

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA



**“OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACION DE UN BIORREACTOR
PARA LA PRODUCCION DE ÁCIDO INDOLACÉTICO”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

OSCAR ANTONIO RAMIREZ MEDINA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO AMILCAR SOLÍS DOMÍNGUEZ

CO-DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ASENETH HERRERA MARTÍNEZ

MEXICALI, B.C., 9 DE AGOSTO DE 2019

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Resumen.....	85
2. Introducción.	107
3. Marco teórico.	129
3.1. Hormonas de crecimiento en plantas.	1240
3.2. Auxinas y producción de ácido indol acético (AIA).....	1340
3.3. Bacterias aisladas de ambientes extremos.	1344
3.3.1. Clasificación de microorganismos extremófilos	1444
3.4. Biorreactores.....	1442
4. Antecedentes.....	1744
5. Planteamiento del problema.	2320
6. Justificación.	2421
7. Objetivos de la investigación.....	2522
7.1. Objetivo general:	2523
7.2. Objetivos específicos:	2523
8. Hipótesis.	2623
9. Metodología.	2724
9.1. Efecto de la inoculación de aislados microbianos en plantas de maíz. Experimento DOE 1.	2725
9.1.1. Procedimiento de desinfección de las semillas de maíz.....	2826
9.1.2. Preparación de las macetas.	2927
9.1.3. Riego de las macetas.	3028
9.1.4. Determinación cualitativa y cuantitativa de AIA producido por los aislados bacterianos en medio King B.....	3129

9.1.5.	Curva de calibración de AIA y medición de la concentración.	3230
9.1.6.	Curva de calibración de McFarland y conteo de células bacterianas. 3334	
9.2.	Selección de factores de optimización para biorreactor. Experimento DOE2.	3432
9.2.1.	Matriz de diseño de experimento DOE2.	3533
9.2.2.	Preparación del medio de cultivo.	3735
9.2.3.	Preparación del inoculante microbiano.	3735
9.2.4.	Cuantificación de AIA producido a nivel matraz por los aislados bacterianos.	3836
9.3.	Operación del biorreactor New Brunswick.	4038
9.3.1.	Volúmenes de operación de trabajo del biorreactor.	4038
9.3.2.	Esterilización del biorreactor.	4139
9.3.3.	Sistema de control del biorreactor.	4240
9.3.4.	Oxígeno Disuelto en el biorreactor.	4344
9.3.5.	Evaluación de las muestras del biorreactor.	4442
9.3.6.	Inoculación del biorreactor.	4543
9.3.7.	Aditivos para el biorreactor.	4644
9.3.8.	Calibración de los sensores de pH, OD y nivel.	4644
9.3.9.	Secuencia de preparación y operación del biorreactor New Brunswick. 4846	
9.3.10.	Toma y análisis de muestras.	5553
10.	Resultados.	5755
10.1.	Medición de curva de crecimiento microbiano.	5755
10.2.	Resultados de experimento DOE 1.	5856
10.2.1.	Evaluación del crecimiento de las plantas de maíz.	5856

10.3. Resultados de experimento DOE 2.....	6364
10.3.1. Resultados de DOE2 para la toma de decisión de corrida en biorreactor.....	6364
11. Conclusiones.	6967
12. Referencias.....	7068

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biorreactor New Brunswick.	11
Figura 2. Molécula de AIA	12
Figura 3. Biorreactor.....	16
Figura 4. Procedimiento de desinfección de semillas.....	28
Figura 5. Inoculación de bacterias en plantas.	29
Figura 6. Reactivo Salkowski.	31
Figura 7. Medio King B positivo a AIA.	31
Figura 8. Espectrofotómetro BioRad.	32
Figura 9. Tonalidades de las diferentes concentraciones de la curva de calibración de AIA.	32
Figura 10. Curva de calibración de AIA.....	33
Figura 11. Curva de calibración de McFarland.....	34
Figura 12. Viales de experimento DOE2 corrida #A.....	36
Figura 13. Bacteria 5.b.3.	38
Figura 14. Inóculos bacterianos en medio King B.	38
Figura 15. Matraces inoculados.	39
Figura 16. Viales centrifugados.	39
Figura 17. Filtrado del sobrenadante.....	39
Figura 18. Reacción de AIA por reactivo Salkowski.	40
Figura 19. Preparación de medio King B en biorreactor.....	48
Figura 20. Control, preinóculo e inóculo bacteriano.	49
Figura 21. Biorreactor en autoclave.	50
Figura 22. Biorreactor en proceso de aireación y agitación.	51
Figura 23. Conexión de mangueras en los puertos para aditivos.....	51
Figura 24. Proceso de desarmado y limpieza de biorreactor.	53
Figura 25. Correcta colocación de soporte de la tapa del biorreactor.	53
Figura 26. Biorreactor limpio.	54
Figura 27. Configuración de conexiones para biorreactor.....	54

Figura 28. Toma de muestra en biorreactor.	55
Figura 29. Determinación de la concentración bacteriana.	56
Figura 30. Determinación de la concentración de AIA.	56
Figura 31. Curva de crecimiento microbiano del aislados bacteriano 1.	58
Figura 32. Altura máxima de planta.....	59
Figura 33. Diámetro de tallo de planta.	60
Figura 34. Biomasa de planta húmeda.....	60
Figura 35. Biomasa de hojas secas.	61
Figura 36. Longitud de raíz.....	62
Figura 37. Biomasa de raíz seca.....	62
Figura 38. Perfiles de factores vs tiempo para corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).....	67
Figura 39. Concentración bacteriana vs tiempo de corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).....	68
Figura 40. Concentración de AIA vs tiempo de corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).....	68
Figura 41. Chiller auxiliar.....	81
Figura 42. Sistema de filtrado de aire.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de microorganismos extremófilos.....	14
Tabla 2. Descripción de figura 3 Biorreactor.	15
Tabla 3. Principales eventos utilizando biorreactores a través de la historia	17
Tabla 4. Solución nutritiva concentrada Long Ashton.	30
Tabla 5. Calibración de AIA.....	3332
Tabla 6. Valores de curva de calibración de McFarland.....	33
Tabla 7. Matriz de diseño de experimento DOE2 en viales.....	3635
Tabla 8. Formulación de medio King B.	37
Tabla 9. Configuración de conexiones para biorreactor.	55
Tabla 10. Valores de la curva de crecimiento bacteriano.....	57
Tabla 11. Absorbancias a 530 nm para la concentración de AIA.....	63
Tabla 12. Concentración de AIA µg/mL en tubos de plástico de 15 ml.	64
Tabla 13. Muestras de corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).....	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. ANOVA de Experimento DOE 1	74
Anexo 2. Actividades auxiliares de instalación de biorreactor.....	80

1. Resumen.

Existen microorganismos, asociados a las raíces de las plantas, capaces de secretar sustancias que promueven el crecimiento de las plantas a las que están asociados; tal es el caso del ácido indolacético (AIA) que es un tipo de auxina (hormona de crecimiento vegetal). La presente propuesta de investigación tuvo como objetivo principal la optimización de los parámetros de operación de un biorreactor marca New Brunswick modelo BF115-2116354 en la producción de ácido indolacético de origen microbiano.

Diferentes microorganismos aislados previamente por este grupo de trabajo, a partir de muestras de suelo rizosférico y no rizosférico de un ambiente extremo en el municipio de Mexicali B. C., son capaces de producir AIA en medio King B bajo condiciones de laboratorio. Por esta razón se consideran a estos microorganismos con un gran potencial biotecnológico para ser aplicados en los cultivos de la región.

Durante esta tesis se realizaron dos experimentos principales. El primer experimento (DOE1) se enfocó en la validación en maceta de la aplicación los aislados bacterianos a la rizosfera de plantas de maíz para determinar los efectos sobre su crecimiento de altura, diámetro de tallo, biomasa húmeda y seca, longitud de las raíces.

El segundo experimento (DOE2) se dirigió a la selección de los factores de optimización del biorreactor New Brunswick para producir biomasa bacteriana productora de AIA. Se seleccionó un diseño de experimento factorial completamente al azar 4x2x2 balanceado con k=3 factores: pH (7, 8, 9, 10), Temperatura (32 °C y 40°C) y velocidad de agitación (150 y 250 rpm) con 3 repeticiones de cada muestra para evaluar los 5 aislados bacterianos. En una primera etapa se corrieron 240 unidades experimentales en viales de 15 ml en

incubadoras con agitación MaxQ 4000 de Termo Fisher Scientific, solo los mejores resultados de producción del AIA se corrieron en el Biorreactor New Brunswick para buscar los parámetros de optimización de la producción de AIA.

2. Introducción.

La producción de moléculas derivadas del metabolismo celular microbiano (proteínas, aminoácidos, compuestos orgánicos, alcoholes, solventes, antibióticos, entre otros) ha cobrado importancia en las últimas décadas, debido a que teóricamente los microorganismos pueden producir todos los metabolitos presentes en sus redes de trabajo metabólicas y a que muchas de estas biomoléculas tienen aplicaciones en la industria.

Mediante el empleo de biorreactores, donde se llevan a cabo de manera aséptica y controlada las transformaciones bioquímicas microbianas necesarias para la generación de alguna biomolécula en la producción de productos generados por el metabolismo microbiano (Bhattacharyya et al., 2008; Pandey et al., 2008). Para ello debe considerarse la medición de variables relevantes en el control del bioproceso, tales como oxígeno disuelto, concentraciones, mezclado, transferencia de calor, temperaturas, control de pH, suministro de nutrientes y/o reactivos (Perry, 2003), pues esto permite mantener dentro de un intervalo adecuado los parámetros críticos y así garantizar la reproducibilidad del bioproceso y optimizar el objetivo a alcanzar dentro del biorreactor.

En esta investigación se establecieron los parámetros de operación y control para la producción por lote de ácido indolacético (AIA) de origen microbiano, el cual es una fitohormona del grupo de las auxinas: moléculas cruciales en muchos procesos del desarrollo vegetal, tal como crecimiento, tropismo, enraizamiento de esquejes, diferenciación vascular, etc. (Celis y Gallardo 2008). Existen microorganismos que producen este tipo de fitohormonas conocidos como microorganismos promotores del crecimiento de plantas, ya que logran un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de una planta. Este tipo de microorganismos actúa de distintas maneras: 1) promueven el crecimiento proveyendo a las plantas de nutrientes como N, P, K, Fe) modificando los niveles de hormonas en la planta a través de la producción de enzimas como la ACC deaminasa y/o la producción de ácido indol acético y 3) convirtiéndose en agentes de control biológico para las plantas (Meena et al., 2013).

En el laboratorio de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería de la UABC Mexicali, se han aislado y seleccionado bacterias capaces de producir auxinas en condiciones in vitro (López 2015; Saldaña, 2016). Sin embargo, se desconocen los valores de los parámetros necesarios para escalar el proceso de producción de estas biomoléculas de nivel matraz a nivel biorreactor en cultivos por lote.

Las pruebas de crecimiento de microorganismos y producción de AIA en condiciones de laboratorio es fundamental para la determinación de las variables de operación del biorreactor. Como primera etapa se estableció la operación técnica apropiada de un biorreactor New Brunswick de 7.5 L., (Fig. 1). Como segunda etapa se seleccionó el microorganismo que se desarrolló en el biorreactor para ejecutar diferentes pruebas de operación.

La modificación de las condiciones o variables ambientales durante el crecimiento de microorganismos en un biorreactor controlado permitieron obtener las variables óptimas del desarrollo del proceso.



Figura 1. Biorreactor New Brunswick.

3. Marco teórico.

3.1. Hormonas de crecimiento en plantas.

Entre los microorganismos, las bacterias tienen especial importancia en la relación suelo-planta y son responsables del incremento o disminución en el suministro de nutrientes como también en la producción de factores de crecimiento (fitohormonas); algunas bacterias se destacan por su potencial como biofertilizantes debido a que son capaces de producir sustancias promotoras de crecimiento vegetal que inciden grandemente en el rendimiento y en la calidad de los cultivos.

Estudios realizados han demostrado que ciertas poblaciones de bacterias además de fijar nitrógeno también segregan sustancias promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquinas), las cuales benefician a la planta en una forma multidimensional. Las hormonas promotoras del crecimiento vegetal como lo es la auxina: Acido Indol Acético (AIA) (Fig. 2) induce la deformación y aumento de pelos radiculares, logrando con esto mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos.

Se ha establecido que las rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal (plant-growth promoting rhizobacteria, PGPR), juegan un papel primordial en los cultivos permitiendo disminuir la utilización de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento, acortar ciclos y, por consiguiente, reducir la contaminación ambiental. Las bacterias representan una alternativa para mejorar el aporte nutricional de las plantas; dentro de los efectos benéficos se destacan la secreción de reguladores de crecimiento de plantas como auxinas mejorando los procesos de germinación de semillas, nutrición, desarrollo de raíces, etc. (Lara et. al, 2011).

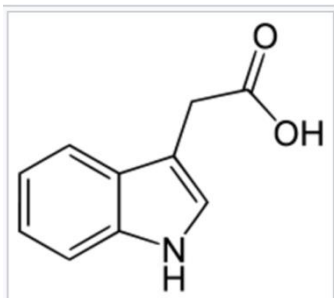


Figura 2. Molécula de AIA

3.2. Auxinas y producción de ácido indol acético (AIA).

Las auxinas son un grupo derivado del triptófano, sintetizados por lo general en los ápices de las plantas y están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Se sabe que participan en la regulación de algunos procesos que ocurren en los tejidos vegetales como el crecimiento celular, estimulación del crecimiento del tallo, el inicio de la división celular, la formación de tejidos no diferenciados (tejido calloso), la diferenciación del tejido vascular y la formación de organelos (raíces, flores y frutos). En plantas, las auxinas tienen que ver con la dominancia apical. La auxina natural más común es el ácido Indol-3-acético (AIA) (Román, 2003).

Muchas plantas superiores crecen más por alargamiento celular que por proliferación celular, el tamaño y forma de la planta está determinada primeramente por la cantidad y dirección de ese alargamiento. El nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación (Mc. Dougall y Hillman, 1978).

3.3. Bacterias aisladas de ambientes extremos.

Los microorganismos extremófilos que son capaces de sobrevivir y crecer óptimamente a temperaturas por debajo de los 10 °C y por encima de los 50 °C, a valores de pH por debajo de 5.0 y por encima de 8.0, a una presión mayor a 1 atm y a concentraciones de sal mayores a 30 g/L son definidos como microorganismos extremófilos.

Los extremófilos son encontrados en áreas geotermales con altas temperaturas, regiones polares con temperaturas alrededor del punto de congelación del agua, en la profundidad de los océanos con muy alta presión y en manantiales ácidos con bajo a alto pH, respectivamente (Constantinos y Antranikian, 2004).

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron aislados de un suelo árido con pH de 9.3, conductividad eléctrica de hasta 43 mS/cm y con bajo contenido de materia orgánica (0.18 %) (Saldaña, 2016).

3.3.1. Clasificación de microorganismos extremófilos

Los organismos extremófilos dependiendo de la condición extrema bajo la cual estén sometidos constituyen varios grupos fisiológicos conocidos como barófilos, alcalófilos, acidófilos, halófilos, psicrófilos, termófilos e hipertermófilos (Mose et al., 2002) Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de microorganismos extremófilos.

EXTREMOFILOS	MINIMO	OPTIMO	MAXIMO
Termófilos		> 50°C	> 60°C
Termófilos extremos	> 35°C	≥ 65°C	> 70°C
Hipertermófilos	> 60°C	≥ 80°C	> 85°C
Acidófilos	pH > 0	2.5 ≤ pH ≤ 3.0	
Alcalinotolerantes		pH < 8.5	pH ≥ 9.0
Alcalófilos		pH < 8.5	pH ≥ 10
Halófilos tolerantes		2% ≤ NaCl ≤ 5%	
Halófilos moderados		5% ≤ NaCl ≤ 20%	
Halófilos extremos		20% ≤ NaCl ≤ 30%	
Psicrófilos	= 0°C	< 25-30 °C	
Barófilos	>0.1 MPa	= 10-50 MPa	⊖ 100 MPa

Fuente: Weigel 1998, citado por Olliver et al., 2000.

3.4. Biorreactores.

El diseño de reactores y la cinética química constituyen la base de producción de casi todos los productos químicos industriales. La cinética química es el estudio de las velocidades de reacción químicas y los mecanismos de reacción. En el estudio de la ingeniería de las reacciones químicas, se combina el estudio de la cinética química con los reactores en los cuales se llevan a cabo dichos procesos (Fogler, 2008).

Un biorreactor es un reactor en donde se llevan a cabo las reacciones biológicas de células, tejidos y microorganismos. La importancia del uso de microorganismos para sintetizar productos químicos comerciales aumenta cada vez más. La cantidad de productos químicos, agrícolas y alimenticios que se obtienen por biosíntesis se ha incrementado significativamente (Fogler, 2008).

