

Análisis digital de imágenes para la caracterización microscópica de parámetros críticos en la producción fermentativa de metabolitos secundarios

Digital image analysis for microscope characterisation of the critical parameters involved in the fermentative production of secondary metabolites

Gabriel Corkidi¹, Leobardo Serrano-Carreón², Enrique Galindo³

Resumen

Los metabolitos secundarios, y particularmente los antibióticos, se encuentran entre el grupo de fármacos de mayor relevancia en el mercado mundial, y son producidos, en su mayoría, mediante el cultivo sumergido de hongos filamentosos. Desde el punto de vista hidrodinámico, estos procesos involucran fundamentalmente la dispersión de hasta cuatro fases diferentes: agua-aceite-aire-hongo. Aun cuando se sabe que la hidrodinámica del cultivo determina la eficiencia global del proceso de fermentación, poco se ha logrado en cuanto al entendimiento de las relaciones hidrodinámica-dispersión-fisiología-productividad. Esto se debe en parte a la falta de metodologías que permitan cuantificar y caracterizar con precisión tanto la viabilidad del hongo (ya que en buena medida determina el rendimiento y la productividad del metabolito de interés), como el tamaño de las burbujas de gas y de gotas de aceite (ya que de ello depende la eficiencia de transporte de nutrientes como el oxígeno y los ácidos grasos del aceite). En este trabajo se resume y revisa el desarrollo de las metodologías que nuestro grupo ha publicado, basadas en el procesamiento y el análisis digital de imágenes aplicadas al estudio del cultivo de *Trichoderma harzianum*, hongo que produce antimicóticos de alta potencia (como la 6-pentil-alfa-pirona). Con el uso de estas metodologías hemos generado conocimiento básico de los fenómenos que ocurren en el fermentador, lo que nos ha permitido establecer estrategias para incrementar la productividad de este tipo de procesos.

Palabras clave: cultivos miceliares, hidrodinámica, dispersión multifásica, fisiología microbiana, productividad, análisis de imágenes.

-
- 1 Unidad de Microscopía Avanzada, Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México. corkidi@ibt.unam.mx
 - 2 Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México. leobardo@ibt.unam.mx
 - 3 Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca. Morelos. México. galindo@ibt.unam.mx

Abstract

Secondary metabolites, particularly antibiotics, are among the most relevant pharmaceutical compounds worldwide and they are generally produced by submerged cultivation of filamentous fungi. From the hydrodynamical point of view, these processes deal with the dispersion of up to four different phases: water-oil-air-fungi. It is well recognized that hydrodynamics has a significant influence on the global performance of the fermentation process; however, very little is understood about the relationships between hydrodynamics-dispersion-physiology-productivity. This poor understanding is partially due to the lack of precise methodologies to assess fungal viability (determining both the yield and productivity of the metabolite) and the size of the air bubbles and oil drops (related to the nutrient transport efficiency like oxygen and fatty acids). In this work, the published developments of our group, regarding image analysis-based methodologies for the study of *Trichoderma harzianum* cultivation for antimycotics production (v.g. 6-pentyl-alpha-pyrone) have been summarized and revised. The application of such methodologies resulted in the improvement of basic knowledge of the phenomena occurring within the fermenter as well as in the development of strategies for increasing the productivity of these processes.

Key words: micelial cultures, hydrodynamics, multiphasic dispersión, microbial physiology, productivity, image analysis.

Recibido: abril 14 de 2008

Aprobado: mayo 21 de 2008

Introducción

El crecimiento de la industria biotecnológica se ha basado de manera importante en el uso de hongos filamentosos como fuente principal de enzimas y metabolitos como antibióticos, ácidos orgánicos, pigmentos y otros aditivos alimentarios. Su capacidad para producir metabolitos de alto valor agregado a partir de materias primas de bajo costo ha impulsado un gran esfuerzo de investigación tanto en el mejoramiento de cepas mediante técnicas de biología molecular como en la optimización de los procesos de producción. Así, en 1996 el mercado mundial de antibióticos era de 23 billones de dólares, de los cuales el 77% fue producido por microorganismos filamentosos (Demain, 1999).

Por otra parte, a partir de la década de los ochenta, se ha llevado a cabo una búsqueda sistemática de drogas con actividades biológicas diferentes a la antibiosis. Así, se desarrollaron técnicas para la selección de cepas productoras de metabolitos con actividades antitumorales, antihipersensitivas, inmuoestimulantes, anti-diarreicas y antimutagénicas. Entre éstos, las ciclosporinas inmunosupresivas y las mevalo-

ninas (con actividad antihipersensitiva) son dos de los metabolitos más importantes con aplicaciones farmacéuticas, producidos por hongos, descubiertos a finales del siglo pasado. Aunado a lo anterior, el desarrollo de las técnicas de la ingeniería genética y la biología molecular ha colocado a los hongos filamentosos en una posición privilegiada en el desarrollo de procesos comerciales de frontera, principalmente en la producción de proteínas heterólogas de uso farmacéutico. Lo anterior permite afirmar que se acerca una segunda “edad de oro” para la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos que crecen formando redes tridimensionales compuestas por filamentos (hifas) de pared celular rígida y gruesa (figura 1). El crecimiento de las hifas se lleva a cabo en la región apical (puntas). Cuando una nueva punta se forma, ésta crece hasta alcanzar una cierta longitud donde, en función de las condiciones ambientales, puede llegar a formar otra punta (ramificación). Durante su crecimiento en

fermentadores agitados mecánicamente, los hongos desarrollan dos tipos de morfología extrema: *pellets* o agregados de hifas compactos semisféricos (en donde limitaciones nutricionales hacia el centro del *pellet* representan la restricción principal de crecimiento), y aquella filamentosa o de micelio disperso donde el incremento en la viscosidad del caldo de cultivo conduce a la formación de gradientes nutricionales dentro del biorreactor (fermentador). Así, la morfología

desarrollada por los cultivos miceliares influye en la productividad de los procesos. Particularmente, se ha sugerido que los *pellets* favorecen la producción de metabolitos asociados al crecimiento, mientras que el crecimiento filamentoso (debido a una mayor diferenciación celular) favorece la biosíntesis de metabolitos secundarios. En este sentido, el crecimiento filamentoso ha sido reportado como favorable para la producción de diversos antibióticos y enzimas.



