este estrés (generado por la agitación) sobre el crecimiento y la producción de 6PP por *Trichoderma harzianum*. Nuestro grupo demostró que el estrés hidrodinámico permite modular el crecimiento y metabolismo secundario del hongo. En condiciones de bajo estrés (baja agitación) el hongo crece pero produce muy poca 6PP. Al incrementar el estrés (agitación moderada) se obtuvo un menor crecimiento pero una mayor producción de la 6PP. En este contexto, la producción de la 6PP es estimulada cuando el microorganismo se encuentra en una situación de estrés (limitación del crecimiento) hidrodinámico moderado, pero evitando un estrés letal a altas velocidades de agitación.

⁵ Serrano-Carreón, L. “Improving biogenesis of aroma compounds by *in situ* product removal”, en *Food Science and Food Biotechnology*, EUA, CRC Press, pp. 219-232, 2003.

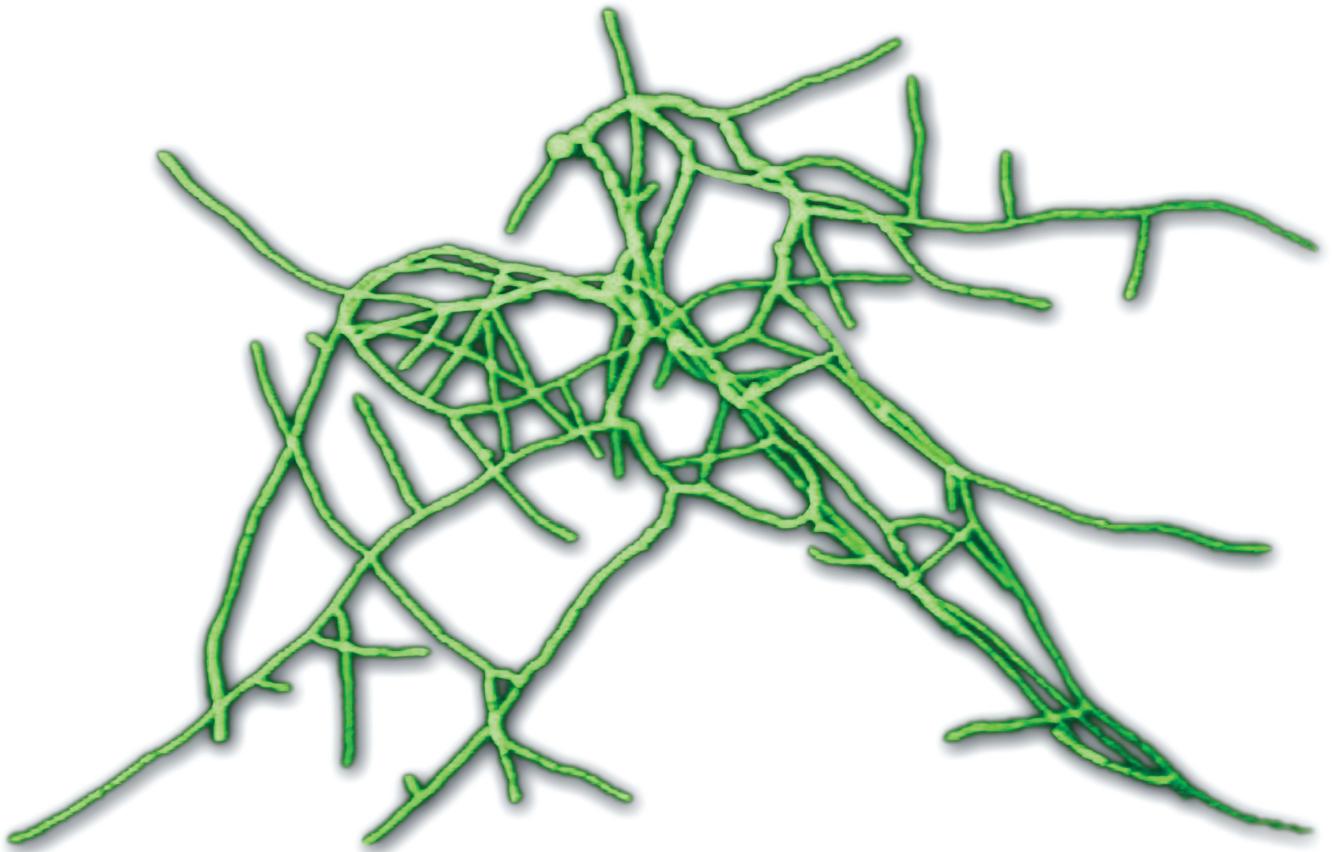


Figura 3.
Hongo filamentoso *Trichoderma harzianum*.