Antiguamente se utilizaba el término fermentador para referirse a un biorreactor (reactor biológico), pero actualmente el término se ha extendido también a los procesos aerobios. Los procesos biológicos son usualmente asépticos y tiene lugar en recipientes mantenidos a una presión positiva de aire estéril para evitar la entrada de microorganismos contaminantes e impedir el deterioro de la calidad del producto.

Las actividades asociadas con reactores biológicos incluyen la medición de gases como el oxígeno disuelto, concentraciones, el mezclado, la transferencia de calor, temperatura, el control de pH, la alimentación de nutrientes y reactivos (Perry, 2003).

El principal biorreactor de la industria es el biorreactor discontinuo o por lotes (Fig. 3), tabla 2.

Tabla 2. Descripción de figura 3 Biorreactor.

A	Motor de agitación.	K	Paleta para romper la espuma.
B	Unidad de reducción de velocidad.	L	Salida del agua de refrigeración.
C	Entrada de aire.	M	Deflector.
D	Salida de aire.	N	Serpentines refrigerantes.
E	Válvula de circulación de aire.	O	Entrada de agua de refrigeración.
F	Cierre del eje.	P	Mezclador.
G	Mirilla de vidrio con luz.	Q	Difusor.
H	Tubería para limpiar la mirilla.	R	Punto de apoyo y soporte del eje.
I	Boca de hombre con mirilla.	S	Salida.
J	Eje del agitador.	T	Válvula de muestreo.

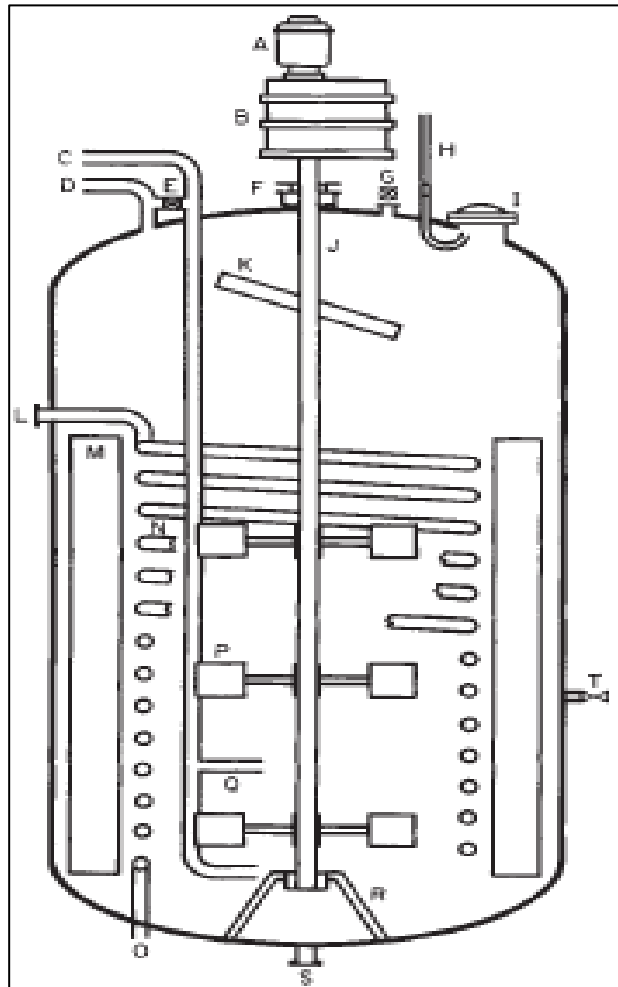


Figura 3. Biorreactor

El metabolito seleccionado en este proyecto fue el ácido indolacético, el cual es una fitohormona del grupo de las auxinas.

Las auxinas desempeñan un papel crucial en muchos procesos del desarrollo vegetal, tal como crecimiento, tropismo, enraizamiento de esquejes, diferenciación vascular, etc. (López, 2015, Saldaña, 2016).

4. Antecedentes.

En la actualidad y con el avance en el campo de la biotecnología los biorreactores son importantes en los distintos campos de la industria e investigación. Se mencionan los antecedentes más relevantes.

Los biorreactores tienen origen e importancia temprana en la historia. Tabla 3.

Tabla 3. Principales eventos utilizando biorreactores a través de la historia

AÑO	EVENTO
4000-3000 A.C.	Horneado, Cerveceros
2000 A.C.	Producción de etanol y destilación (China)
1923	Producción comercial de ácido cítrico (Pfizer, USA)
1940s	Producción de Penicilina por fermentación (USA)
1950s	Diseño y escalamiento de grandes fermentadores aireados
1970s	Se crearon más de 100 medicamentos y vacunas producidas por bioprocesos
1980s	Se logra el control de los biorreactores por lote alimentado

Fuente: Heinzle et. al, 2006; Dochain, 2008.

Antes del año 500 a.C. los Babilonios producían cerveza en tanques que tenían la función de un biorreactor y de igual manera un caso similar para el vino. Desde entonces fue comprendida la importancia de los componentes del ambiente y las condiciones de operación del reactor. Esto permitió producir pan y quesos con levaduras en Egipto hace más de 3000 años (Schaechter, 2004).

La bacteria *Azospirillum brasilense* metaboliza el triptófano y produce diversos metabolitos; entre ellos el ácido indol acético. La bacteria *A. brasilense* se ha utilizado con éxito como inoculante de gramíneas y, concretamente, en la región noreste de México en el Estado de Tamaulipas en los cultivos del maíz y el sorgo donde se ha demostrado que incrementa los rendimientos de grano hasta un 36% respecto a plantas no inoculadas. *A. brasilense* es capaz de metabolizar el

triptófano (TRP) y sintetizar, a partir de él, compuestos tales como el ácido indol acético (AIA). El AIA se detecta durante el crecimiento de cultivo bacteriano por la activación del gen *ipdC* que se activa en presencia del TRP. La ausencia del TRP induce la producción del AIA, mismo que sólo se observa durante la etapa tardía de la fase estacionaria. La mutación de los genes *ipdC* y *trpD* de *A. brasilense* cepa SP7 inducen a que la bacteria utilice varias rutas metabólicas para la síntesis de indoles y, en especial, AIA a partir del TRP (Hernández et al., 2008).

Se investigaron los efectos de diferentes concentraciones de auxina y combinaciones de auxina / citoquinina, tamaños de inóculo y diluciones de los medios Murashige y Skoog (MS) sobre la biomasa y la acumulación de fenoles totales y flavonoides en las raíces adventicias de *Hypericum perforatum*. Las condiciones optimizadas para el crecimiento del cultivo en matraz de agitación y la producción de metabolitos secundarios fueron de 0.1 mg/L de kinetina con 1 mg/L de ácido indol-3-butírico (IBA), una densidad de inóculo de 6 g/L de peso fresco y medio MS en los cultivos de 5 semanas. Al inocular 6 g/L de raíces adventicias en un biorreactor de burbujas de tipo globo de 3 L (BBTB) que contiene medio MS complementado con 0.1 mg/L de kinetina con 1 mg/L de IBA, se cosecharon 104.2 g/L de raíces adventicias que contenían 56.47 ± 0.22 mg/g de peso seco fenólicos totales, 35.01 ± 1.26 mg/g de flavonoides, 0.97 ± 0.06 mg/g de ácido clorogénico y 1.389 ± 0.80 mg/g de hipericina. Los resultados de este estudio contribuyeron a la optimización y el desarrollo de la tecnología de biorreactores para cultivos de raíces adventicias de *H. perforatum* para la producción de hipericina. (Xi-Hua et al., 2010).

La *Tylophora indica* es tradicionalmente usada como una planta medicinal para el tratamiento de bronquitis, asma, alergias e inflamación. La efectividad del tipo y concentración de auxinas tales como el ácido indol acético AIA, ácido Indol-3 butírico AIB y ácido naftalen acético ANA, sobre la inducción de raíces adventicias y hojas de la *Tylophora indica* fueron probados en medios de cultivos Murashige y Skoog (MS). El resultado indicó que la mejor auxina fue AIA en una óptima

concentración de 1 mg/L. Este estudio reportó el primer éxito de la inducción de raíces adventicias de la *Tylophora indica* lo cual promete un alto potencial de un gran escalamiento de producción comercial en un biorreactor para la industria farmacéutica (Rashmi et al., 2012).

La importancia comercial de la linaza (*Linum unitatissimum* L.) ha atraído a los productores a incrementar la producción de semilla usando varios enfoques de producción. Los reguladores del crecimiento de las plantas (Plant growth regulators PGRs) tienen un papel significativo en el mejoramiento de la producción y de las características de la linaza. Dos hormonas del crecimiento de plantas, auxina y ácido giberélico, fueron aplicados individualmente, así como también en combinaciones, en orden para estudiar su efecto en la producción y sus componentes en “Neelam” que es una variedad de alto rendimiento de linaza. Se realizó un estudio comparativo bajo condiciones de matraz y de campo. Una dosis combinada de auxina (1.0 mg/L) y giberelina (200 mg/L) es recomendada para la mejora de la producción de la semilla, mientras que una dosis de 0.5 mg/L de auxina es recomendada para el mejoramiento del crecimiento vegetal. Se concluyó que los reguladores del crecimiento de la planta pueden ser exitosamente empleados para mejorar este importante cultivo de semilla (Rastogi et al., 2013).

En estudios previos realizados en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral y Regional – Sinaloa (CIIDIR-Sinaloa) del IPN, se aisló de la rizosfera de tomate una cepa de *Bacillus circulans* E9, la cual sobresale por producir 10.3 µg/mL de AIA y es capaz de promover el crecimiento vegetal particularmente de plantas de frijol. Esta bacteria fue cultivada en medios microbiológicos de laboratorio a nivel matraz, sin embargo, es deseable su producción masiva a nivel biorreactor (Sarmiento, 2014).

Se han realizado estudios para generar la optimización de las condiciones de producción de raíces de plantas como la *Eurycoma longifolia* Jack, que es una

importante planta leñosa medicinal para la cual se ha diseñado un cultivo en biorreactor. Los efectos y tipos de auxinas en el crecimiento de la raíz fueron estudiados, así como los efectos de iones amonio, nitratos y las velocidades de crecimiento de la producción de fenólicos y flavonoides. El estudio se llevó a cabo en un reactor tipo matraz burbuja el cual estaba compuesto por medio de cultivo y nutrientes. Después de un proceso de semanas se obtuvieron altas concentraciones de ácido Indol-3 butírico AIB y ácido naftalen acético ANA (Lulu et al., 2015)

Con el objetivo de determinar el efecto del ácido indol acético (AIA) en el enraizamiento in vitro de *Gigantochloa atter*, se ensayaron tres concentraciones (15, 20 y 25 mg L⁻¹) en el enraizamiento in vitro y se incluyó un tratamiento control sin regulador del crecimiento. A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de plantas con raíces, se midió la altura de las plantas (cm) y el largo de la raíz (cm). Las plantas se transfirieron a fase de climatización y después de 20 días de cultivo se determinó la supervivencia. Los resultados demostraron que el AIA influyó en el enraizamiento in vitro de *G. atter*. Al adicionar al medio de cultivo AIA (20.0 mg L⁻¹) se obtuvieron los mayores porcentajes de formación de raíces (96.0%) y supervivencia ex vitro (60%) (García et al., 2015).

Se ha estudiado la aplicación de auxinas para la optimización en el crecimiento de la *Moringa oleifera* que posee hojas, flores y frutos con un alto contenido de vitaminas, minerales y proteínas de interés para las industrias alimenticias y médicas. Su reproducción es por semillas y estacas, métodos insuficientes si se desean introducir nuevos cultivares. El objetivo en este estudio fue establecer un protocolo para la propagación in vitro de *Moringa oleifera*. La cual se realizó por sistemas convencionales de medio de cultivo semisólido y biorreactores de inmersión temporal. En el enraizamiento in vitro se evaluó la concentración del ácido naftalen acético ANA y el ácido indol butírico AIB (0; 2.5; 5.0; y 7.5 $\mu\text{mol/L}$) y el tiempo de explante. Los biorreactores de inmersión temporal incrementaron la

calidad morfológica de los brotes y el coeficiente de multiplicación aumentó de 6.2 a 16.1 para el cultivar (Matos et al., 2016).

El triptófano es el principal precursor en las vías de biosíntesis de AIA en bacterias. Diferentes vías de síntesis de AIA han sido identificadas en bacterias. Cinco de estas rutas anabólicas son dependientes de triptófano. Las vías de síntesis de AIA más importantes y ampliamente distribuidas son la vía indol-3-piruvato (IPA) y la vía indol-3-acetamida (IAM). La vía IPA ha sido reportada principalmente en PGPB, mientras que la vía IAM ha sido descrita en bacterias fitopatógenas. Además, se han descrito vías de síntesis de AIA independientes de triptófano, que han sido estudiadas mediante mutantes y marcaje isotópico. Estas rutas anabólicas en presencia de triptófano aumentan significativamente la producción de AIA. El aminoácido triptófano es uno de los principales componentes del exudado de las raíces. La biosíntesis bacteriana de AIA puede contribuir a la supervivencia de bacterias, mediante la detoxificación de triptófano del exudado de las plantas.

Dentro de las bacterias promotoras del crecimiento de plantas productoras de ácido indol-3-acético, se estudió el efecto fitoestimulante de 16 cepas de *Bacillus* sobre el crecimiento de la planta *Vigna radiata*. *B. megaterium* MiR-4, que correspondió a la mayor productora de AIA, presentó el mayor efecto promotor del crecimiento, aumentando la elongación de los brotes y el número de raíces (Vega et al., 2016).

Un protocolo eficiente para la micropropagación de *Prunus cerasifera* fue utilizando biorreactores de inmersión temporales. Unos nodos extirpados de plantas cultivadas en el campo se desinfectaron con éxito usando hipoclorito de sodio al 12% durante 10 minutos. Se evaluó la duración de inmersión, la frecuencia y la composición media en los Biorreactores tipo RITA. Se obtuvo una alta tasa de multiplicación utilizando biorreactores RITA que contienen medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1 mg/L de N6-benciladenina (BAP) y 1 mg/L de ácido indol-3-butírico (IBA) con 20 min/12 h como tiempo de inmersión.

Se descubrió que los brotes derivados de RITA son más vigorosos que los regenerados utilizando el procedimiento estándar. Se observaron niveles más altos de pigmentos fotosintéticos en brotes cultivados en biorreactores, durante las etapas de proliferación y enraizamiento, que demostraron un cierto grado de fotoautotrofia de vitroplantas derivadas de RITA. Una alta proporción de brotes se enraizó con éxito en un medio líquido MS complementado con 1 g de carbón activado por L en biorreactores RITA. Durante la climatización a la planta, se registraron tasas de supervivencia superiores al 80%. La fidelidad genética de las plantas micropropagadas se investigó utilizando marcadores de repetición de secuencia inter simple (ISSR). Los resultados demostraron la generación de perfiles de amplificación homogéneos y, por lo tanto, respaldaron la fidelidad clonal de las vitroplantas regeneradas. (Ameni et al., 2018).

5. Planteamiento del problema.

Actualmente, la utilización industrial de microorganismos o metabolitos para la obtención de productos u optimización de procesos industriales es de gran importancia.

El desarrollo de la biotecnología en el ámbito de la investigación e industria, en la mayor parte de los casos ofrece alternativas viables y sustentables para la optimización de productos o procesos industriales.

Actualmente se debe de realizar un análisis correcto para diseñar o adquirir el tipo de biorreactor específico para el desarrollo controlado de microorganismos y metabolitos a escala laboratorio o industria. El modelo de biorreactor debe de ser seleccionado de acuerdo a las características específicas ambientales que debe de ser capaz de proveer para desarrollar un microorganismo o metabolito específico deseado.

El diseño, desarrollo y aplicación de los diferentes tipos de biorreactores requiere de métodos adecuados para la medición y control de la calidad del microorganismo que se desee desarrollar o producir.

En el laboratorio de Bioingeniería se han seleccionado bacterias y hongos capaces de producir auxinas y metabolitos con actividad biocida, respectivamente (López 2015; Padilla, 2015; Saldaña, 2016). Sin embargo, se desconocen los valores de los parámetros necesarios para escalar el proceso de condiciones batch a nivel de biorreactor.

La realización de pruebas de crecimiento de microorganismos y producción de metabolitos en condiciones de laboratorio es fundamental para la determinación de las variables de operación del biorreactor. Como primera etapa se estableció la operación técnica apropiada de un biorreactor New Brunswick. Como segunda etapa consideró la selección del microorganismo que se utilizó en el biorreactor para ejecutar diferentes pruebas de operación.

La modificación de las condiciones o variables ambientales durante el crecimiento de microorganismos en un biorreactor controlado nos permitirán obtener las variables óptimas del desarrollo del proceso.

6. Justificación.

En la región del estado de Baja California existe una gran cantidad de industrias que utiliza biotecnología a través de microorganismos para el control de sus procesos o productos finales.

La industria agrícola de la región es un ejemplo de la industria que puede ser beneficiada con la implementación de métodos de optimización de variables para la selección o diseño de biorreactores.