Figura 1. Influencia de la morfología miceliar sobre la hidrodinámica, transferencia de nutrientes y productividad de los procesos con microorganismos filamentosos.

Complejidad de los caldos de cultivo para la producción de metabolitos secundarios por hongos filamentosos

Muchos procesos de las industrias química, de alimentos y farmacéutica requieren de la dispersión de una fase inmiscible en una fase acuosa. Entre los líquidos inmiscibles que más se utilizan, como sustrato o como fase inmiscible para extraer, concentrar o eliminar efectos tóxicos, están los aceites. Tal es el caso de la producción por procesos de fermentación de

antibióticos y otros metabolitos liposolubles de interés comercial. Por otra parte, como se mencionó, la dispersión gas-líquido es también una operación muy importante en las fermentaciones aerobias, donde es necesario dispersar eficientemente el aire al cultivo para satisfacer la demanda de oxígeno del microorganismo con el fin de que éste desarrolle adecuadamente sus actividades metabólicas.

El proceso de homogenización de las fases se complica en el caso de fermentaciones

con hongos filamentosos, donde la fase sólida es también hidrodinámicamente importante ya que la biomasa miceliar hace al caldo de cultivo altamente viscoso. En estos procesos, la productividad generalmente está limitada por el mezclado (líquido-líquido (figura 2), gas-líquido y sólido-líquido-gas), que a su vez determina la transferencia de nutrientes y, en consecuencia, la productividad del proceso.

Derivado de lo anteriormente expuesto, es clara la extrema complejidad de las interacciones líquido(medio acuoso)-líquido(aceite)-sólido(hongo)-gas(aire) presentes en los cultivos miceliares para la producción de antibióticos y metabolitos secundarios. Gran parte de los estudios encaminados a lograr un mejor entendimiento de estos fenómenos y sus implicaciones en la fisiología y la productividad de los procesos han sido enfocados desde un punto de vista macroscópico; es decir, se ha estudiado el efecto de las variables del proceso (agitación, pH, temperatura, tensión superficial, etc.) sobre la productividad de los cultivos miceliares. Lo anterior ha conducido a que diferentes autores lleguen

a conclusiones muchas veces contradictorias y, finalmente, demasiado sistema-específicas, lo que ha impedido que puedan aspirar a tener una aplicación más generalizada.

Recientemente, y con el avance de la capacidad de cómputo de los sistemas personales, se ha visto un surgimiento del uso de sistemas de análisis de imágenes para el estudio de los fenómenos de dispersión y mezclado en sistemas modelo líquido-líquido-gas. Esto ha abierto una vía importante en el estudio de los mecanismos de transporte de nutrientes en sistemas de fermentación complejos. Sin embargo, la mayoría de los trabajos hasta ahora disponibles en la literatura se han limitado a sistemas de dos fases (líquido-líquido o líquido-gas) que no son representativos de la complejidad real en sistemas de fermentación. Además, estos sistemas han sido caracterizados mediante análisis bidimensional de imágenes y, debido a la limitada infraestructura hasta ahora utilizada, sólo en zonas muy específicas del tanque. Para resolver estas limitaciones, el trabajo aquí resumido constituye un esfuerzo pionero

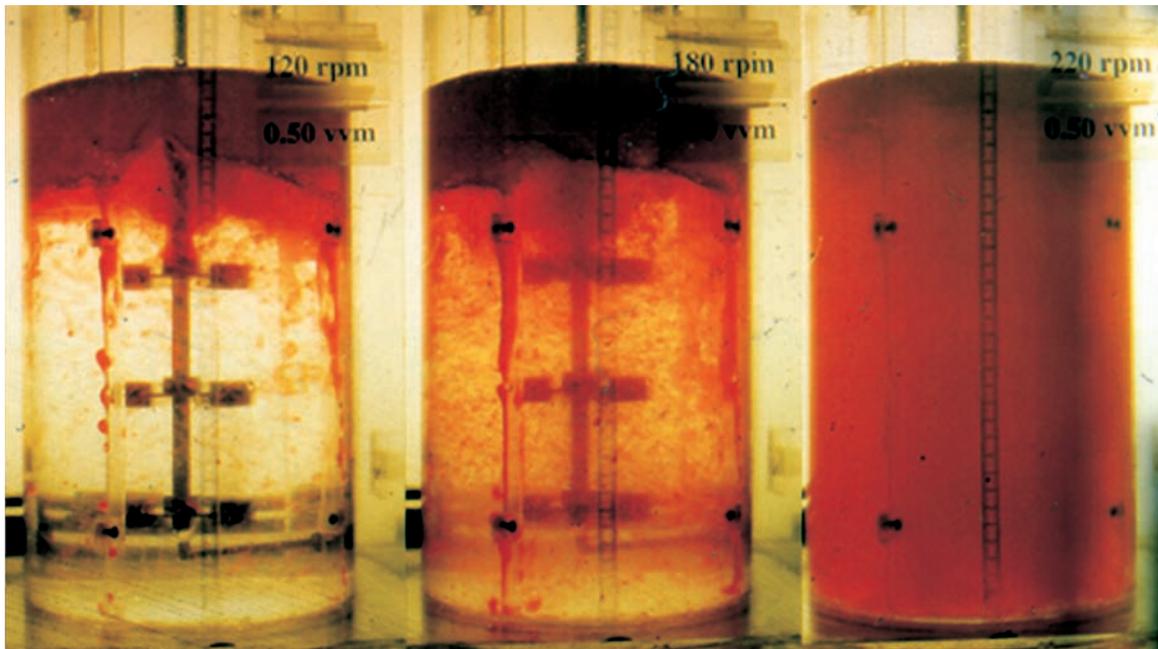


Figura 2. Proceso de homogenización de fases.

hacia el desarrollo de una herramienta sin precedentes para el estudio, *in situ* y en tiempo real, de lo que ocurre a nivel microscópico en un biorreactor con un caldo de fermentación de alta complejidad (hasta 4 fases).