Estamos estudiando también la interacción de *Trichoderma* con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, como una estrategia para incrementar la producción de lacasas por éstos últimos. Las lacasas son enzimas que degradan la lignina de los tejidos vegetales, lo que permite el crecimiento de estos hongos comestibles sobre residuos agrícolas. Estas enzimas son útiles en la degradación de compuestos tóxicos, como son los residuos petroleros, pesticidas y colorantes. En este caso, *Agaricus bisporus* o *Pleurotus ostreatus* al ser atacados por *Trichoderma* producen lacasas como un mecanismo de defensa. Hemos demostrado que los cocultivos de *Trichoderma* con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* no sólo incrementan la producción de lacasas, también generan la producción de otros tipos de lacasas no obtenidas en los cultivos de *Agaricus bisporus* o *Pleurotus ostreatus*.

Guerra biológica a favor del ser humano

En la agricultura comercial contemporánea el combate de plagas y enfermedades es un problema muy importante; esta actividad llega a representar hasta 20% del costo de producción o más, dependiendo de la severidad del daño ocasionado a los cultivos. Si bien el control químico ha sido durante muchas décadas el método más utilizado para combatir las plagas (depredadores, *i.e.* insectos) y enfermedades (*i.e.* hongos) en la agricultura; el empleo intensivo (y a veces desmedido) de productos químicos ha tenido efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida de las poblaciones humanas. Además, su eficacia puede ser de corta duración, ya que las plagas y los patógenos pueden desarrollar resistencia; es decir, evolucionan para sobrevivir en presencia de estos compuestos. En las últimas dos décadas, se ha dedicado un gran esfuerzo de investigación en la implementación de sistemas de control

biológico de plagas y enfermedades que sean amigables con el medio ambiente y sin riesgos para la salud humana. El control biológico es el uso de organismos (y/o sus metabolitos o subproductos), que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas y/o sus productos. Es decir, se hace uso de la existencia de los depredadores naturales de las plagas o patógenos. Así, la lucha biológica entre los organismos nocivos para los cultivos agrícolas y sus depredadores naturales es el principio básico del control biológico. El desarrollo y la aplicación de este potencial de la naturaleza cobran cada vez mayor importancia y seguramente tendrán un gran impacto en la agricultura en el futuro cercano. Hemos trabajado, desde hace varios años, en el desarrollo de procesos de producción, formulación y secado de microorganismos antagonistas de hongos fitopatógenos que atacan algunos de los cultivos agrícolas de mayor relevancia en México: el mango y el jitomate.

México es uno de los principales productores y el primer exportador de mango del mundo. Una de las enfermedades postcosecha más importantes que afectan al mango es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, el cual daña la calidad (produce manchas negras) y disminuye significativamente la vida de anaquel (tiempo de comercialización) del producto. En colaboración con investigadores del CIAD-Culiacán se aislaron, seleccionaron e identificaron diferentes microorganismos (bacterias y levaduras) con actividad antagonista contra la antracnosis en mango.⁶ Se diseñaron medios de cultivo con componentes de bajo costo que permitieron lograr cultivos de los antagonistas con un alto rendimiento, viabilidad y productividad. Se desarrollaron procesos de fermentación sumergida, formulación y secado para la producción masiva de células viables de cada una de las cepas. Los resultados

⁶ Galindo, E., *et al.*, "Tecnologías para el control biológico de la principal enfermedad del mango (antracnosis) y el efecto en su calidad poscosecha", en *Claridades Agropecuarias*, núm. 148, pp. 56-59, 2005.

de las pruebas de campo mostraron que los antagonistas utilizados lograron disminuir la gravedad de la enfermedad (antracnosis) a niveles inferiores a los logrados con el uso de un fungicida químico. Otro aspecto de gran importancia radica en el hecho de que los formulados biológicos retrasan la maduración del fruto, alargando su vida de anaquel hasta en 25%, sin afectar sus propiedades organolépticas. Esto ofrece la posibilidad al productor de exportar sus frutos a mercados más lejanos y con mayor precio de comercialización.

Otra de las enfermedades agrícolas que genera pérdidas económicas importantes en México es la fusariosis del jitomate, produci-

da por el hongo *Fusarium oxysporum*. Nuestro grupo ha desarrollado procesos para la producción, formulación y secado de *Trichoderma harzianum*, un hongo depredador de *Fusarium oxysporum*, para la obtención de un producto con alta concentración de células viables de *Trichoderma*. La evaluación en campo del producto demostró que el producto biológico es capaz de competir con fungicidas químicos para el control de la fusariosis del jitomate. Sin embargo, el resultado más importante de esta evaluación de formulaciones es que el producto biológico permite obtener frutos de mejor calidad (tamaño), los cuales son particularmente atractivos para el mercado de exportación. ●