La búsqueda de nuevos métodos de optimización de variables para la selección y diseño es de alto impacto regional ya que puede brindar una información importante para el desarrollo de microorganismos específicos a nivel de biorreactor.

Este proyecto propone determinar las variables y condiciones óptimas en un biorreactor para el cultivo de un microorganismo seleccionado y la producción del metabolito de interés.

7. Objetivos de la investigación.

7.1. Objetivo general:

Optimizar los parámetros de operación de un biorreactor New Brunswick para la producción de AIA.

7.2. Objetivos específicos:

- Validar los efectos del AIA sobre el crecimiento de plantas de maíz en maceta a las que se les inocularon diferentes aislados bacterianos productores de AIA en la rizosfera.
- Medir en el biorreactor las variables: temperatura, agitación, pH, oxígeno disuelto, flujo de aire, concentración celular, entre otros.
- Modificar las condiciones de cultivo de microorganismos y producción de metabolitos de interés en función de la optimización de cada una de sus variables.
- Determinar los parámetros de optimización para la operación de un biorreactor New Brunswick para la producción de auxinas (AIA).

8. Hipótesis.

La correcta combinación de las variables de temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto permitirá optimizar la producción de AIA en condiciones de un biorreactor.

9. Metodología.

Se realizaron dos experimentos. El primer experimento DOE1 se enfocó en la validación de los efectos del AIA sobre el crecimiento de plantas de maíz en maceta a las que se les aplicaron diferentes aislados bacterianos productores de AIA en la rizosfera.

El segundo experimento DOE2 se dirigió a la selección de los factores de optimización del biorreactor New Brunswick para producir el metabolito de interés AIA. Se seleccionó un diseño de experimento factorial completamente al azar 4x2x2 balanceado con k=3 factores: pH (7,8,9 y 10), Temperatura (32°C y 40°C) y velocidad de agitación (150 y 250 rpm) con 3 repeticiones de cada muestra para evaluar 5 aislados bacterianos.

En una primera etapa se corrieron 240 unidades experimentales en viales de 15 ml de plástico con rosca y fondo cónico en incubadoras con agitación MaxQ 4000 de Thermo Fisher Scientific, solo los mejores resultados de producción del AIA se corrieron en el Biorreactor New Brunswick para buscar los parámetros de optimización de la producción de AIA.

9.1. Efecto de la inoculación de aislados microbianos en plantas de maíz. Experimento DOE 1.

Se estudió el efecto de la inoculación en maíz de cinco aislados bacterianos productores de ácido indolacético. Este experimento se realizó en macetas donde se inocularon los 5 aislados bacterianos productores de AIA a las plántulas de maíz de 4 días de edad. Se inocularon directamente en la rizosfera con diferentes niveles de inóculo bacteriano con el objetivo de determinar el mayor crecimiento en un determinado tratamiento.

Se seleccionó un diseño de experimento factorial completamente al azar con 5 tratamientos, 3 niveles y 6 repeticiones con los siguientes niveles o concentraciones: control (0 bacterias), nivel 1= 1×10^7 bacterias, nivel 2= 1.5×10^9 bacterias en vehículo de 1.5 ml de medio King B aplicado directamente a la rizosfera de las plántulas.

El experimento se llevó a cabo en pequeñas macetas en laboratorio (ver sección 9.1.2) y posteriormente en invernadero en condiciones controladas (27 °C con 12 h de iluminación y 12 h de oscuridad).

La observación y evaluación del crecimiento progresivo de las plantas de maíz se llevó a cabo en un periodo de 30 días midiendo durante este periodo la altura máxima de la planta, una de las siete variables a evaluar. Para ello se tomó la medida desde el inicio del tallo hasta la punta de la hoja más alta (Fig. 32). Al término de los 30 días se evaluaron el resto de las variables: diámetro de tallo, número de hojas, biomasa de planta húmeda y seca, biomasa de raíz seca y longitud de raíz (Fig. 33).

9.1.1. Procedimiento de desinfección de las semillas de maíz.

Las semillas de maíz se desinfectaron dentro de frascos de vidrio limpios cubriéndolas con suficiente solución de detergente comercial y se agitaron mecánicamente durante 1 minuto. Se retiró el detergente y se lavaron con agua purificada retirando posteriormente el exceso de agua. Se adicionó etanol y se dejaron reposar por 10 segundos. Se retiró el etanol y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 10% y se agitaron por 10 min. Se retiró el hipoclorito de sodio y las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril por 5 min. Se retiró por completo el agua destilada de las semillas (Fig. 4). Las semillas desinfectadas se sembraron en las macetas de laboratorio. (Sánchez, 2015).



Figura 4. Procedimiento de desinfección de semillas

9.1.2. Preparación de las macetas.

Los ensayos en maceta se establecieron en pequeñas macetas de 240 ml llenadas a un 80% de su capacidad con arena lavada, seca y estéril de granulometría fina (<2 mm) en condiciones de laboratorio utilizando semilla de maíz previamente desinfectadas y regadas con agua purificada y solución nutritiva de Long-Ashton, 20 ml cada semana durante cuatro semanas. La solución Long-Ashton fue preparada de acuerdo a la formulación de la tabla 4.

Las semillas desinfectadas fueron colocadas dentro de las macetas para su germinación y para añadir los respectivos tratamientos con los distintos aislados bacterianos productores de AIA (Fig. 5). Los códigos de los aislados bacterianos (AB) es la siguiente: AB1: 5.b.3, AB2: P.3.1.bact2, AB3: 1.3.b.5, AB4: 3.b.2 y AB5: 5.1.b.1

El experimento DOE1 se realizó de la siguiente manera. 1 experimento, 5 tratamientos, 3 niveles y 6 repeticiones; control, nivel 1 (1×10^7 bacterias), nivel 2 (1.5×10^9 bacterias).

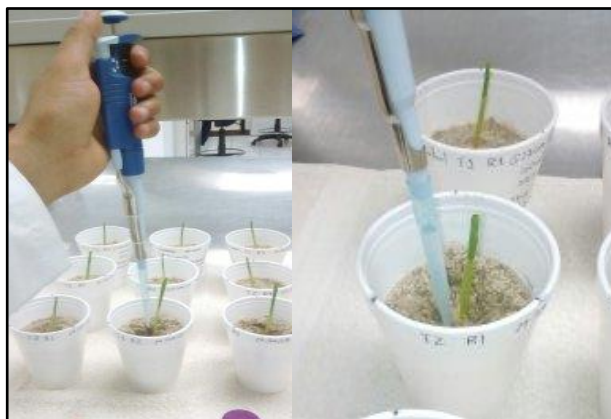


Figura 5. Inoculación de bacterias en plantas.

9.1.3. Riego de las macetas.

Con la finalidad de evaluar los efectos del AIA sobre el crecimiento de plantas de maíz en maceta a las que se les aplicaron diferentes aislados bacterianos productores de AIA utilizados en el experimento, se establecieron los tratamientos respectivos con su debido control en las macetas utilizando semillas de maíz previamente desinfectadas y se regaron cada semana con 20 ml de solución nutritiva Long Ashton. La solución nutritiva Long Ashton fue preparada según su formulación e indicaciones siguientes Tabla 4.

Tabla 4. Solución nutritiva concentrada Long Ashton.

Solución	Reactivo	Concentración g/L
1	KNO ₃	80.8
2	MgSO ₄	73.6
3	Ca(NO ₃) ₂	188.8
4	NaH ₂ PO ₄	36.8
5	MnSO ₄	1.69
5	CuSO ₄	0.23
5	ZnSO ₄	0.29
5	H ₃ BO ₃	3.1
5	NaCl	5.9
5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.088
6	Citrato férrico	1%

Para preparar esta solución se deben de separar las soluciones concentradas en frascos diferentes e identificados con su número correspondiente de solución del 1 al 6. No deben de ser almacenadas mezcladas ya que esto provocara precipitados no deseados. Los componentes de la solución #5 se almacenan en un frasco independiente porque de lo contrario precipitaran sus reactivos.

Una vez preparadas las soluciones concentradas, para formar 1 L de solución diluida Long Ashton para riego se realiza de la siguiente manera: Las soluciones

#1, 2, 3, 4, 6 adicionar 5ml de cada una + 1 ml de la solución #5 para aforar a un litro.

9.1.4. Determinación cualitativa y cuantitativa de AIA producido por los aislados bacterianos en medio King B.

El primer paso de la experimentación en esta tesis fue comprobar la repetibilidad de la producción de AIA por los aislados bacterianos que se proporcionaron para esta tesis. Las bacterias se reactivaron, resembrándolas en agar R2A y en caldo King B con la finalidad de evaluar la repetibilidad de la producción de AIA la cual fue positiva para los aislados bacterianos anteriormente mencionadas en el punto 9.1.2. El reactivo Salkowski (Fig. 6) se utilizó para la determinación cualitativa y cuantitativa de AIA. La presencia de AIA en el medio se observa por la presencia de color rojo o magenta (Fig. 7).



Figura 6. Reactivo Salkowski.



Figura 7. Medio King B positivo a AIA.

9.1.5. Curva de calibración de AIA y medición de la concentración.

Para la cuantificación de la producción de AIA en los cultivos microbianos. Se utilizó un espectrofotómetro marca BioRad, modelo SmartSpec Plus (Fig. 8). Se realizó una curva de calibración con el reactivo de grado analítico 3-indoleacetic acid de la marca Sigma-Aldrich Cat. No. 87-51-4 a distintas concentraciones 5, 10, 20, 40, 80, 160 mg/L de AIA (Fig. 9). Esta curva de calibración fue la referencia para determinar cuantitativamente las concentraciones de AIA producido por los aislados bacterianos.



Figura 8. Espectrofotómetro BioRad.

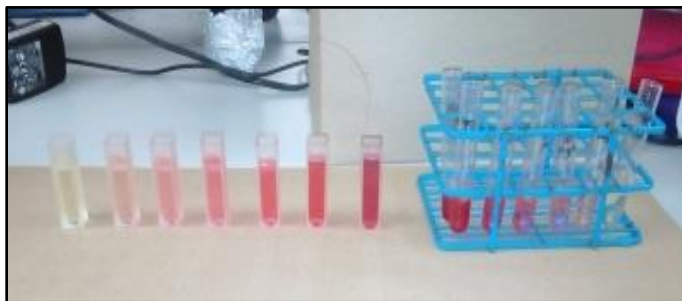


Figura 9. Tonalidades de las diferentes concentraciones de la curva de calibración de AIA.

La tabla 5 muestra la concentración de los reactivos para la curva de calibración de AIA, mientras que la (Fig. 10) muestra la tendencia de la relación absorbancia-concentración de AIA.

Tabla 5. Calibración de AIA

Absorbancia 530 nm	Concentración AIA µg/ml
0.182	5
0.289	10
0.739	20
1.564	40
2.562	80
3.761	160

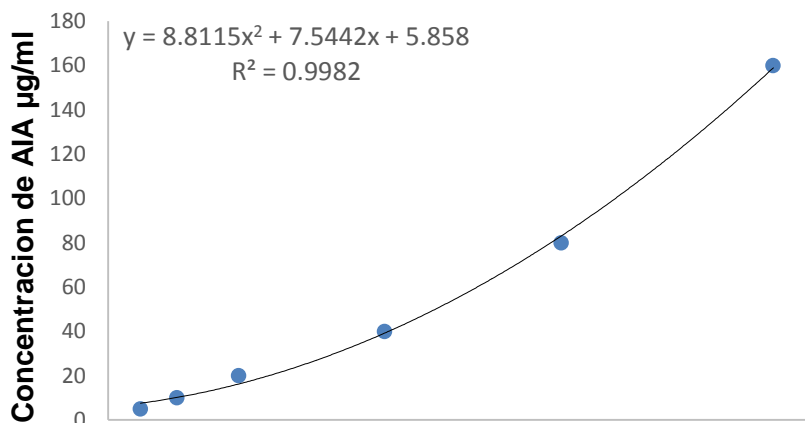


Figura 10. Curva de calibración de AIA.

9.1.6. Curva de calibración de McFarland y conteo de células bacterianas.

La curva de calibración de McFarland se realizó midiendo la densidad óptica de las soluciones de la tabla 6 utilizando un espectrofotómetro Marca BioRad Modelo SmartSpec Plus. La calibración de la curva McFarland permitió conocer cuantitativamente la concentración bacteriana en el medio de cultivo.

Tabla 6. Valores de curva de calibración de McFarland.

# tubo	BaCl ₂ 1% (ml)	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Bacterias x10 ⁶ /ml	Abs. 600 nm
1	0.1	9.9	300	0.236
2	0.2	9.8	600	0.500
3	0.3	9.7	900	0.763
4	0.4	9.6	1200	0.875
5	0.5	9.5	1500	1.107
6	0.6	9.4	1800	1.308
7	0.7	9.3	2100	1.686
8	0.8	9.2	2400	1.895
9	0.9	9.1	2700	2.077
10	1	9	3000	2.100

En la (Fig. 11) se muestra la curva de calibración obtenida de la relación de absorbancia-concentración de bacterias.

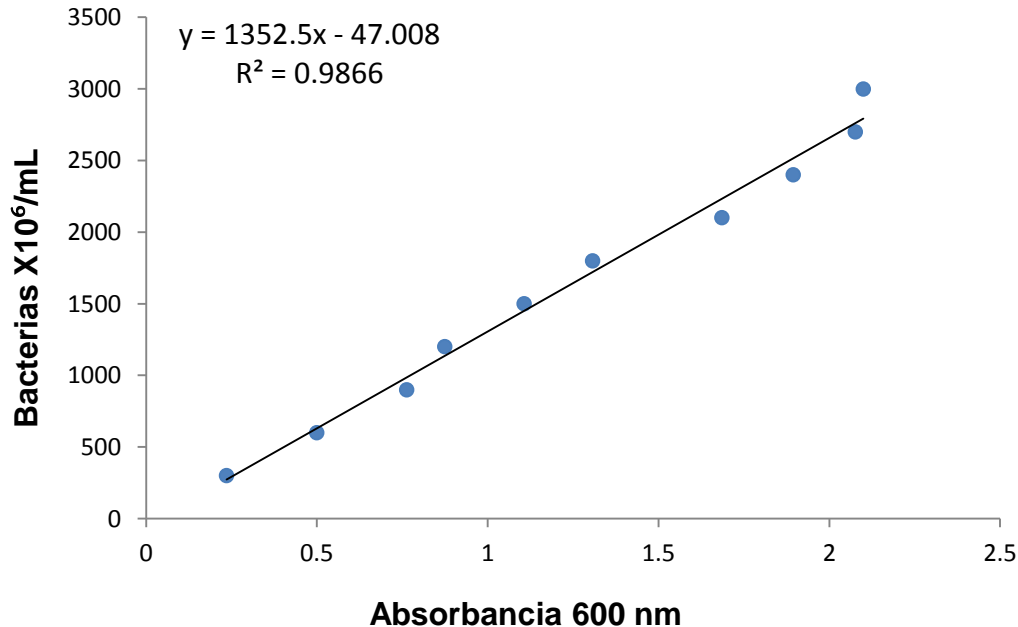


Figura 11. Curva de calibración de McFarland.

9.2. Selección de factores de optimización para biorreactor. Experimento DOE2.

El experimento DOE2 se dirigió a la selección de las variables de optimización del biorreactor New Brunswick para producir biomasa bacteriana productora de AIA. Se seleccionó un diseño de experimento factorial completamente al azar $4 \times 2 \times 2$ balanceado con $k=3$ factores: pH (7,8,9 y10), Temperatura (32°C y 40°C) y velocidad de agitación (150 y 250 rpm) con 3 repeticiones de cada muestra para evaluar 5 aislados bacterianos. En una primera etapa se corrieron 240 unidades experimentales en viales de 15 ml con 6 ml de medio en incubadoras con agitación MaxQ 4000 de Termo Fisher Scientific, solo los mejores resultados de producción del AIA se corrieron en el Biorreactor New Brunswick para buscar los parámetros de optimización de la producción de AIA.

Este diseño si se hubiera realizado en el biorreactor New Brunswick de 7.5 Litros de capacidad implicaría 240 corridas con un volumen aproximado total de 1200

Litros de medio de cultivo y un tiempo aproximado para el experimento de 720 días. Debido a los costos de reactivos, energéticos y tiempo de operación se justificó la decisión de realizar el experimento DOE2 a nivel laboratorio en viales de 15 ml de plástico con rosca y fondo cónico considerando los mismos valores de los factores con los que se hubiera corrido el experimento en el biorreactor New Brunswick.

Los tratamientos con los resultados de valores óptimos de mayor producción de biomasa bacteriana generadora de AIA obtenidos en los viales de 15 mL fueron escalados por duplicado en el biorreactor New Brunswick buscando aun mejorar la optimización debido a las ventajas que significa realizar la misma corrida de laboratorio, pero esta vez en un biorreactor con variables controladas.