Modelo de estudio: producción de 6-pentil- α -pirona por Trichoderma sp.

La 6-pentil- α -pirona (6PP) es una lactona (monoéster cíclico) insaturada, de 10 carbonos, ligeramente hidrofóbica, que presenta actividad fungicida sobre un amplio rango de fitopatógenos, y recientemente se ha reportado su efectividad contra el hongo *Trichophyton rubrum* (Omero et ál., 2004), responsable de infecciones dérmicas (uñas) en el ser humano. Estas infecciones son particularmente difíciles de erradicar mediante tratamientos convencionales (utilizando derivados de alilaminas y azoles administrados oralmente) que además presentan daños en el hígado como efectos secundarios.

La producción de la 6PP por hongos del género *Trichoderma* fue reportada por primera vez en 1972. La síntesis química de esta molécula requiere de 7 etapas de reacción y de temperaturas extremas de hasta 490 °C, por lo que su síntesis por vía microbiana (en donde las condiciones de operación no son tan extremas) representa una alternativa atractiva desde el punto de vista económico. Sin embargo, el mayor cuello de botella para desarrollar un proceso económicamente viable ha sido la toxicidad de la molécula hacia el microorganismo productor. Nuestro grupo de trabajo ha estudiado diversas estrategias para incrementar la producción de 6PP (metabolito inhibitorio para el microorganismo productor) en cultivos de *Trichoderma harzianum*. Inicialmente se implementó la recuperación *in situ* de la molécula en el caldo de fermentación mediante el uso de hexadecano como fase orgánica extrayente de la 6PP (Serrano-Carreón et ál., 2002). Mediante esta estrategia se logró incrementar la producción de la molécula debido a la disminución de la toxicidad

en el caldo. Por otra parte, en muchos cultivos de hongos filamentosos se ha demostrado la existencia de condiciones hidrodinámicas óptimas para el crecimiento o la producción de un metabolito dado, evidenciando una relación en forma de campana entre la productividad y la energía suministrada (Galindo et ál., 2004). En este sentido, se ha demostrado (a nivel macroscópico) que la producción de la 6PP es función de la hidrodinámica presente dentro del fermentador y responde a un cambio en el metabolismo de la fuente de carbono (Rocha-Valadez et ál., 2005). Sin embargo, es importante mencionar que en este sistema tan complejo y dinámico, las relaciones entre la hidrodinámica, la dispersión y el transporte de nutrientes, la fisiología del microorganismo y la productividad de los procesos están muy lejos de estar plenamente entendidas.

Nuestro proyecto se ha enfocado a la caracterización fina y detallada de estos aspectos, usando técnicas de análisis de imágenes que hemos desarrollado y adecuado para ese fin. Por una parte, se desarrolló una metodología para la cuantificación de la viabilidad del hongo que permitió estudiar el efecto de la hidrodinámica sobre la fisiología del microorganismo y la productividad del proceso. Por otra parte, se desarrolló un sistema de adquisición y análisis digital de imágenes para la caracterización *in situ*, en dos y tres dimensiones, de los fenómenos de transporte de nutrientes en cultivos miceliares complejos de hasta 4 fases (medio acuoso-fase orgánica extrayente-aire-hongo). Estas técnicas, y su aplicación, se encuentran en la frontera del conocimiento y han permitido entender los mecanismos que gobiernan el transporte de nutrientes —a nivel microscópico— en los procesos de fermentación involucrados en la producción de metabolitos secundarios por hongos filamentosos y, con ello, abren una puerta para el mejoramiento de tales procesos sobre bases científicas. Este trabajo presenta un resumen del desarrollo y la aplicación de estas metodologías, así como las principales aportaciones científicas derivadas del mismo.

Desarrollo de las metodologías utilizadas

Caracterización ex-situ de la viabilidad del hongo

Para la cuantificación de la viabilidad del hongo se desarrolló una técnica fluorescente basada en el hecho de que las células metabólicamente activas son capaces de hidrolizar intracelularmente el diacetato de fluoresceína (FDA) produciendo la fluoresceína, compuesto que al fluorescer permite cuantificar el porcentaje de células viables en los agregados celulares. Esta metodología, única reportada para cuantificar la viabilidad de un cultivo miceliar, no podría haber sido implementada sin la ayuda de una metodología de análisis de imágenes *ad hoc*. La metodología desarrollada, además de precisa, permite llevar a cabo la cuantificación de la viabilidad de un cultivo miceliar de manera muy rápida y casi automática (Hassan et ál., 2002).

Para llevar a cabo esta cuantificación es necesario tomar una muestra del caldo de cultivo y adicionar una solución de diacetato de fluoresceína para lograr una concentración final de 7,5 µg/mL. Esta suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y parte de ella es colocada en un portaobjetos para

su observación al microscopio. Las imágenes digitales provenientes de la cámara fueron digitalizadas. Utilizando este sistema, cada toma fue adquirida dos veces: la primera utilizando luz blanca con el fin de adquirir el área total de cada agregado; en la segunda adquisición se utilizó luz ultravioleta para la detección del área fluorescente (metabólicamente activa). Al terminar, se enfocó otro campo al microscopio para adquirir otro juego de imágenes y así hasta adquirir de 90-120 agregados diferentes.