9.2.1. Matriz de diseño de experimento DOE2.

A continuación, se presenta en la tabla 7 el experimento DOE2 que es un diseño factorial general $4 \times 2 \times 2$ Balanceado $k=3$ (tres factores): pH (a 7,8,9,10), Temperatura (32 °C y 40°C) y velocidad de agitación (150 y 250 rpm) con 3 repeticiones de cada muestra para evaluar los 5 aislados bacterianos (AB). La (Fig. 12), corresponde a los viales del experimento DOE2, siendo AB1 (aislado bacteriano 1), AB2 (aislado bacteriano 2), AB3 (aislado bacteriano 3), AB4 (aislado bacteriano 4) y AB5 (aislado bacteriano 5).

Tabla 7. Matriz de diseño de experimento DOE2 en viales.

pH: 7			pH: 8			pH: 9			pH: 10			
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
AB1 A1,1	AB1 A1,2	AB1 A1,3	AB1 A2,1	AB1 A2,2	AB1 A2,3	AB1 A3,1	AB1 A3,2	AB1 A3,3	AB1 A4,1	AB1 A4,2	AB1 A4,3	Corrida #A
AB2 A1,1	AB2 A1,2	AB2 A1,3	AB2 A2,1	AB2 A2,2	AB2 A2,3	AB2 A3,1	AB2 A3,2	AB2 A3,3	AB2 A4,1	AB2 A4,2	AB2 A4,3	Temp: 32 °C
AB3 A1,1	AB3 A1,2	AB3 A1,3	AB3 A2,1	AB3 A2,2	AB3 A2,3	AB3 A3,1	AB3 A3,2	AB3 A3,3	AB3 A4,1	AB3 A4,2	AB3 A4,3	rpm: 150
AB4 A1,1	AB4 A1,2	AB4 A1,3	AB4 A2,1	AB4 A2,2	AB4 A2,3	AB4 A3,1	AB4 A3,2	AB4 A3,3	AB4 A4,1	AB4 A4,2	AB4 A4,3	
AB5 A1,1	AB5 A1,2	AB5 A1,3	AB5 A2,1	AB5 A2,2	AB5 A2,3	AB5 A3,1	AB5 A3,2	AB5 A3,3	AB5 A4,1	AB5 A4,2	AB5 A4,3	
AB1 B1,1	AB1 B1,2	AB1 B1,3	AB1 B2,1	AB1 B2,2	AB1 B2,3	AB1 B3,1	AB1 B3,2	AB1 B3,3	AB1 B4,1	AB1 B4,2	AB1 B4,3	Corrida #B
AB2 B1,1	AB2 B1,2	AB2 B1,3	AB2 B2,1	AB2 B2,2	AB2 B2,3	AB2 B3,1	AB2 B3,2	AB2 B3,3	AB2 B4,1	AB2 B4,2	AB2 B4,3	Temp: 32 °C
AB3 B1,1	AB3 B1,2	AB3 B1,3	AB3 B2,1	AB3 B2,2	AB3 B2,3	AB3 B3,1	AB3 B3,2	AB3 B3,3	AB3 B4,1	AB3 B4,2	AB3 B4,3	rpm: 250
AB4 B1,1	AB4 B1,2	AB4 B1,3	AB4 B2,1	AB4 B2,2	AB4 B2,3	AB4 B3,1	AB4 B3,2	AB4 B3,3	AB4 B4,1	AB4 B4,2	AB4 B4,3	
AB5 B1,1	AB5 B1,2	AB5 B1,3	AB5 B2,1	AB5 B2,2	AB5 B2,3	AB5 B3,1	AB5 B3,2	AB5 B3,3	AB5 B4,1	AB5 B4,2	AB5 B4,3	
AB1 C1,1	AB1 C1,2	AB1 C1,3	AB1 C2,1	AB1 C2,2	AB1 C2,3	AB1 C3,1	AB1 C3,2	AB1 C3,3	AB1 C4,1	AB1 C4,2	AB1 C4,3	Corrida #C
AB2 C1,1	AB2 C1,2	AB2 C1,3	AB2 C2,1	AB2 C2,2	AB2 C2,3	AB2 C3,1	AB2 C3,2	AB2 C3,3	AB2 C4,1	AB2 C4,2	AB2 C4,3	Temp: 40 °C
AB3 C1,1	AB3 C1,2	AB3 C1,3	AB3 C2,1	AB3 C2,2	AB3 C2,3	AB3 C3,1	AB3 C3,2	AB3 C3,3	AB3 C4,1	AB3 C4,2	AB3 C4,3	rpm: 150
AB4 C1,1	AB4 C1,2	AB4 C1,3	AB4 C2,1	AB4 C2,2	AB4 C2,3	AB4 C3,1	AB4 C3,2	AB4 C3,3	AB4 C4,1	AB4 C4,2	AB4 C4,3	
AB5 C1,1	AB5 C1,2	AB5 C1,3	AB5 C2,1	AB5 C2,2	AB5 C2,3	AB5 C3,1	AB5 C3,2	AB5 C3,3	AB5 C4,1	AB5 C4,2	AB5 C4,3	
AB1 D1,1	AB1 D1,2	AB1 D1,3	AB1 D2,1	AB1 D2,2	AB1 D2,3	AB1 D3,1	AB1 D3,2	AB1 D3,3	AB1 D4,1	AB1 D4,2	AB1 D4,3	Corrida #D
AB2 D1,1	AB2 D1,2	AB2 D1,3	AB2 D2,1	AB2 D2,2	AB2 D2,3	AB2 D3,1	AB2 D3,2	AB2 D3,3	AB2 D4,1	AB2 D4,2	AB2 D4,3	Temp: 40 °C
AB3 D1,1	AB3 D1,2	AB3 D1,3	AB3 D2,1	AB3 D2,2	AB3 D2,3	AB3 D3,1	AB3 D3,2	AB3 D3,3	AB3 D4,1	AB3 D4,2	AB3 D4,3	rpm: 250
AB4 D1,1	AB4 D1,2	AB4 D1,3	AB4 D2,1	AB4 D2,2	AB4 D2,3	AB4 D3,1	AB4 D3,2	AB4 D3,3	AB4 D4,1	AB4 D4,2	AB4 D4,3	
AB5 D1,1	AB5 D1,2	AB5 D1,3	AB5 D2,1	AB5 D2,2	AB5 D2,3	AB5 D3,1	AB5 D3,2	AB5 D3,3	AB5 D4,1	AB5 D4,2	AB5 D4,3	

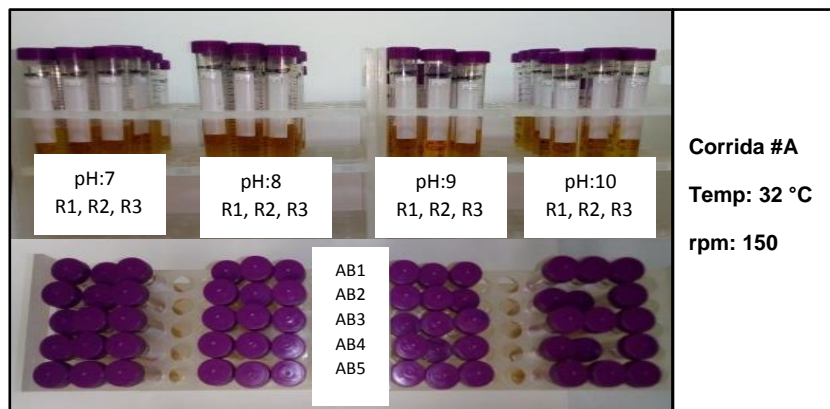


Figura 12. Viales de experimento DOE2 corrida #A

9.2.2. Preparación del medio de cultivo.

El medio King B originalmente es un medio que se formula y utiliza como fuente de nitrógeno para el cultivo de *Pseudomonas*, sin embargo, en esta investigación se utilizó medio King B ya que en estudios previos se realizó una validación en distintos medios para determinar en cuales las bacterias estudiadas producían AIA. El medio King B utilizado en esta tesis, se formuló como se muestra en la tabla 8. La peptona proteosa es de la marca MCD LAB Cat. No.9282.

Tabla 8. Formulación de medio King B.

Componentes	Para un litro		Para 130 ml	
Peptona Proteosa	20	g/L	2.6	g/L
K ₂ HPO ₄	1.5	g/L	0.150	g/L
MgSO ₄	1.5	g/L	0.195	g/L
Glicerol 1.5 (% v/v)	15	ml/L	1.95	ml/L

9.2.3. Preparación del inoculante microbiano.

Para la preparación del experimento se utilizaron 240 viales de 15 ml (Tabla 7) se prepararon las muestras de la siguiente manera.

Los 5 aislados bacterianos de interés se reactivaron en agar R2A modificado al 12% NaCl con crecimiento de 24 h en placa (Fig. 13) y posteriormente se preparó el inóculo microbiano para cada una de las 5 bacterias en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio King B colocando una asada de una colonia de la placa de bacterias e incubando durante de 72 h, 32 °C y 250 rpm, (Fig. 14). Posteriormente a cada vial de 15 ml que contenía 6 ml de medio King B se le añadieron 50 µL de inóculo a una concentración de 1305 bacterias X10⁶ /mL.



Figura 13. Bacteria 5.b.3.



Figura 14. Inóculos bacterianos en medio King B.

9.2.4. Cuantificación de AIA producido a nivel matraz por los aislados bacterianos.

Se inocularon con una asada de los respectivos cultivos bacterianos provenientes de cajas Petri en los matraces de 125 ml que contuvieron 30 ml el medio King B estéril (Fig. 15). Se incubaron a 32°C y 250 rpm por 72 h. Después se colocaron 10 ml del cultivo microbiano en viales de plásticos de 15 ml y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min (Fig. 16). El sobrenadante se filtró en un equipo de filtración VWR Cat. No. 26316-718 y filtros Millipore de 47 mm, 0.22 μ M Cat. No. GSWG047S6 (Fig. 17). Una vez filtrado el sobrenadante se le adicionó una relación de 1:1 en volumen de reactivo Salkowski, se agitó y se dejó en la oscuridad por 30 minutos (Fig. 18). Posteriormente se realizó la determinación

cuantitativa de AIA con el espectrofotómetro anteriormente calibrado en el punto 9.1.5.

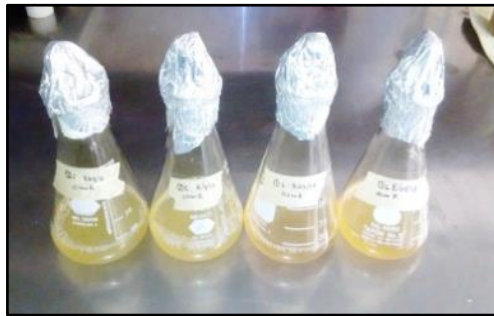


Figura 15. Matraces inoculados.

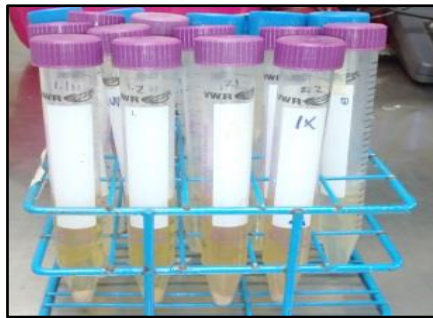


Figura 16. Viales centrifugados.



Figura 17. Filtrado del sobrenadante.



Figura 18. Reacción de AIA por reactivo Salkowski.

9.3. Operación del biorreactor New Brunswick.

9.3.1. Volúmenes de operación de trabajo del biorreactor.

El siguiente procedimiento describe los pasos básicos para operar el biorreactor marca New Brunswick modelo: BF115-2116354 con capacidad máxima de volumen total (V_t) de 7.5 litros. Es prioridad la seguridad del usuario al utilizar el equipo de protección personal adecuado al tipo de operación biológica que realizará.

Se considera un volumen máximo de operación (V_{op}) del 70% debido a que hay que considerar algunos factores durante la corrida como el nivel de la espuma generada y la altura del vórtice de agitación que puede hacer que el medio de cultivo se derrame del sistema y de esta manera dañe la corrida experimental. Para este caso el V_{op} fue de 5 L.

El volumen de operación (V_{op}) puede ser menor al 70% siempre y cuando se cumplan las condiciones siguientes: que el nivel cubra por completo los sensores de OD, y pH y cubra el nivel de los impelentes de agitación. Los impelentes de agitación se pueden recorrer en el eje de rotación de ser necesario.

Para el caso del biorreactor marca New Brunswick el volumen de operación mínimo (V_{opmin}) considerado fue de 3 litros.

El volumen del inóculo inicial (V_{in}) es de 10% del volumen de operación (V_{op}), es decir para el $V_{op}=5$ L, el $V_{in}=0.5$ L y para $V_{op}= 3$ L el $V_{in}=0.3$ L.

9.3.2. Esterilización del biorreactor.

En los biorreactores de laboratorio pequeños menores a 14 L se esteriliza el sistema completo dentro del autoclave del tamaño adecuado, es necesario desmontar el motor eléctrico y la chaqueta eléctrica de calentamiento antes de introducir el biorreactor en el autoclave.

Los sensores de nivel de espuma, pH, oxígeno disuelto (OD), tubo de toma de muestra, mangueras, filtros, aditivos y medio de cultivo permanecen en el sistema durante la esterilización.

Es importante ocluir con pinzas todas las mangueras del biorreactor que aún no estén conectadas incluyendo los filtros de aire de tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$ para evitar el derrame del medio de cultivo o los aditivos dentro del autoclave. Los extremos de las mangueras deben de ser rellenados con algodón y cubiertas con aluminio para mantener su esterilidad y evitar su contaminación. Esto es previo a la conexión de mangueras en el sitio de trabajo de la consola de control.

Es muy importante aclarar que durante la esterilización deben de estar equilibradas las presiones del sistema (autoclave y biorreactor) para evitar derrames. Esto se logra dejando ligeramente abierta la tapa del biorreactor (nunca apretar completamente los tornillos de la tapa) y el registro roscado de tapón de $\frac{3}{4}$ " durante el proceso de esterilización. La tapa y el registro se cerrarán nuevamente una vez terminada la esterilización y cuanto la temperatura del sistema baje a $70-80^{\circ}\text{C}$.

La esterilización puede realizarse de dos maneras. Puede esterilizarse el biorreactor con todos sus aditivos y mangueras conectados en un solo lote en la autoclave o puede realizarse por separado la esterilización de las botellas de los aditivos siempre y cuando se tenga el cuidado de ocluir y cubrir los extremos de las mangueras con algodón y aluminio para evitar su contaminación.

Posteriormente se realiza la conexión entre en biorreactor y las botellas de los aditivos en un ambiente estéril.

9.3.3. Sistema de control del biorreactor.

Se enciende la consola de control del biorreactor New Brunswick con un switch que se encuentra en la parte lateral de la consola con esto se enciende la interface de control que nos envía a la pantalla principal de operación.

Al mismo tiempo en que se enciende la consola de interface de control del biorreactor también debemos de encender la computadora y abrir el programa de interface BioCommand. Este software tiene la capacidad de medir, registrar y controlar las variables que se realicen en el biorreactor. El registro o grabación de las variables comienza en el momento en que se abre el software abre y se activa una corrida o "Batch".

Desde que se enciende la consola de control, ésta no debe de apagarse hasta que finalice la corrida del biorreactor, de lo contrario se perderán los valores de las calibraciones del sensor de pH y OD.

El sensor de pH debe de calibrarse una vez encendida la consola, después se desconecta el cable eléctrico de los sensores de pH y OD y se cubren con el tapón hermético original del sensor antes de esterilizar el sistema completo del biorreactor.

Una vez finalizada la esterilización del sistema completo del biorreactor se reconectan los sensores de pH y OD al igual que el total de las mangueras del sistema sin haber apagado en ningún momento la consola de control del biorreactor. En este momento se realiza la calibración del sensor de OD.

Al mismo tiempo que se enciende la consola de control original del biorreactor, también se enciende la computadora y se abre el programa BioCommand ejecutando la receta "UABC8" para que desde este momento la computadora almacene los datos de las variables de la corrida al igual que a consola pero con la ventaja de que los datos se grabaran en una base de datos del software

BioCommand que se almacenaran en el disco duro de la computadora para su posterior consulta y análisis.

El software BioCommand será detenido una vez que se haya realizado la corrida experimental a través del comando “End Batch” el cual finalizará la captura de datos de dicha corrida en el la computadora.

La interface principal en la consola de control al igual que el software BioCommand nos permite medir, controlar y registrar los siguientes parámetros: Temperatura, pH, agitación (rpm), oxígeno disuelto (OD), nivel de espuma, función cascada y cantidad de aditivos adicionados (acido, base, antiespumante, flujo de gases).

9.3.4. Oxígeno Disuelto en el biorreactor.

En un biorreactor de laboratorio el medio de cultivo debe de ser preparado externamente y después introducido al biorreactor para la esterilización de todo el sistema en conjunto.

Es deseable que durante el proceso de corrida del biorreactor además del control de pH que será realizado de manera automática por el sistema de dosificación de ácido y base también se trabaje con una concentración de Oxígeno Disuelto OD entre 70% y 100% como mínimo para permitir el desarrollo adecuado del microorganismo. Para lograr estos valores de OD está en función de la aireación (flujo de aire) y la agitación (rpm) del sistema, sin olvidarnos que al aumentar estos factores es más susceptible a la presencia de espuma. La espuma puede ser controlada con antiespumantes grado alimenticio. De ser necesario se puede considerar ingresar otra fuente externa adicional de aire u oxígeno para lograr el objetivo de subir el OD.

También hay que señalar que la OD puede ser controlada con la función cascada donde el OD queda en función de dos variables Agitación y Flujo de gases.

Una vez que se establecen los parámetros o factores deseados en el sistema como lo son: Temperatura, pH, agitación (rpm), Oxígeno Disuelto OD y pH el sistema puede ser inoculado y el biorreactor puesto en marcha.

La duración de la corrida de nuestro biorreactor estará en función de nuestro objetivo de producción como puede ser biomasa, metabolito extracelular o intracelular.

Es recomendable tomar muestras cada cierto intervalo de tiempo para determinar las curvas de cinética de crecimiento microbiano, biomasa y/o concentración del metabolito de interés.

9.3.5. Evaluación de las muestras del biorreactor.

Es muy importante monitorear el proceso del biorreactor tomando muestras cada cierto intervalo de tiempo para determinar la cinética de crecimiento microbiano, el comportamiento de la biomasa y/o la concentración del metabolito de interés en función del tiempo. Estas mediciones nos ayudaran en conjunto con los factores a determinar la optimización del proceso biológico en el biorreactor.

Las muestras deben de ser tomadas a través del puerto de toma de muestra del biorreactor manteniendo la esterilidad del sistema en todo momento. La muestra puede llegar al tubo de toma de muestra a través de presurizar el sistema ligeramente o succionando con una jeringa. Se debe de tener cuidado de que la muestra sea representativa y no tomemos la muestra contenida anteriormente en las líneas de proceso, para esto se recomienda desechar los primeros 5 ml y posteriormente tomar la muestra representativa del biorreactor de aproximadamente de 5 ml. Al retirar el tubo de toma de muestra se debe de acercar el mechero y mantener estéril el área. La muestra se procesa como se describe a continuación. Se toma 1 ml de la muestra para realizar la medición de concentración celular (bacterias/ml) por método de espectrofotometría utilizando la curva de McFarland como referencia. De ser necesario se deberán de realizar las diluciones correspondientes para lograr cuantificar la concentración celular.

Los 4 ml restantes de muestra son centrifugados a 13000 rpm y a 4° C, se retira el sobrenadante y se filtra con filtros de 0.22 µm y se mezcla relación 1:1 con reactivo Salkowski y empleando la metodología correspondiente se determina la concentración de AIA.

9.3.6. Inoculación del biorreactor.

Se recomienda que el inóculo inicial sea preparado en el momento en que se va a realizar la corrida del biorreactor y se deberá de cuantificar la concentración de microorganismos en el inóculo antes de inocular el biorreactor. Esto nos permitirá conocer la concentración inicial del inóculo para nuestro registro y una vez inoculado el biorreactor se toma otra muestra de la concentración inicial (T₀) del biorreactor además de las tomas de muestra siguientes a diferentes tiempos que serán necesarias para evaluar las curvas de comportamiento de nuestro proceso biológico y determinar si existe una optimización de la biorreacción en el biorreactor.

Una nota importante es que se recomienda que si se va a realizar en diseño de experimentos en serie porque solo se cuenta con un biorreactor se elabore un preinóculo y se separe en viales con el mismo volumen ya que este método mantendrá constante la concentración de células bacterianas y esto nos permitirá tener una mejor repetibilidad en la preparación y concentración del inóculo que se adicionara a cada batch del biorreactor. Siempre cuidando de que no pase una gran cantidad de tiempo entre cada utilización de cada vial con inóculo ya que de lo contrario se verá afectada la repetitividad del batch del biorreactor.

La alimentación del inóculo debe de realizarse una vez que el biorreactor se encuentre en las condiciones o factores de trabajo estables previamente seleccionados, es decir: Temperatura, pH, rpm y OD.

Una vez que estos factores son estables se debe de adicionar el inóculo en el registro roscado de tapón de ¾" de alimentación al biorreactor en condiciones estériles. Apoyándose de un embudo estéril y acercando un mechero para mantener estéril la zona de adición del inóculo. Debe también existir aireación en el sistema para generar presión positiva por el registro de alimentación que

ayudará a evitar la contaminación del inóculo y del sistema evitando la entrada del aire ambiental.

Otras maneras de adicionar el inóculo es a través de un puerto de alimentación de aditivos del biorreactor conectado a una bomba dosificadora o a través de una septa con jeringa. Esta selección del método de inoculación dependerá del caso y del volumen del inóculo que sea necesario adicionar.

Es importante mencionar que antes de adicionar el inóculo debe de retirarse el mismo volumen del sistema para no rebasar el volumen máximo de operación en caso de que sea necesario si se opera a máxima capacidad.

9.3.7. Aditivos para el biorreactor.

En los aditivos se consideran tres frascos para adición de aditivos de al menos 500 ml: HCl 1M, NaOH 1M y Antiespumante grado alimenticio diluido al 70% con agua desionizada estéril.

Todos los frascos deben de esterilizarse incluyendo las mangueras dosificadoras pinzadas con algodón y aluminio en sus extremos terminales, así como también los filtros de aireación.

Se realizó una validación de antiespumante para validar la interferencia sobre la producción de nuestro metabolito de interés que es el AIA, donde se agregaron diferentes niveles de antiespumante y se logró validar que hasta la aplicación de 1.6% v/v no causa interferencia con la producción de nuestro metabolito de interés.

9.3.8. Calibración de los sensores de pH, OD y nivel.

La consola del biorreactor debe de ser encendida en el momento que se decide hacer la corrida. Una vez encendida debe de realizarse la calibración del sensor de pH. Esta calibración solo será válida mientras este encendida la consola de control, es decir, la consola no debe de apagarse hasta el final de la corrida del biorreactor, de no ser así, se perderá la calibración del sensor de pH.

El sensor de pH debe de calibrarse una vez encendida la consola, después se desconecta el cable eléctrico de los sensores de pH y OD y se cubren con el tapón hermético original de los sensores antes de esterilizar el sistema completo del biorreactor. También se debe de cubrir con su tapón el balero de rotación de acoplamiento del motor eléctrico. El no cubrir el contacto eléctrico de los sensores durante la esterilización puede derivar en daño a los sensores, al balero de rotación y al sistema de control.

El sensor de OD se calibra una vez que el sistema del biorreactor es colocado en la consola después de esterilizarse, estar frío y aireado al máximo flujo de trabajo por al menos 30 minutos y por lo tanto con el OD saturado en el sistema, considerando esa referencia como 100% de OD la cual será calibrada en la consola.

El sensor de nivel debe de ser conectado al cable rojo del sensor #1 mientras que el verde debe de ser conectado a la tapa metálica del biorreactor. La función de este sensor es adicionar antiespumante cuando la espuma haga contacto con este sensor. El sensor de espuma funciona bajo el principio de control de nivel de un solo punto (single point).

Solo se utilizará un solo sensor de nivel (sensor #1) para el funcionamiento del biorreactor en batch, el sensor #2 quedará desactivado o no conectado.

Los sensores de nivel #1 y #2 solo se utilizan funcionando juntos en caso de que el biorreactor se utilice en continuo bajo el principio de control de nivel diferencial (differential point).

La calibración se deberá de programar en función de la conductividad de la espuma del medio en la consola.

Una vez finalizada la esterilización del sistema completo del biorreactor se retiran los tapones herméticos de los sensores y se reconectan al igual que el total de las mangueras del sistema sin haber apagado en ningún momento la consola de control del biorreactor.

En este momento también se debe de encender el software BioCommand de la computadora e iniciar el Batch con la receta seleccionada para que comience la adquisición y registro de datos en la computadora.

Los sensores predefinidos con los que cuenta el biorreactor nos permiten a través de ellos medir las siguientes variables: Agitación (rpm), Temperatura, pH, Oxígeno disuelto (%OD) y flujo de gases (concentración de relación Aire-Oxígeno).

9.3.9. Secuencia de preparación y operación del biorreactor New Brunswick.

1. Preparar el medio de cultivo para el biorreactor, según la formulación y volumen indicados. El medio puede ser preparado fuera del biorreactor o puede ser preparado dentro del mismo contenedor del biorreactor (Fig. 19).



Figura 19. Preparación de medio King B en biorreactor.

2. Preparar el preinóculo y posteriormente el inoculo en los volúmenes adecuados para el biorreactor según sea el caso y cuantificar la concentración de microorganismos en ambos (Fig. 20).

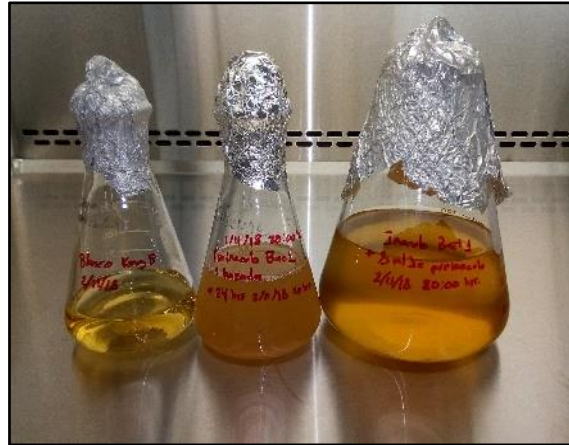


Figura 20. Control, preinóculo e inoculo bacteriano.

3. Armar el biorreactor y preparar los aditivos para el control del biorreactor (ácido, base, antiespumante).
4. Encender la consola de control, la computadora con el software BioCommand e iniciar un nuevo Batch en el software para grabar la corrida.
5. Calibrar el sensor de pH con los buffers y no apagar la consola hasta el final de la corrida.
6. Verter el medio de cultivo dentro del biorreactor.
7. Preparar el biorreactor para su esterilización.
 - 7.1 Colocar los sensores de pH, OD, nivel y otros registros en la tapa del biorreactor. Los 3 puertos de los aditivos deben de ser ocluidos con mangueras pinzadas.
 - 7.2 Unir la tapa y el contenedor del biorreactor dejando sin apretar completamente las 6 tuercas del sello de la tapa del biorreactor.
 - 7.3 Dejar abierto y sobre puesto sin apretar el registro de $\frac{3}{4}$ ".
 - 7.4 Ocluir todas las mangueras del biorreactor con pinzas.

7.5 Colocar algodón y aluminio en los extremos de las mangueras y filtros de aire para evitar contaminación.

7.6 Colocar el biorreactor y los aditivos dentro del esterilizador e iniciar la esterilización (Fig. 21). Las mangueras de los aditivos deben de estar pinzadas y las roscas de las tapas no apretadas completamente.



Figura 21. Biorreactor en autoclave.

7.7 Una vez terminada la esterilización permitir que la temperatura del sistema baje a menos de 80°C y apretar ligeramente los tornillos antes de retirarlo de la autoclave.

8. Retirar el biorreactor de la autoclave y colocarlo en la zona de trabajo junto a la consola de control.
9. Encender el software de control y de registro BioCommand, seleccionar la receta que se defina a correr e iniciar un nuevo batch.
10. Esperar a que el sistema se enfríe por completo a temperatura ambiente.
11. Encender la aireación y agitación por mínimo 30 minutos con el objetivo de aumentar el OD hasta el 100% para calibrar 0 y 100% (Fig. 22).

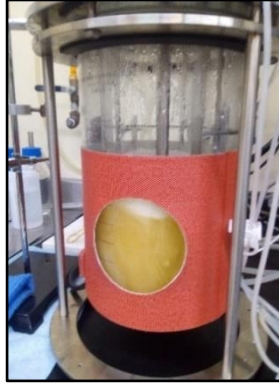


Figura 22. Biorreactor en proceso de aireación y agitación.

12. Conectar las mangueras de recirculación de agua del control de temperatura suministrada por la consola al intercambiador de calor interno del biorreactor (las dos conexiones son de espiga y se encuentran en la tapa). Nota: El chiller (enfriador externo) será solo utilizado en caso de que se requiera precisión de 0.1°C del control del sistema de temperatura, aunque lo más recomendable es utilizarlo solo en temporada de verano o cuando la temperatura de laboratorio supere los 30°C .
13. Conectar los siguientes sensores: sensor de pH, OD, temperatura y nivel.
14. Conectar las mangueras al biorreactor en los puertos de ácido, base y antiespumante, previamente hay que retirar el aluminio y algodón de los extremos de las mangueras en un ambiente estéril generado por un mechero y conectar las mangueras (Fig. 23).

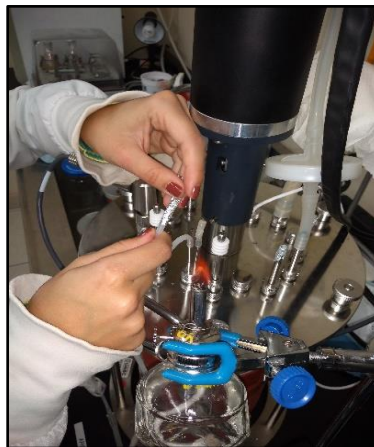


Figura 23. Conexión de mangueras en los puertos para aditivos.

15. Colocar el biorreactor en condiciones estables (pH, OD, rpm, temperatura, flujo de gases).
16. Una vez que el biorreactor este ligeramente presurizado con el flujo positivo de aire, retirar el tapón de algodón de la manguera del exhaust y colocar una válvula airlock en condiciones estériles que contenga agua destilada estéril para el sello. La válvula debe de ser desinfectada en solución de etanol al 70% durante 10 min.
17. Verter el inóculo al biorreactor a través del registro roscado de 19 mm al biorreactor realizándolo en condiciones estériles cerca de un mechero. Se puede utilizar un embudo estéril para auxiliarse de ser necesario. Mantener la presurización del sistema en todo momento con el flujo de aire para mantener presión positiva en el sistema y disminuir el riesgo de contaminación durante la inoculación.
18. Cerrar nuevamente el registro roscado de 19 mm, permitiendo la salida del exceso de presión del birreactor por la válvula airlock.
19. Realizar la toma de muestra según el esquema previamente establecido para realizar la cinética de crecimiento microbiano, biomasa y/o concentración del metabolito.
20. Concluida la corrida, realizar la limpieza del biorreactor. Realizar la actividad con mucho cuidado de no dañar los componentes del biorreactor limpiando con agua, jabón, solución de cloro al 5% y cepillo hasta retirar toda la biomasa (Fig. 24).

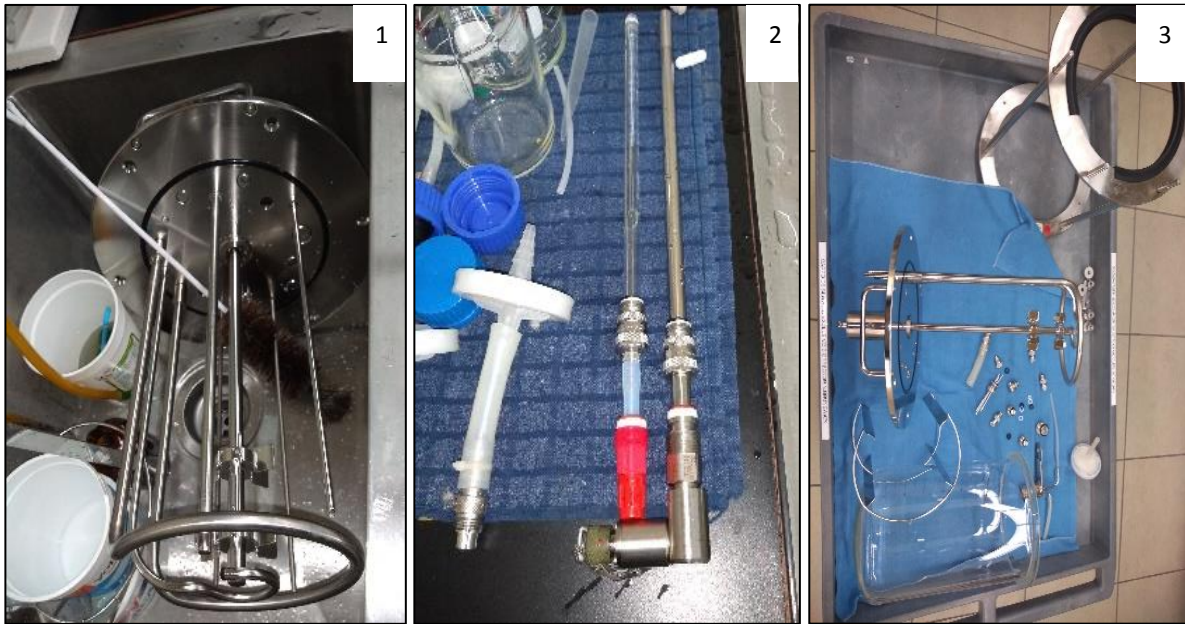


Figura 24. Proceso de desarmado y limpieza de biorreactor.