Como se mencionó, se generaron dos archivos para el procesamiento de las imágenes (uno con luz blanca y otro con las imágenes fluorescentes). Las imágenes obtenidas fueron procesadas para corregir la heterogeneidad del fondo y eliminar ruido para su posterior segmentación. Se logró la detección adecuada de los bordes del hongo, maximizando la separación entre pixeles oscuros (correspondientes al hongo), y los pixeles claros (correspondientes al fondo).

El porcentaje de la biomasa activa (viabilidad) fue calculado como la proporción del área teñida (en la imagen fluorescente) entre el área total detectada en la imagen con luz blanca. Un ejemplo de las imágenes (antes del procesamiento) se muestra en la figura 3.

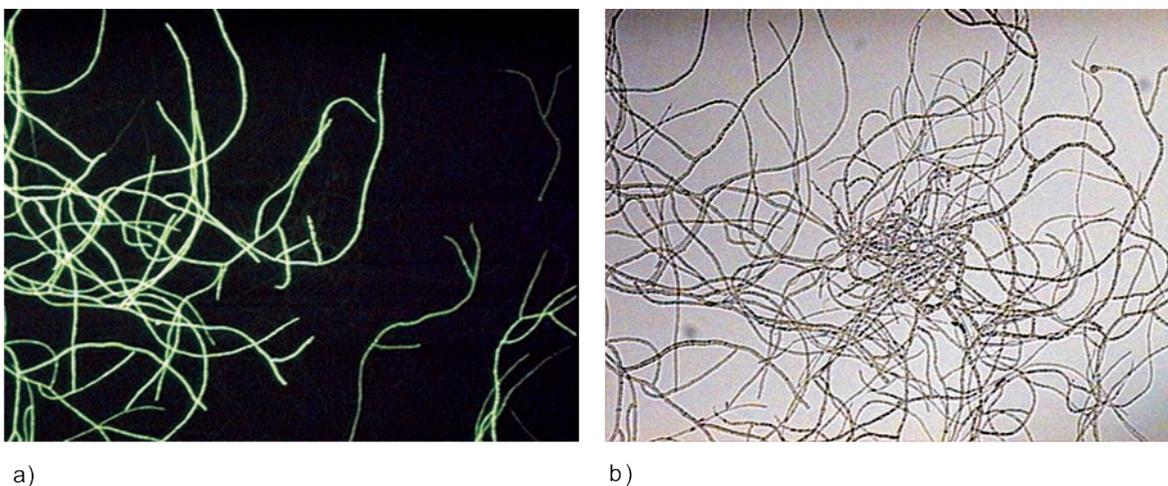


Figura 3. Fotomicrografías (10 X) de *Trichoderma barzianum* teñido con diacetato de fluoresceína.

- a) Sólo las regiones metabólicamente activas pueden ser detectadas en la imagen fluorescente.
b) El área total del agregado es detectada en microscopía con luz blanca.

Caracterización *in situ* de los fenómenos de transporte

Configuración general del sistema y descripción de sus capacidades

Uno de los principales problemas que presenta el monitoreo en línea computarizado de las dispersiones que ocurren dentro de un cultivo microbiano en un fermentador bajo condiciones de agitación mecánica, es la dificultad en la adquisición de imágenes de alta calidad de los eventos microscópicos que ocurren a altas velocidades en el tanque. El problema es más complejo cuando se requiere analizar zonas más profundas del biorreactor (como por ejemplo las zonas más cercanas a los impulsores), ya que las condiciones de iluminación y de velocidad son aún más críticas. Más aún, los fenómenos dinámicos que ocurren en el tanque generan estructuras complejas, como por ejemplo gotas de la fase aceitosa que contienen en su interior fracciones de otras fases (como agua y aire), las cuales son imposibles de caracterizar con precisión con métodos tradicionales de análisis de imágenes en dos dimensiones.

Con base en estos requerimientos, desde hace varios años nuestro grupo de trabajo ha estado trabajando en el diseño de un sistema de análisis de imágenes original, que permita la caracterización cuantitativa de las dispersiones que ocurren dentro de un fermentador modelo, tanto en dos como en tres dimensiones. A continuación se describen las configuraciones principales del sistema de análisis de imágenes diseñado, el cual ha permitido resolver los problemas antes mencionados.

Adquisición micro-estereoscópica de imágenes en dos y tres dimensiones del interior del biorreactor

La figura 4 muestra la configuración para análisis en dos y tres dimensiones, que se puede llevar a cabo en zonas cercanas a la pared del tanque. El sistema consta principalmente de un tanque “modelo” de vidrio de 10 litros, mon-

tado en un soporte, alineado axialmente con una turbina de mezclado que administra potencia al sistema. De manera externa, se montó un soporte que sostiene un estereomicroscopio. El sistema incluye una fuente de iluminación estroboscópica, la cual fue sincronizada a dos cámaras de TV a través de un dispositivo electrónico construido por nosotros. De esta manera, las partículas que se mueven a alta velocidad en el tanque de mezclado son captadas únicamente durante el centelleo de la luz estroboscópica (10 microsegundos), lo que permite obtener imágenes “no movidas” de alta calidad de los eventos que ocurren en el tanque (descrito en detalle en Taboada et ál., 2003). Esta luz es transmitida al interior del tanque por medio de una guía de luz de fibra óptica, la cual es alineada con el punto focal de las cámaras de TV. Es importante hacer notar que la distorsión que produce la pared cilíndrica del tanque es corregida con una chaqueta cúbica llena de agua, instalada entre el tanque y las cámaras de TV. Al sistema se le suministra oxígeno, mediante burbujas de aire a través de un difusor. La figura 5 muestra ejemplos de imágenes de alta calidad adquiridas en dos dimensiones, mostrando diferentes fenómenos.