21. Un punto importante durante la manipulación de desensamble o limpieza del biorreactor, es colocar la tapa del biorreactor en posición en la que el soporte de la carga la realice el soporte del motor y no el eje de rotación de los impelentes ya que esto puede desalinearse el eje y dañar el equipo (Fig. 25).



Figura 25. Correcta colocación de soporte de la tapa del biorreactor.

22. Una vez limpio el biorreactor, armar el equipo y colocar en la zona de trabajo (Fig. 26). Instalar mangueras y sensores.



Figura 26. Biorreactor limpio.

23. Una vez limpio y armado el equipo instalar tapones, mangueras y sensores conforme a la (Fig. 27). La configuración sugerida de conexiones para el biorreactor se muestra en la tabla 9. Cabe mencionar que la configuración sugerida puede variar según las necesidades del usuario. Para mayor información, revisar el manual del usuario del biorreactor New Brunswick.

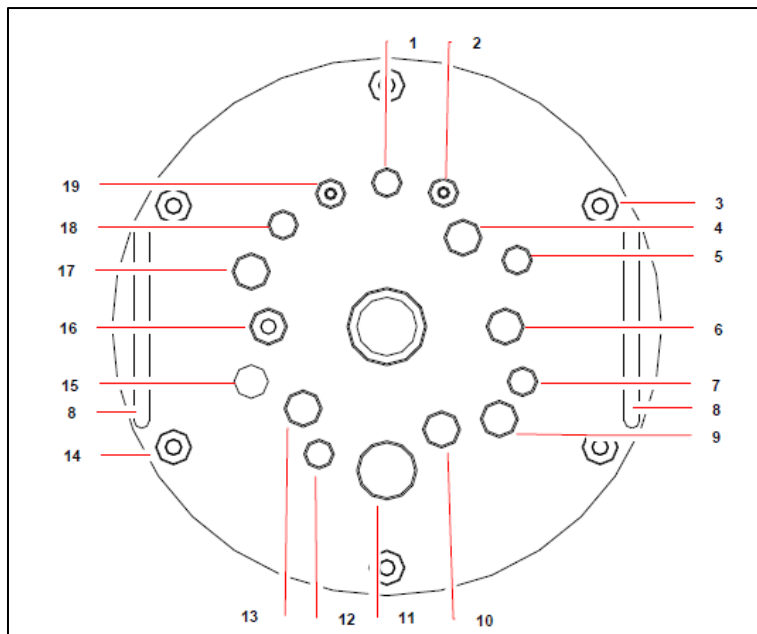


Figura 27. Configuración de conexiones para biorreactor.

Tabla 9. Configuración de conexiones para biorreactor.

1	Sparger, 6 mm	11	Plug, 19 mm/spare
2	Cooling coil, 6 mm	12	Level, 6 mm
3	Mounting position for sampler assembly	13	Plug, 12 mm/spare
4	pH probe, 12 mm	14	Each headplate bolt is a possible mounting position for a bottle holder.
5	Sampler tube, 6 mm		
6	dO ₂ probe, 12 mm	15	Tri-port, 12 mm
7	Plug, 6.35 mm/spare	16	RTD thermowell, 12 mm
8	Lifting handle	17	Exhaust, 12 mm
9	Tri-port, 12 mm	18	Harvest, 6 mm
10	Septum, 12 mm	19	Cooling coil, 6 mm

9.3.10. Toma y análisis de muestras.

Existen dos maneras de obtener la toma de muestra del biorreactor. La primera es haciendo succión a través de la jeringa con el filtro y la muestra es colectada en el vial, (Fig. 28). La segunda manera es presurizando ligeramente el biorreactor al ocluir la manguera del exhaust y colectar la muestra en el vial.



Figura 28. Toma de muestra en biorreactor.

El procesamiento de muestras se realizó de la siguiente manera.

La determinación de la concentración bacteriana de muestras se realizó en función de la absorbancia (Fig. 29), utilizando la curva de calibración de McFarland.



Figura 29. Determinación de la concentración bacteriana.

Para la determinación de la concentración de AIA las muestras se tratan con centrifugación refrigerada a 4°C y se adiciona al sobrenadante el reactivo Salkowski y la concentración es calculada en función de la absorbancia utilizando una curva de calibración con AIA preparado con grado reactivo (Fig. 30).

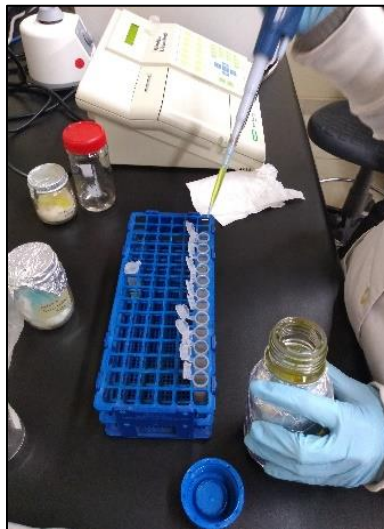


Figura 30. Determinación de la concentración de AIA.

10. Resultados.

10.1. Medición de curva de crecimiento microbiano.

La tabla 10 y la (Fig. 31) corresponden a un ejemplo de una curva de crecimiento bacteriano del AB 1 en matraz Erlenmeyer de 125 ml en incubadora rotatoria a 32°C y 250 rpm. Esta curva de crecimiento bacteriano sirvió de referencia para conocer la concentración máxima bacteriana alcanzada en un determinado tiempo.

Tabla 10. Valores de la curva de crecimiento bacteriano

Tiempo (h)	Absorbancia del crecimiento del aislado bacteriano ($\lambda=600$ nm)	Ecuación de McFarland $Y=1352.5x-47.008$ (Bacterias $\times 10^6$ /ml)
0	0.247	287
1	0.435	541
2	0.630	805
3	0.731	942
4	0.829	1074
5	0.878	1140
6	1.827	2424
24	2.029	2697
30	2.292	3053
45	3.051	4079
51	3.239	4334
95	3.955	5302
136	3.957	5305
148	4.000	5363
169	4.000	5363
193	2.684	3583

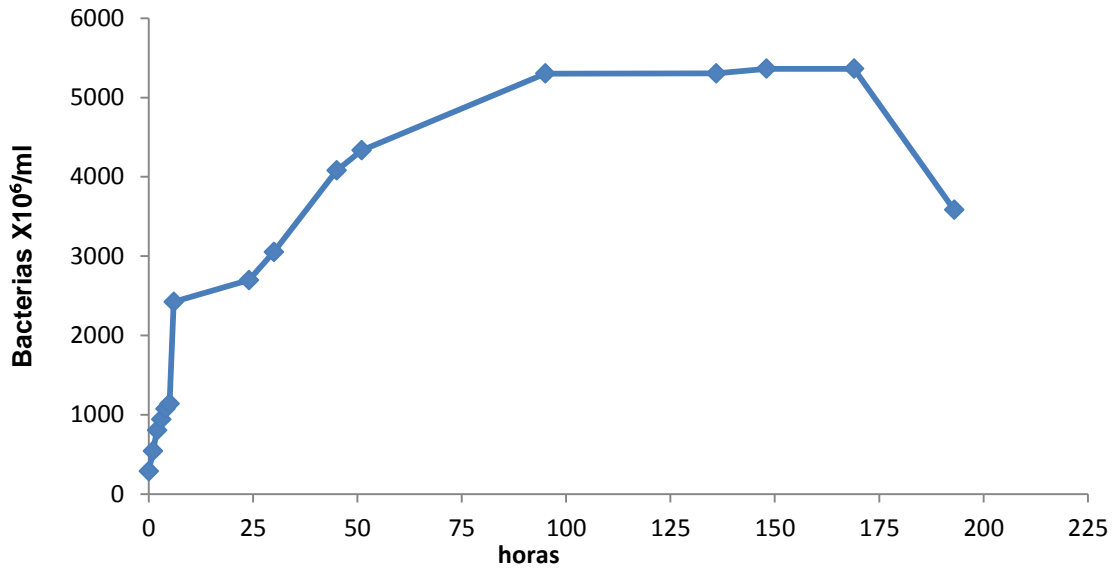


Figura 31. Curva de crecimiento microbiano del aislados bacteriano 1.

10.2. Resultados de experimento DOE 1.

El experimento DOE1 mostró los efectos de crecimiento de cada una de los aislados bacterianos productores de AIA en las plantas de maíz. Los efectos fueron medidos sobre las siguientes variables de crecimiento de las plantas como lo son altura, diámetro de tallo, biomasa y longitud de raíz.

10.2.1. Evaluación del crecimiento de las plantas de maíz.

Las siguientes figuras, (Fig. 32 a Fig. 37), muestran los resultados promedio de la medición de las distintas variables (altura de planta, diámetro de tallo, biomasa de planta húmeda, biomasa de hojas secas, longitud de raíz y biomasa de raíz seca) evaluadas al término de 30 días.

Se utilizó la siguiente nomenclatura para las figuras, T (tratamiento), N (nivel) con $N1=1 \times 10^6$ y $N2=1.5 \times 10^9$ bacterias inoculadas, Ctrl (Control) y AB (Aislado bacteriano). Los colores de las gráficas representan a los diferentes tratamientos, rosa (tratamiento 1), verde (tratamiento 2), azul (tratamiento 3), naranja (tratamiento 4) y amarillo (tratamiento 5).

La altura de las plantas de maíz fue estadísticamente igual ($P > 0.05$) entre los tratamientos y el control (Fig. 32), lo cual indica que los aislados bacterianos inoculados no tuvieron ningún efecto en relación a esta variable.

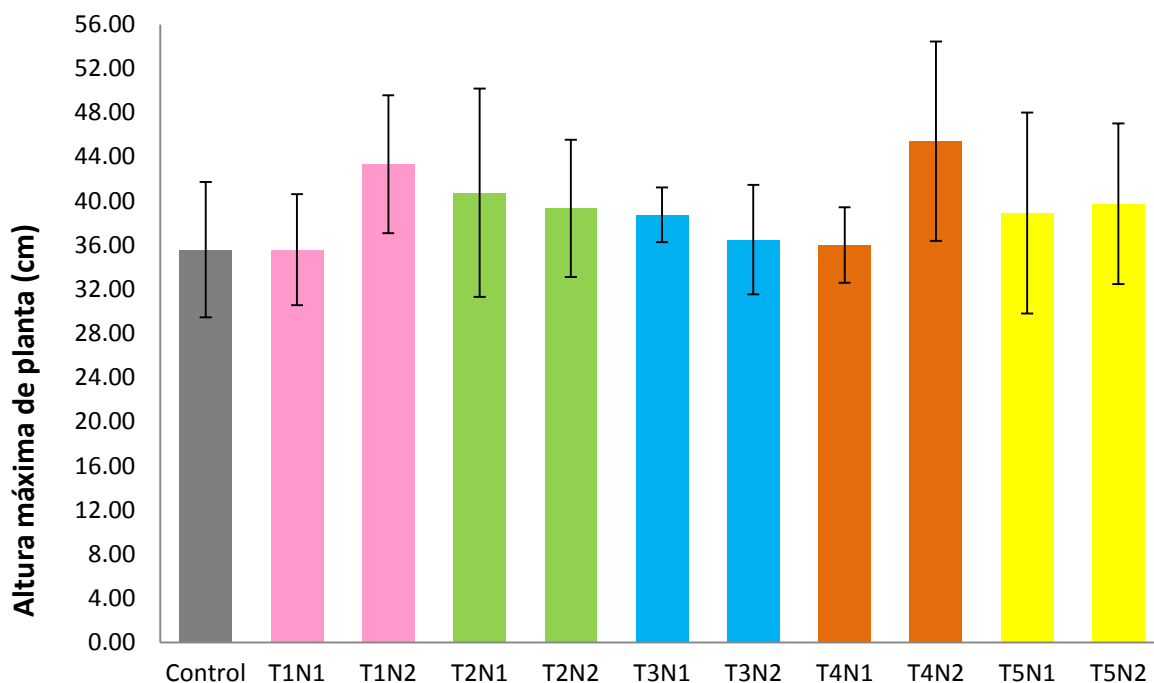


Figura 32. Altura máxima de planta.

En las figuras 32-37 las barras representan el promedio aritmético de las alturas ($n=6$), la línea sobre las barras corresponde a la desviación estándar. T=tratamientos= Nivel; N1= 1×10^6 y N2= 1.5×10^9 bacterias inocuadas. AB=Aislado Bacteriano; T1(AB: 5.b.3), T2(AB: P.3.1.bac2), T3(AB: 1.3.b.5), T4(AB: 3.b.2) y T5(AB: 5.1.b.1).

En la (Fig. 33) diámetro de tallo de planta el aislado bacteriano P3.1.bac2 inoculado con 1×10^6 ó 1.5×10^9 bacterias (tratamientos T2N1 y T2N2, respectivamente) generó mayor diámetro del tallo de las plantas (3.7 cm) respecto a el control (3.2 cm) por lo que podemos mencionar que existió diferencia significativa ($P < 0.05$).

En la sección de anexos se incluye la ANOVA con la prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos.

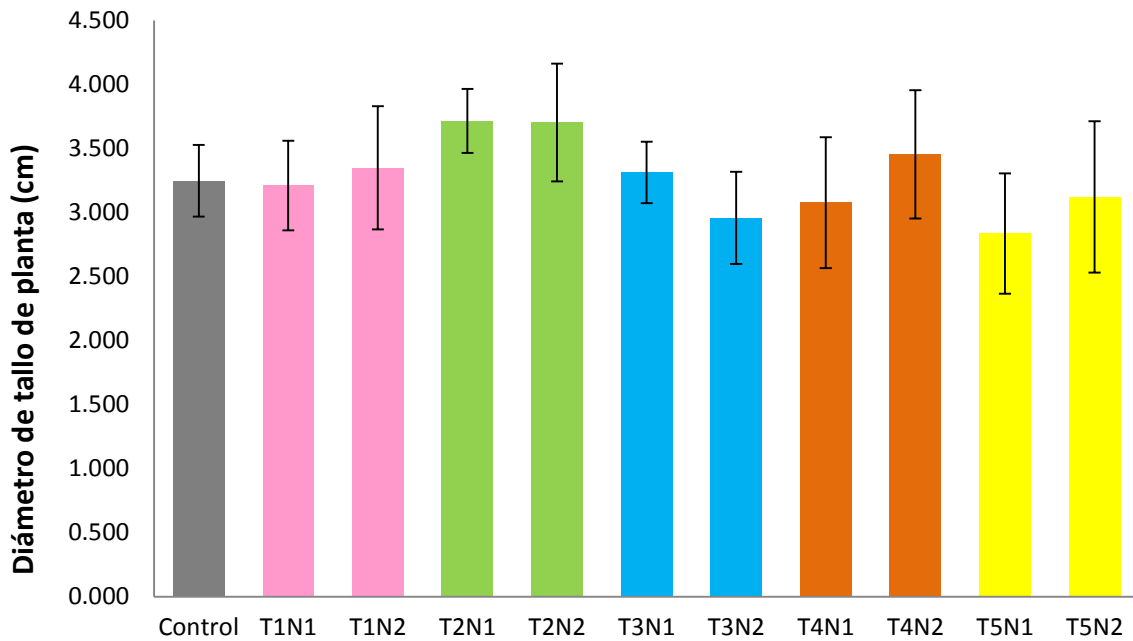


Figura 33. Diámetro de tallo de planta.

En la (Fig. 34) biomasa de planta húmeda podemos mencionar que no hay diferencia significativa debido a que el valor de ($P > 0.05$).

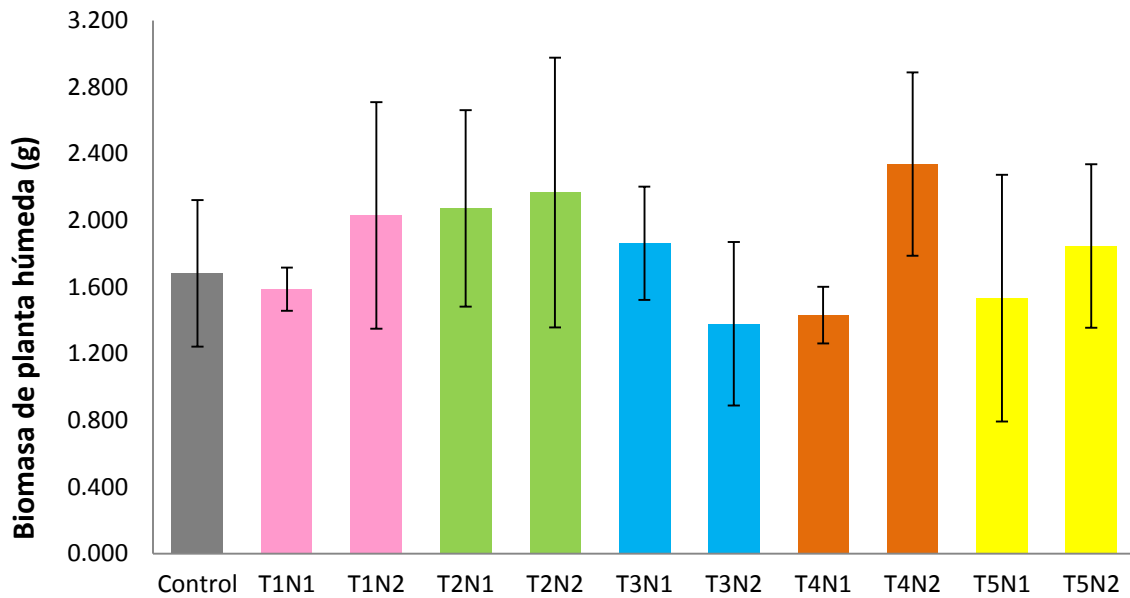


Figura 34. Biomasa de planta húmeda.