Para la adquisición de imágenes en tres dimensiones, el estereomicroscopio fue mecánicamente modificado para poder instalarle dos cámaras de TV en los oculares del mismo. Cabe hacer notar que los estereomicroscopios comerciales sólo tienen capacidad para una sola cámara de TV (observación de sólo una de las dos imágenes del par estereoscópico). De hecho, estos equipos están diseñados para poder tener el efecto tridimensional visual solo a través de los oculares del microscopio y no a través de equipo electrónico. Las cámaras de TV están conectadas a una sola tarjeta de adquisición de imágenes RGB (instalada en una computadora de tipo personal), de tal manera que una de ellas está conectada al canal *rojo* y la otra a los dos canales restantes *verde* y *azul*. De esta manera, obtenemos una imagen estereoscópica combinada en *rojo* y *cyan* (figura 6) (descrito en detalle en Corkidi et ál., 2008), la cual

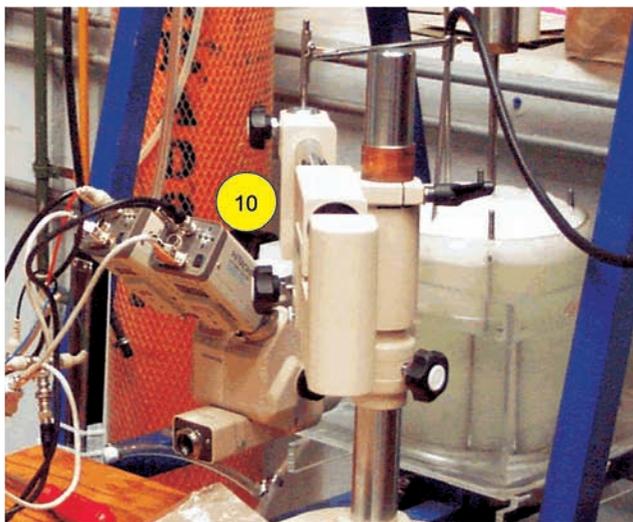


Figura 4. Sistema de adquisición de imágenes en 2 y 3 dimensiones, configuración para analizar zonas cercanas a la pared del tanque. 1) computadora; 2) cámara de TV; 3) sincronizador de estroboscopio; 4) estereomicroscopio; 5) soporte; 6) estroboscopio; 7) impulsor; 8) turbina Rushton; 9) guía de luz de fibra óptica; 10) adaptación a 2 cámaras TV para análisis en 3D.

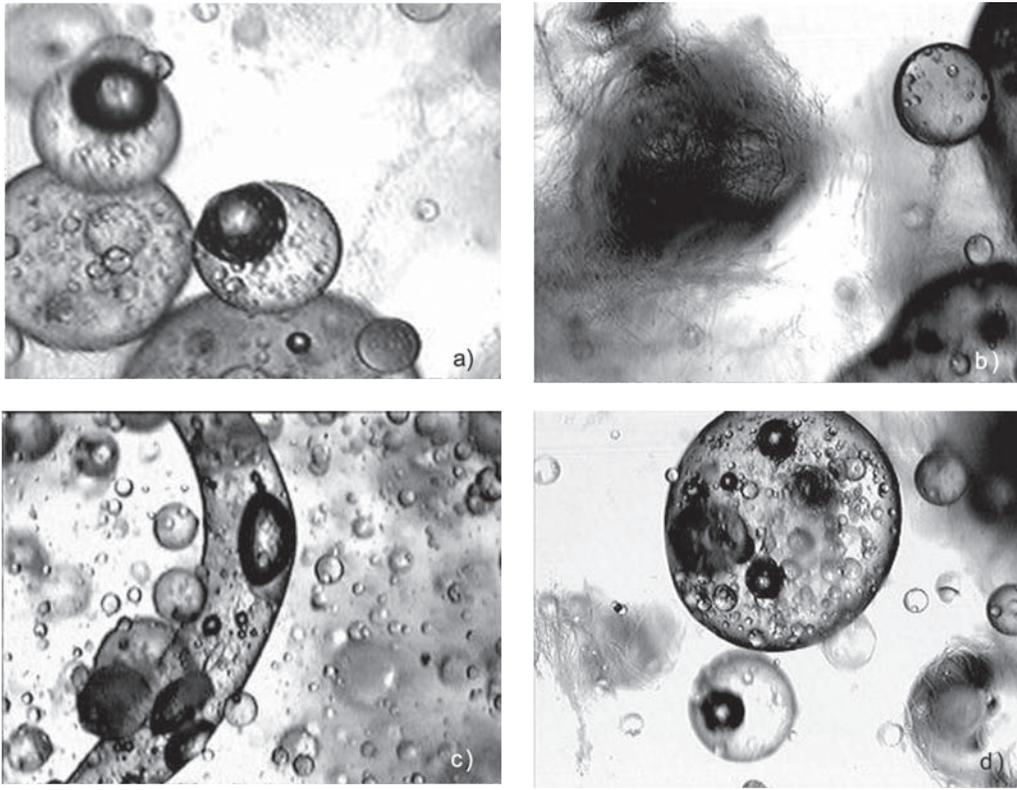


Figura 5. Imágenes típicas de alta calidad (2 dimensiones) obtenidas con el sistema desarrollado:
 a) gotas de aceite con superficie lisa, burbujas de aire libres y burbujas atrapadas en aceite;
 b) interacción del micelio con gotas y burbujas; c) estructuras no esféricas;
 d) estructuras complejas representativas de dispersiones múltiples.

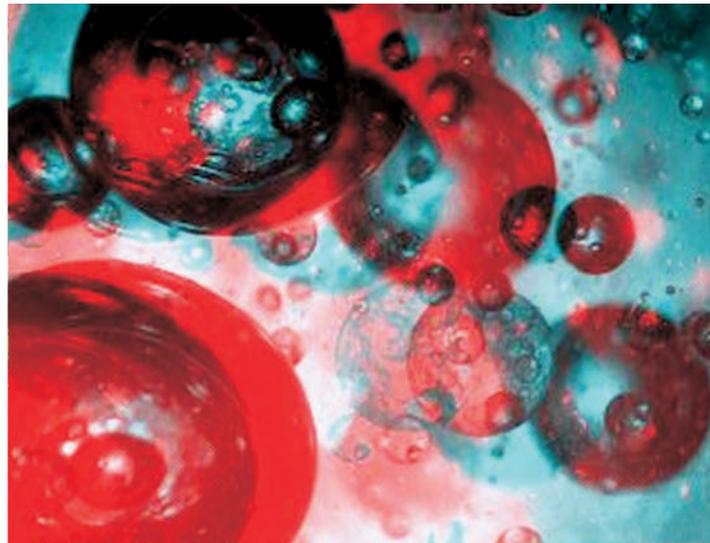


Figura 6. Imágenes estereoscópicas adquiridas, mostrando el efecto tridimensional al verse con lentes estereoscópicas.

puede ser observada con efecto tridimensional a través de lentes especiales.

Detección automática (segmentación) de partículas esféricas (gotas de aceite, burbujas de aire)

Una vez solucionado el problema de la adquisición de las imágenes, la dificultad por resolver es la detección (segmentación) de las gotas y burbujas de las imágenes adquiridas. En general, la segmentación automática es una de las tareas más complicadas dentro del monitoreo de la dispersión de fases, característica que en última instancia lleva al éxito o fracaso del proceso de análisis.

La segmentación de las gotas y burbujas resulta compleja debido a la diversidad de objetos y artefactos que se pueden presentar en un campo dado, el traslape, el contraste heterogéneo y la similitud entre ellos. Debido a estos problemas, los métodos de segmentación tradicionales no funcionan para discriminar los objetos de interés de la imagen ya que los objetos no tienen un brillo uniforme e incluso tienen regiones de la misma luminosidad del fondo.

Para resolver este problema de segmentación diseñamos un método basado en la transformada de Hough (descrito en Taboada et ál., 2006). Un proceso global es aplicado

previamente a las imágenes para poder llevar a cabo la segmentación por Hough, tal como se muestra en la figura 7. Después de la aplicación de varios filtros digitales, se obtiene finalmente una imagen que contiene segmentos de arco que corresponden a secciones de bordes de los objetos de interés, en este caso, burbujas de aire (en negro) y gotas de aceite (semi-transparentes).

Una vez filtradas las imágenes, se implementó un algoritmo conocido como la transformada de Hough (1962), el cual se puede utilizar para el reconocimiento de objetos de cualquier tipo de estructura definida por una función matemática simple como es el caso de círculos, curvas o arcos, por mencionar algunos. La idea básica es mapear los *pixels* de los segmentos detectados hacia un espacio transformado definido, de tal manera que los *pixels* pertenecientes a la curva o borde de interés se proyecten sobre un mismo punto en ese espacio (figura 8). Si en la imagen hay presentes muchos *pixels* que pertenecen todos a la misma curva, ellos darán origen a un pico en el espacio de Hough. La transformada de Hough es utilizada para la detección de los contornos de las burbujas por medio de la búsqueda de sus circunferencias. La figura 9 muestra algunos ejemplos de la segmentación lograda en 2, 3 y 4 fases, utilizando la metodología descrita.

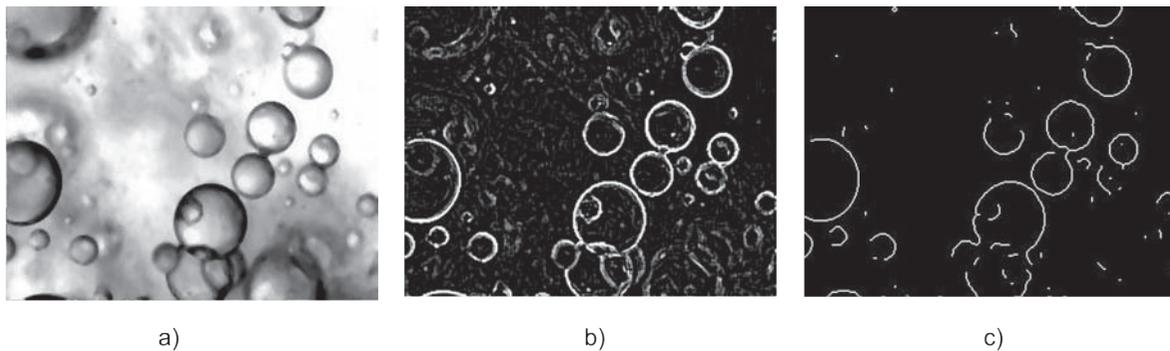


Figura 7. Proceso de filtrado para el mejoramiento de la segmentación: a) imagen original; b) detección de bordes por operador Laplaciano; c) imagen binaria resultante después de aplicar filtros de erosión-dilatación.