En la (Fig. 35) los tratamientos donde se inocularon aislados bacterianos no se observó mayor biomasa de hojas secas en los tratamientos inoculados con los aislados microbianos con respecto al control ($P>0.05$).

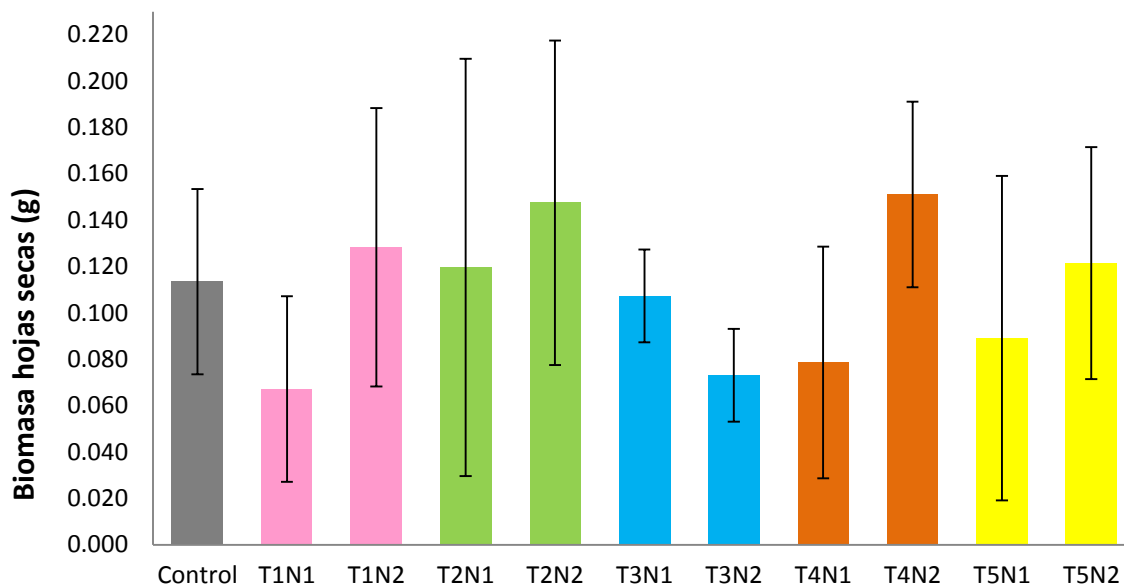


Figura 35. Biomasa de hojas secas.

El aislado bacteriano 3.b.2 incrementó significativamente la longitud de las raíces (12.2 cm) cuando se inoculó a una densidad de 1.5×10^9 bacterias (T4N2) con respecto al control (8.6 cm) ($P<0.05$; Fig. 36). Ver ANOVA y prueba de Tukey en el anexo 1.

Sin embargo, no existió diferencia significativa de la biomasa de raíz seca entre los tratamientos (Fig. 37).

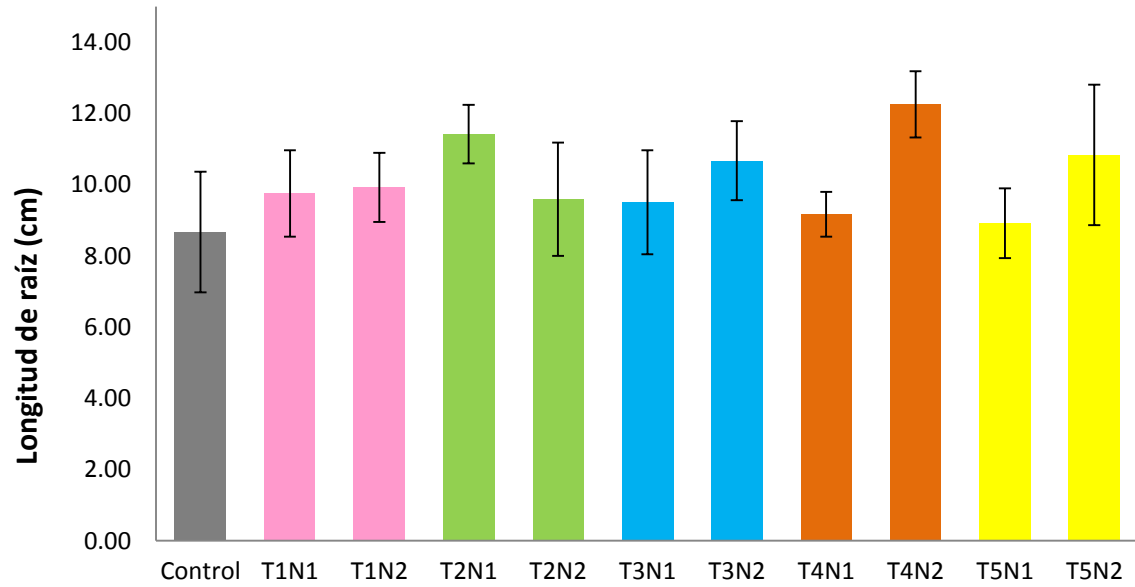


Figura 36. Longitud de raíz.

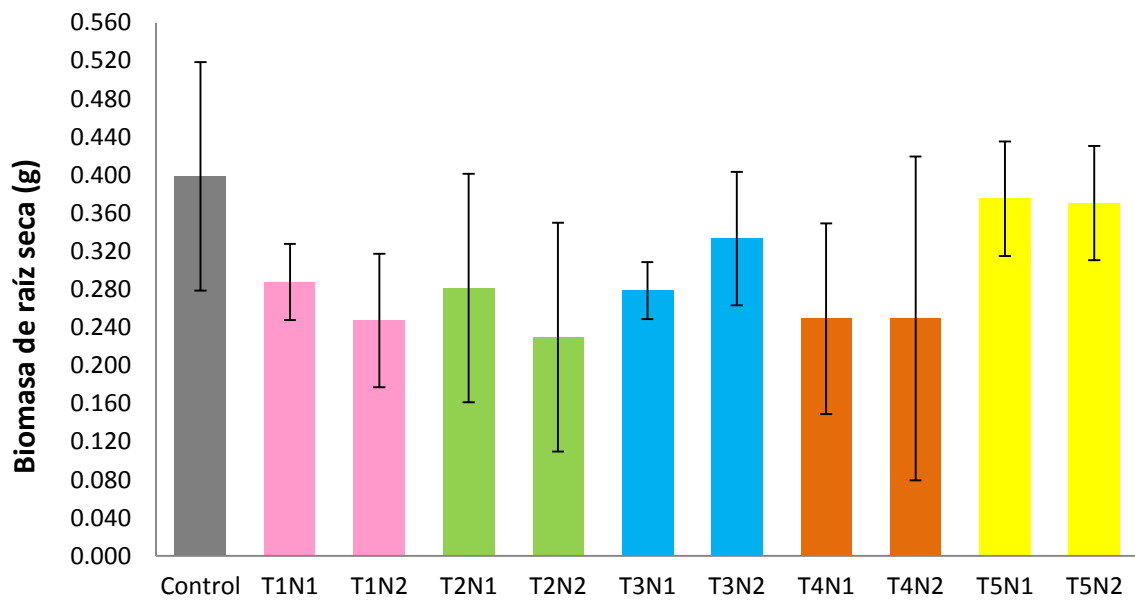


Figura 37. Biomasa de raíz seca.

10.3. Resultados de experimento DOE 2.

10.3.1. Resultados de DOE2 para la toma de decisión de corrida en biorreactor.

Tabla 11. Absorbancias a 530 nm para la concentración de AIA.

	pH: 7	pH: 8	pH: 9	pH: 10	
AB1	0.287	0.280	0.263	0.067	Corrida #A Temp: 32 °C rpm: 150
AB2	0.264	0.332	0.249	0.101	
AB3	0.345	0.252	0.307	0.091	
AB4	0.385	0.316	0.259	0.126	
AB5	0.259	0.318	0.287	0.097	
AB1	0.121	0.073	0.089	0.052	Corrida #B Temp: 32 °C rpm: 250
AB2	0.070	0.153	0.170	0.055	
AB3	0.131	0.096	0.149	0.039	
AB4	0.151	0.127	0.162	0.042	
AB5	0.022	0.151	0.133	0.034	
AB1	0.264	0.193	0.155	0.035	Corrida #C Temp: 40 °C rpm: 150
AB2	0.170	0.248	0.258	0.170	
AB3	0.176	0.180	0.121	0.025	
AB4	0.190	0.169	0.192	0.041	
AB5	0.135	0.203	0.081	0.019	
AB1	0.279	0.292	0.151	0.109	Corrida #D Temp: 40 °C rpm: 250
AB2	0.290	0.229	0.324	0.169	
AB3	0.284	0.230	0.276	0.107	
AB4	0.329	0.335	0.338	0.311	
AB5	0.172	0.203	0.181	0.150	

AB=Aislado Bacteriano; AB1(5.b.3), AB2(P.3.1.bac2), AB3(1.3.b.5), AB4(3.b.2) y AB5(5.1.b.1).

La producción de AIA por los distintos aislados bacterianos estuvo en un intervalo de 6.005 a 10.073 $\mu\text{g/mL}$ tabla 12. Siendo el aislado bacteriano 3.b.2 (AB4) el que produjo más AIA bajo las siguientes condiciones: pH 7, 32°C y 150 rpm. Mientras que el aislado 5.1.b.1 (AB5) produjo la menor cantidad de AIA, bajo las siguientes condiciones: pH 10, 40°C y 150 rpm, existiendo diferencia significativa entre estos dos tratamientos ($P < 0.05$) (Ver ANOVA y prueba de Tukey en el anexo 1). La mayoría de los tratamientos con pH 10 ocasionaron valores bajos de producción de AIA.

Tabla 12. Concentración de AIA $\mu\text{g/mL}$ en tubos de plástico de 15 ml.

	pH: 7	pH: 8	pH: 9	pH: 10	
AB1	8.753	8.656	8.452	6.407	Corrida #A Temp: 32 °C rpm: 150
AB2	8.465	9.335	8.280	6.710	
AB3	9.505	8.321	9.000	6.616	
AB4	10.073	9.120	8.404	6.952	
AB5	8.403	9.142	8.750	6.673	
AB1	6.904	6.456	6.596	6.276	Corrida #B Temp: 32 °C rpm: 250
AB2	6.427	7.217	7.400	6.302	
AB3	6.993	6.662	7.180	6.162	
AB4	7.195	6.961	7.307	6.190	
AB5	6.028	7.199	7.017	6.128	
AB1	8.462	7.637	7.238	6.134	Corrida #C Temp: 40 °C rpm: 150
AB2	7.399	8.276	8.390	7.399	
AB3	7.456	7.501	6.904	6.051	
AB4	7.607	7.386	7.634	6.178	
AB5	7.037	7.754	6.527	6.005	
AB1	8.643	8.814	7.197	6.787	Corrida #D Temp: 40 °C rpm: 250
AB2	8.788	8.046	9.229	7.389	
AB3	8.711	8.059	8.611	6.767	

AB4	9.288	9.371	9.412	9.051	
AB5	7.416	7.754	7.515	7.188	

Concentración de AIA $\mu\text{g/mL}$ en función de las absorbancias de tabla 12 utilizando curva de calibración de AIA.

El valor en rojo es la concentración mas alta de AIA.

El experimento DOE2 permitió seleccionar los parámetros óptimos para el desarrollo de las bacterias productoras de AIA. Estos parámetros permitieron correr lotes en el biorreactor y analizar el batch que se corrió en el biorreactor de mayor rendimiento en el tiempo más corto y que produjo la mayor concentración de AIA, de esta manera se definió la optimización de los parámetros del biorreactor para una bacteria en específico, para esto fue necesario medir los diferentes valores de los siguientes factores: oxígeno disuelto, temperatura, pH, y agitación (rpm).

La optimización de los parámetros de operación de un biorreactor New Brunswick para la producción de AIA son presentados en las siguientes tablas y figuras para la aplicación de su análisis correspondiente.

En la tabla 13 se muestra un ejemplo de una corrida aleatoria realizada en el biorreactor New Bruswick. La corrida que se tomó de ejemplo para analizar la corrida 2A con la bacteria 5.b.3 (AB1) para la producción de AIA. En esta corrida se puede observar que existió una optimización de la biorreacción corrida en el biorreactor (concentración final de $157.50 \mu\text{g/mL}$ de AIA) con respecto a la misma muestra corrida en matraz Erlenmeyer en una incubadora rotatoria (concentración final de $79.94 \mu\text{g/mL}$ de AIA). El biorreactor como el matraz Erlenmeyer fueron corridos a la misma temperatura y agitación, pero no así en sus otros factores de control como los que aporta el sistema del biorreactor New Brunswick. La muestra inicial para ambos sistemas fue T0, la muestra final del biorreactor corresponde a T7 con una concentración de $157.50 \mu\text{g/mL}$ de AIA y la muestra final de la incubadora rotatoria es TF con una concentración de $79.94 \mu\text{g/mL}$ de AIA. El valor

de concentración de AIA en el biorreactor fue casi duplicado con un incremento de 97%, esto se debió principalmente a los factores que controla el biorreactor como son oxígeno disuelto a través del flujo de aire/agitación y control de pH.

Tabla 13. Muestras de corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).

Horas	# Muestra	F. Dilución	Abs. McFarland 600nm	Abs. AIA 530nm	Bactsx10 ⁶ /ml	AIA µg/mL
	Pre.Inoc.		0.383	0.451	470.55	11.06
	Inoc.		1.637	0.804	2166.58	17.61
0	T0		1.635	0.014	2164.33	5.97
1	T1		1.712	0.027	2268.02	6.07
2	T2		1.987	0.202	2640.41	7.74
3	T3	-1	1.463	0.263	19321.50	8.45
4	T4	-1	1.535	0.260	20295.30	84.11
5.5	T5	-1	2.112	0.703	28090.21	155.10
6.16	T6	-2	1.461	0.751	38588.91	164.93
6.57	T7	-2	1.425	0.715	37606.09	157.50±27.71
6.57	TF	-1	0.277	0.224	3280.85	79.94±10.01

Preinoculo: Pre. Inoc., Inoculo: Inoculo, Horas: Horas de corrida del biorreactor, F. Dilución: Factor de dilución, Abs: Absorbancia, TF: Tiempo final del batch del biorreactor, T7: Tiempo final de biorreacción en matraz Erlenmeyer, ± = desviación estándar, n=4.

En la (Fig. 38) observamos las gráficas de los factores de la corrida del biorreactor como lo son Temperatura, Agitación, pH, Oxígeno Disuelto y Flujo de Aire.

Algo importante a destacar además de lo observable en el perfil de las gráficas es que a medida que la gráfica de oxígeno disuelto disminuye, aumenta el crecimiento de biomasa bacteriana. Esta gráfica no es directamente registrada por el software ya que no cuenta con un sensor para este fin, pero la gráfica (Fig. 39) es obtenida a partir de los datos de cuantificación de biomasa realizados en un espectrofotómetro.



Figura 38. Perfiles de factores vs tiempo para corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).

La Fig. 39 muestra el perfil de aumento de la concentración bacteriana en el biorreactor en un periodo aproximado de 6.5 h.