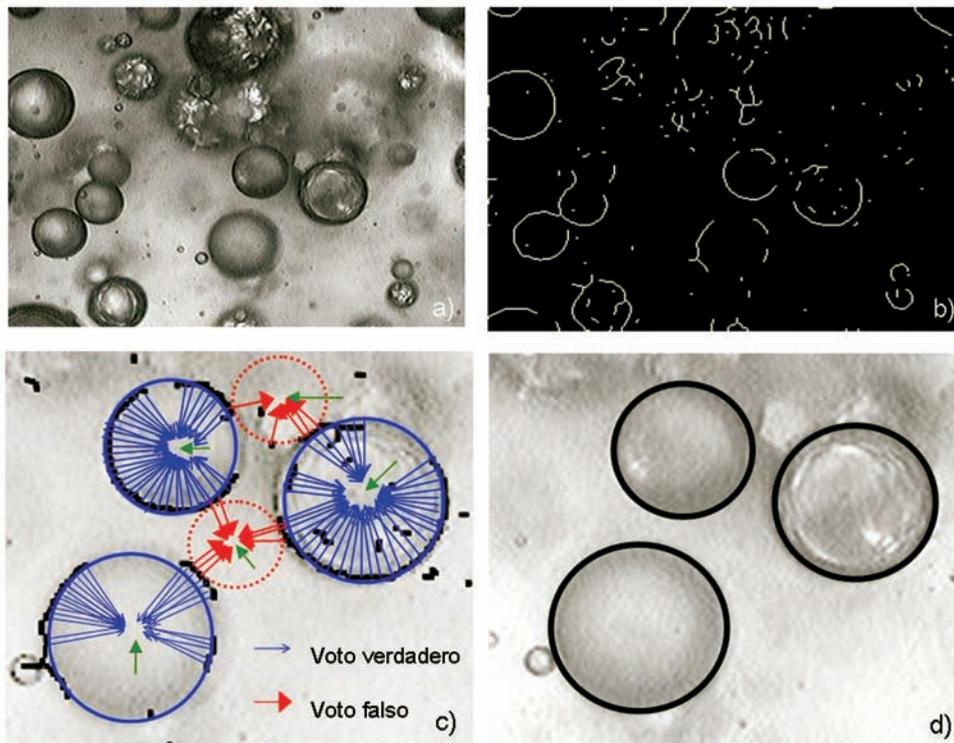


Figura 8. Proceso de segmentación usando un método mejorado basado en la transformada de Hough: a) imagen original adquirida por el sistema; b) imagen binaria pre-procesada conteniendo puntos de segmentos potencialmente pertenecientes a las partículas; c) representación esquemática (algunos puntos, detalle de la figura 8-a) para entender el proceso de votación para un círculo verdadero o falso C_i con centro (x, y) y radio r_i ; d) gotas segmentadas.

Análisis tridimensional de partículas

En procesos de fermentación multifásicos de interés farmacéutico, caracterizados con técnicas de análisis de imágenes, se han observado interacciones muy complejas entre las fases (aire, agua, aceite, biomasa) y la formación de estructuras que contienen burbujas de aire y lo que parecen ser pequeñas gotas de la fase acuosa atrapadas en gotas de aceite (figura 10). Con las técnicas actuales no es posible establecer en forma rigurosa si estas estructuras están incluidas (o sólo se traslapan) con las gotas de aceite. Por tanto, desarrollamos un método de adquisición y de análisis de pares de imágenes estereoscópicas dentro de cultivos para determinar la posición tridimensional relativa

de partículas dentro del fermentador modelo, a partir de las imágenes estereoscópicas adquiridas con dos cámaras de video. Se utilizaron algoritmos para el cálculo de profundidades relativas entre burbujas o gotas con el fin de discernir si provienen de planos diferentes o si están físicamente unas dentro de otras.

El sistema de análisis se basó en el mismo principio que el de los ojos humanos con los cuales logramos ver los objetos cotidianos en tres dimensiones, esto debido a la interpretación que hace el cerebro de las imágenes provenientes de los dos ojos. Estas dos imágenes no son iguales: representan la misma escena pero vista desde un ángulo diferente. Estas pequeñas diferencias son las que dan el efecto de profundidad. En nuestro caso, obte-

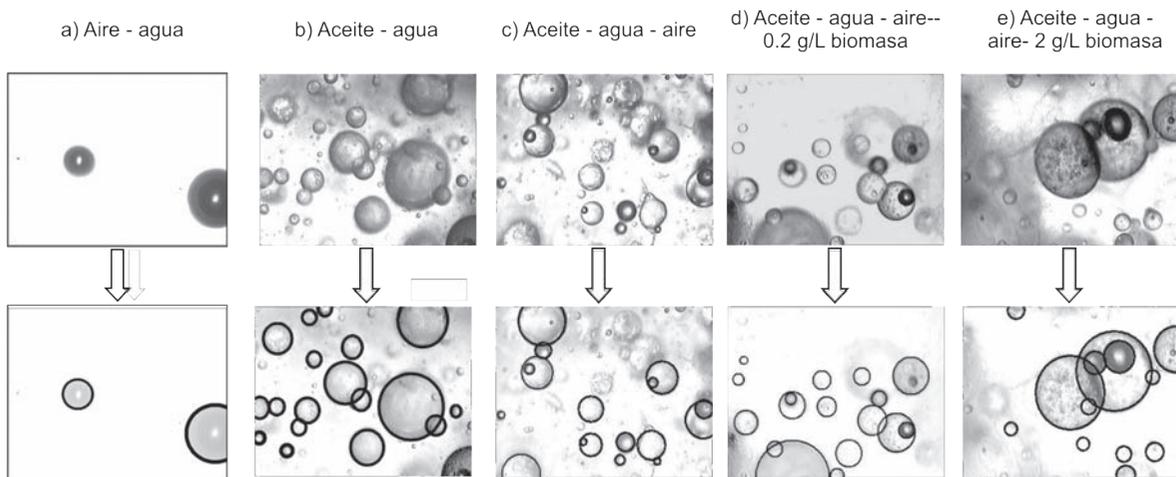


Figura 9. Ejemplos de imágenes adquiridas y segmentadas por el sistema: a) burbujas de aire, b) gotas de aceite, c) gotas y burbujas, d) gotas y burbujas con 0,2 g/L biomasa, e) gotas y burbujas con 2,0 g/L biomasa.