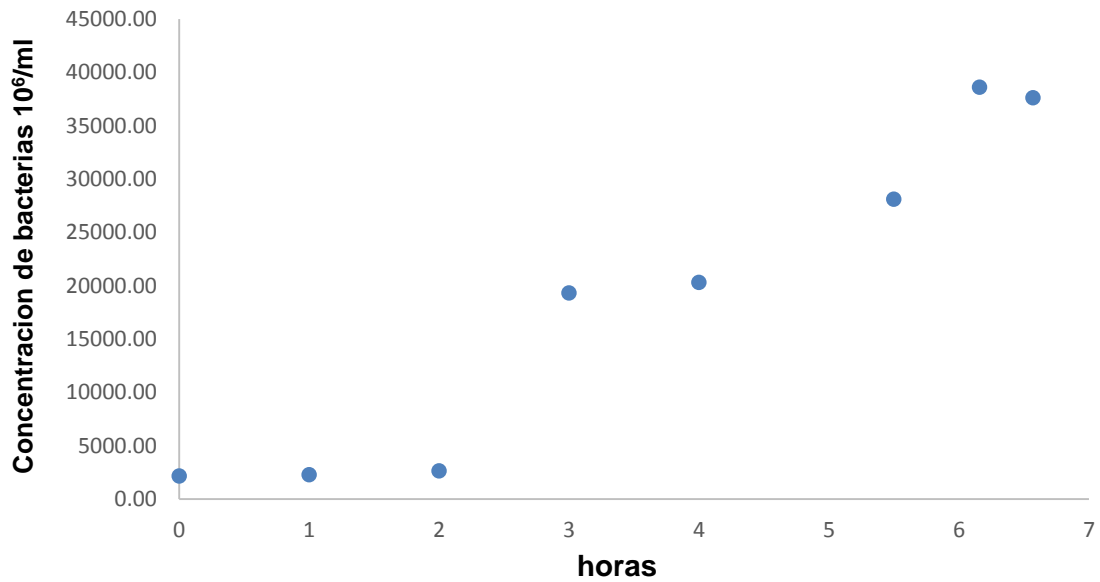


Figura 39. Concentración bacteriana vs tiempo de corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).

La (Fig. 40) muestra la concentración el perfil de aumento de la concentración de AIA en el biorreactor en un periodo aproximado de 6.5 h

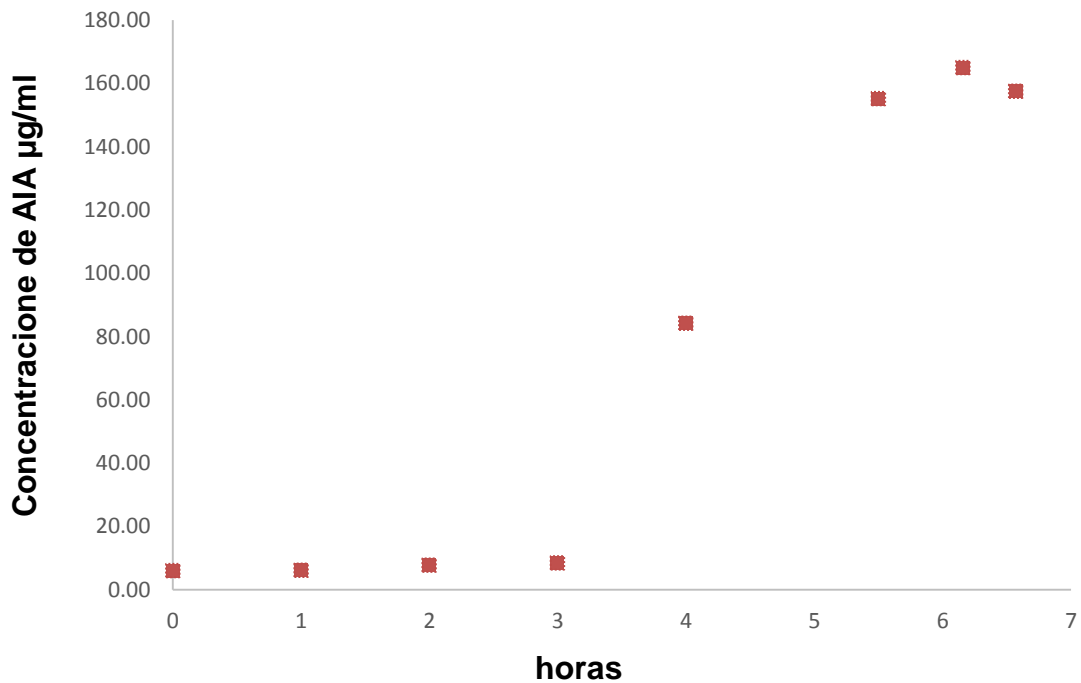


Figura 40. Concentración de AIA vs tiempo de corrida en biorreactor con AB1(5.b.3).

11. Conclusiones.

El primer experimento DOE1 se enfocó a la validación en macetas con la aplicación de los aislados bacterianos a la rizosfera de plantas de maíz para determinar los efectos sobre su crecimiento. Este experimento estuvo dirigido a la validación de la aplicación de los 5 aislados bacterianos productores de AIA inoculados directamente a la rizosfera de plantas de maíz para determinar la tendencia de mayor crecimiento en un determinado tratamiento. A pesar que no hubo diferencia estadística significativa en las variables altura, diámetro de tallo y biomasa entre los tratamientos inoculados y el control, se observó una tendencia a incrementar los valores de estas variables en los tratamientos T2N1, T2N2 (AB: P.3.bac2) y T4N2 (3.b.2) principalmente. El tratamiento T4N2 fue el que incrementó significativamente la longitud de las raíces con respecto al control.

El segundo experimento DOE2 se dirigió a la selección de los factores de optimización (temperatura, agitación, pH, oxígeno disuelto y flujo de aire) del biorreactor New Brunswick para producir biomasa bacteriana productora de AIA. Durante esta fase del experimento el aislado bacteriano que produjo mas AIA fue el aislado 5.b.3. Se demostró que la producción de AIA incrementa significativamente cuando se escala de condiciones en matraz a condiciones en biorreactor aplicando las condiciones de 35°C, pH 7, 600 rpm y OD= 100. Además, se redujo en un tercio el tiempo de producción.

Esta información nos permite afirmar que existe una optimización en la biorreacción llevada a cabo en el Biorreactor New Brunswick, apoyando con esto la hipótesis positiva planteada.

12. Referencias.

1. Ameni N., Emna B., Amal Ben R., 2018, Large-scale propagation of *Myrobolan* (*Prunus cerasifera*) in RITA bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity, p. 1.
2. Antolli G. P., Liu Z., 2012. Libro *Bioreactors: Desing, Properties and Applications*, Nova Science Publishers, Inc., Chapter I.
3. Bhattacharyya B. C., Banerjee S, Ghosh T. K., 2008, *Bioreactors: Functions in fermentation processes*. In: Pandey A., Larroche C.; Soccol C.R., Dussap C.G. Editors, *Advances in Fermentation Technology*. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., p. 172-201.
4. Buchanan, Gruissem, Jones, 2016, *Bichemestry & Molecular Biology of Plants*, Sixth impression, American Society of Plants Physiologist.
5. Celis B. L. X. y Gallardo I. R., 2008, Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indolacético y giberelinas) en cultivo microbianos, Tesis Licenciatura Pontificia Universidad Javeriana, p. 23-26.
6. Cinar A., Birol G., Parulekar S.J., Undey C., 2003, *Batch Fermentation: Modeling Monitoring and Control*, CRC Press, p. 648.
7. Constantinos E.V., Antranikian G., 2004. *Extremophiles: pH, temperature and salinity*, In Ass Press (ed), *Microbial diversity and bioprospecting*. Whashington, D.C. p. 146-152.
8. Fogler H. S., 2008. *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*, cuarta edición, p. 418.

9. García Ramírez Y., Freire Seijo M., Pérez B., 2015, Efecto del AIA en el enraizamiento in vitro de *Gigantochloa atter*, p. 181.
10. Hernández Mendoza J.L., Quiroz Velázquez J.D., Moreno Medina V.R., Mayek Perez N., 2008, Biosynthesis of anthranilic and indolacetic acids from tryptophan by one *Azospirillum brasilense* strain native from Tamaulipas, p. 58.
11. Ian L. Pepper, Charles Gerba, Terry Gentry, 2015, *Environmental Microbiology*, Third Edition, Academy Press
12. Lara C., Oviedo L., Alemán A., 2011, Aislados nativos con potencial en la producción del ácido indol acético para mejorar la agricultura, Universidad de Córdoba Colombia, p. 18.
13. López A. A. A., 2015, Bacterias extremófilas y su potencial en la producción de auxinas y metabolitos con actividad tensoactiva. Tesis de licenciatura Bioingeniería. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
14. Lulu T., Park S. Y., Ibrahim R., Paek K. Y., 2015, Production of biomass and bioactive compounds from adventitious roots by optimization of culturing conditions of *Eurycoma longifolia* in balloon-type bubble bioreactor system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, p. 712–717.
15. Matos R. A., Capote I. B., Pérez M. A., Lezcano M. Y., Aragón A. C. E., Pina M. D., Vives H. K., Daquinta G. M., Escalona M. M., 2016 Propagación In Vitro de cultivares de *Moringa Oleífera* Lam, Ministerio de Educación Superior, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas Cuba, p. 49.

16. Mc. Dougall J., Hillman J. R., 1978, Analisis of índole-3acetic acid using GC-MC techniques. In: Isolation of plant growth substances. Ed. J.R. Hillman, Cambridge University Press, Londres.
17. Meena O. P., Maurya B. R., Meena V. S. 2013 Influence of K-solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica, p. 53-56.
18. Michael T. Madigan, Jhon M. Martinko. et al. 2015, Brock Biología de los microorganismos, 14 Edición, Pearson.
19. Mose R., Ciaramella M., Cannon R., Pisani F. M., Moraca M., Batolucci S., 2002, Extremophiles. J. Bacteriol, p. 3683-3689.
20. Pandey A., Larroche C., Soccol C.R., Dussap C.G., Editors, 2008, Advances in Fermentation Technology. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. Chapter 7. Bioreactors: Functions in fermentation processes, p. 172-201.
21. Padilla C. I. J. 2015. Estudio y caracterización de un hongo aislado de suelo de Mexicali, B.C. Tesis de licenciatura. Bioingeniería. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
22. Perry R. H, Green D. W., 2003, Manual del Ingeniero Químico, Cuarta Edición Cap. 24-9 Ingeniería Bioquímica.
23. Rashmi M. P., Vinaya M., Vedamurthy A. B., Nayeem A., 2012, Efectiveness of auxins in inducing in vitro adventitious root formation in *Tylophora indica*. P.G. Departamet of Biotechnology, the Oxford Collage of Science, p. 3357.
24. Rastogi A., Siddiqui A., Mishra B.K., Srivastava M., Pandey R., Misra P., Singh M., Shukla S., 2013, Effect of auxin and gibberellic acid on growth and yield componts of linseed (*Linum usitatissimum* L.), p. 136

25. Román G. F., 2003, Concentración de reguladores del desarrollo vegetal inducida por hongos endomicorrizicos en dos cultivares de chile. Tesis grado doctoral, Universidad de Colima, p. 36-37.
26. Sarmiento López L.G., 2014, *Basillus circulans* E9 productora de ácido indol acético en medio de cultivo de bajo costo a nivel biorreactor. Tesis grado maestría, IPN departamento de biotecnología, p. 17.
27. Saldaña R. R. 2016. Bacterias asociadas a plantas de la Laguna la Salada, Baja California, y posibles aplicaciones en la industria. Tesis de licenciatura. Bioingeniería. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
28. Schaechter M., Lederberg J., 2004, *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. New York: Elsevier Academic Press, p. 1149.
29. Sánchez Leyva I.M., 2015, Hongos micorrizicos arbusculares asociados a plantas de la laguna la salada, baja california. Tesis de licenciatura. Bioingeniería. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
30. Vega Celedón P., Canchignia Martínez H., González M., Seeger M., 2016, biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias, p. 35.
31. Xi-Hua C., Debasis C., Eun-Jung L., 2010, Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor, p. 1.

Anexo 1. ANOVA de Experimento DOE 1

Analysis of Variance Altura de planta.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	10	613.7	61.37	1.48	0.170
Error	55	2273.1	41.33		
Total	65	2886.8			

Analysis of Variance Diámetro de tallo.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	10	4.654	0.4654	2.49	0.015
Error	55	10.285	0.1870		
Total	65	14.939			

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Diámetro de tallo.

C1	N	Mean	Grouping
T2N1	6	3.715	A
T2N2	6	3.7017	A
T4N2	6	3.453	A B
T1N2	6	3.348	A B
T3N1	6	3.312	A B
Ctrl	6	3.248	A B
T1N1	6	3.210	A B
T5N2	6	3.122	A B
T4N1	6	3.077	A B
T3N2	6	2.958	A B
T5N1	6	2.835	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Analysis of Variance Biomasa planta húmeda.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	10	5.984	0.5984	1.91	0.064
Error	55	17.256	0.3138		
Total	65	23.241			

Analysis of Variance Biomasa hojas secas.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	10	0.04965	0.004965	1.96	0.056
Error	55	0.13918	0.002530		
Total	65	0.18882			

Analysis of Variance Longitud de raíz.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	10	78.57	7.857	2.70	0.009
Error	55	159.92	2.908		
Total	65	238.48			

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Longitud de raíz.

C1	N	Mean	Grouping
T4N2	6	12.250	A
T2N1	6	11.417	A B
T5N2	6	10.83	A B
T3N2	6	10.667	A B
T1N2	6	9.917	A B
T1N1	6	9.750	A B
T2N2	6	9.583	A B
T4N1	6	9.167	A B

T3N1	6	9.000	A	B
T5N1	6	8.917		B
Ctrl	6	8.667		B

Means that do not share a letter are significantly different.

Analysis of Variance Biomasa de raiz seca.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	10	0.2118	0.02118	1.61	0.127
Error	55	0.7216	0.01312		
Total	65	0.9335			

Analysis of Variance Tabla. 11 Absorbancias a 530 nm para concentración de AIA

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	79	2.2216	0.028122	6.34	0.000
Error	160	0.7093	0.004433		
Total	239	2.9309			

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Tabla. 11 Absorbancias a 530 nm para concentración de AIA

C1	N	Mean	Grouping							
AB4PH732150	3	0.3853	A							
AB4PH832150	3	0.3597	A	B						
AB3PH732150	3	0.3447	A	B	C					
AB4PH940250	3	0.33767	A	B	C	D				
AB4PH840250	3	0.3350	A	B	C	D				
AB2PH832150	3	0.3323	A	B	C	D	E			
AB4PH740250	3	0.3287	A	B	C	D	E	F		
AB2PH940250	3	0.3240	A	B	C	D	E	F	G	

AB2PH1040150	3	0.1703	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB2PH1040250	3	0.1693	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB4PH840150	3	0.1690	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB4PH932250	3	0.1617	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB1PH940150	3	0.1550	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB2PH832250	3	0.1530	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB5PH832250	3	0.1510		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB1PH940250	3	0.1510		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB4PH732250	3	0.15067		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB5PH1040250	3	0.1500		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB3PH932250	3	0.1493		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB5PH740150	3	0.1353		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB5PH932250	3	0.1337		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB3PH732250	3	0.13067		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB4PH832250	3	0.12733		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB4PH1032150	3	0.12633		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB3PH940150	3	0.12133			C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB1PH732250	3	0.12133			C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB1PH1040250	3	0.1090				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB3PH1040250	3	0.1070				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB2PH1032150	3	0.1010					E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB5PH1032150	3	0.0973						F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB3PH832250	3	0.09600						F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB3PH1032150	3	0.09100							G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB1PH932250	3	0.0887								H	I	J	K	L	M	N	O	P		
AB5PH940150	3	0.08067									I	J	K	L	M	N	O	P		
AB1PH832250	3	0.07300										J	K	L	M	N	O	P		
AB2PH732250	3	0.06967											K	L	M	N	O	P		
AB1PH1032150	3	0.06767												K	L	M	N	O	P	
AB2PH1032250	3	0.05533													L	M	N	O	P	
AB1PH1032250	3	0.05200														M	N	O	P	
AB4PH1032250	3	0.04200															N	O	P	
AB4PH1040150	3	0.0407																N	O	P

AB3PH1032250	3	0.03833	N	O	P
AB1PH1040150	3	0.03533	N	O	P
AB5PH1032250	3	0.03467	N	O	P
AB3PH1040150	3	0.0250		O	P
AB5PH732250	3	0.02200			P
AB5PH1040150	3	0.01900			P

Means that do not share a letter are significantly different.

Anexo 2. Actividades auxiliares de instalación de biorreactor.

A continuación, se mencionan algunas de las actividades adicionales en las que el alumno participó para lograr la viabilidad del proyecto de tesis y que tuvieron un ligero impacto en la planeación de tiempos.

- Adquisición e instalación de chiller para el biorreactor (Fig. 41).
- Adquisición e instalación de sistema de filtrado de aire para el biorreactor (Fig. 42).
- Instalación de software y conexión de la interface entre consola del biorreactor y de la computadora.
- Actualización del firmware de la consola de control del biorreactor.
- Fabricación de dosificadores adicionales para frascos de aditivos del biorreactor.
- Invernadero: instalación del control de temperatura con cargas térmicas de calor y de refrigeración, bases para las plantas, cubierta plástica aislante.
- Reparación de fallas del software y calibración de la consola de del Biorreactor.
- Reparación de autoclave Tuttnauer 5075ELV para esterilizar el biorreactor.
- Adquisición de varios materiales menores: coples de las mangueras dosificadoras, filtros de 0.22 μm para biorreactor y jeringas, celdas para medición en espectrofotómetro, viales 5ml.



Figura 41. Chiller auxiliar.



Figura 42. Sistema de filtrado de aire.