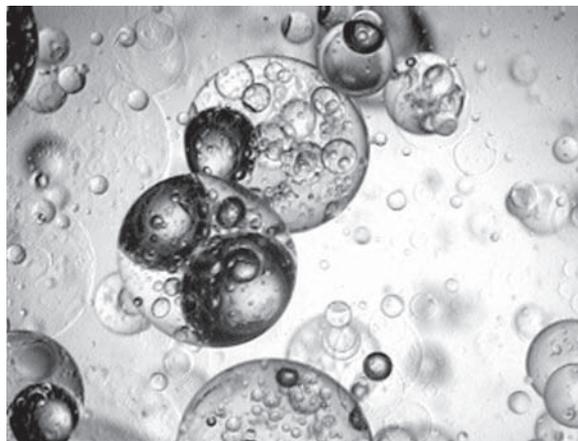


Figura 10. Imagen adquirida (dos dimensiones) que muestra las estructuras complejas formadas en el tanque de mezclado. Se observan gotas de aceite con aparentes partículas en su interior. En esta imagen no es posible determinar con precisión si las partículas están realmente en el interior de las gotas de aceite o si se trata de un traslape visual de partículas en diferentes planos focales.

nemos estas condiciones con el microscopio: los dos oculares están separados con la ayuda de un sistema óptico por un ángulo muy pequeño, pero suficiente para tener dos escenas con pequeños detalles distintos. Así, podemos establecer cuantitativamente la profundidad (como se describe en detalle en Corkidi et ál., 2008). La figura 11 muestra una secuencia de imágenes generada a partir de una escena real.

Con los datos tridimensionales obtenidos con el sistema, una escena real es rotada sobre el eje vertical, mostrando cómo objetos que aparecen aparentemente traslapados en un cierto ángulo de vista, no lo están en la realidad, haciendo evidente el error que se introduce en observaciones donde no se utilizan técnicas tridimensionales.

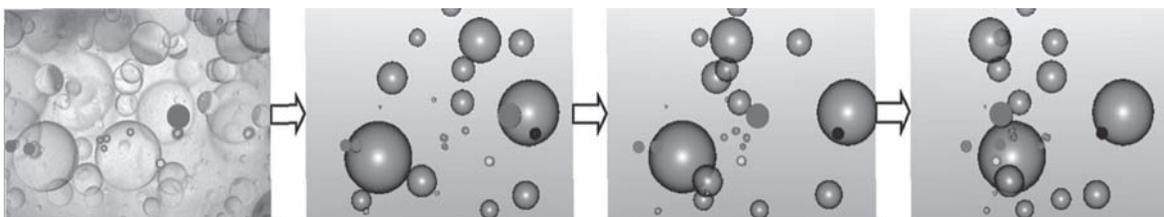


Figura 11. Secuencia giratoria de la escena real (primera imagen) reconstruida en tres dimensiones (cada imagen gira 30 grados sobre su eje vertical central). Se observa cómo partículas que aparecen traslapadas en la primera imagen de la secuencia, en realidad no lo están (ver imágenes subsiguientes).

Método óptico para discernir sobre partículas traslapadas

Como se mencionó, se ha observado la formación de estructuras complejas o gotas de aceite, dentro de las cuales puede haber atrapadas, tanto burbujas de aire como lo que parecen ser pequeñas gotas de la fase acuosa (figura 10), principalmente en presencia de agentes tensoactivos. Esto hablaría de una dispersión múltiple donde no sólo se favorece la inclusión de burbujas de aire dentro de las gotas sino que —durante la coalescencia de las gotas— también se incluyen pequeñas gotas de la fase continua dentro de las gotas de aceite.

Además del sistema tridimensional descrito anteriormente, el cual permitió calcular por métodos estereoscópicos la posición espacial de cada partícula, y por tanto discernir sobre su inclusión real dentro de otra partícula, diseñamos otro método óptico que permitió establecer de manera precisa la naturaleza de las estructuras complejas (gotas de emulsión múltiple) presentes en un sistema de fermentación modelo (como se describe en detalle en Córdova-Aguilar et ál., 2008).

Usando la diferencia entre índices de refracción de cada fase y las propiedades de formación de imágenes de los objetos (gotas de aceite, burbujas de aire y agua), fue posible determinar la naturaleza de cada estructura, así como discernir si estas partículas se encuentran dentro o fuera de las gotas complejas. Fue posible determinar de esta manera que las pequeñas partículas observadas dentro de las gotas

de aceite pertenecen a la fase acuosa, las cuales son atrapadas junto con burbujas de aire dentro de las gotas de aceite. Esta información es de interés básico para entender los mecanismos de transferencia de oxígeno y nutrientes a los microorganismos.

La figura 12 muestra el elemento clave de este método, que consiste en un objeto negro translúcido que fue instalado para obstruir la mitad de la ventana de salida de la luz de la fibra óptica, de tal manera que se proyecte un patrón de luz (mitad blanco, mitad negro) sobre las partículas que se van a evaluar. En función de la imagen formada a través de las diferentes partículas que se comportan como lentes esféricas, y del índice de refracción de dichas partículas, el patrón óptico sufrirá de inversiones ópticas que servirán para determinar la naturaleza de la partícula, así como si éstas se encuentran dentro o fuera de otra estructura. La figura 13 muestra algunas posibilidades de patrones ópticos formados en las estructuras complejas, y su significado en cuanto a naturaleza y posición espacial.

Videoendoscopia de alta velocidad

Los procesos de producción de metabolitos secundarios por hongos filamentosos son altamente complejos y, por tanto, muy difíciles de caracterizar. En estos procesos se ha observado la existencia de estructuras complejas, las cuales consisten en gotas de aceite que contienen una gran cantidad de burbujas de aire y de gotas muy pequeñas de agua (como se descri-

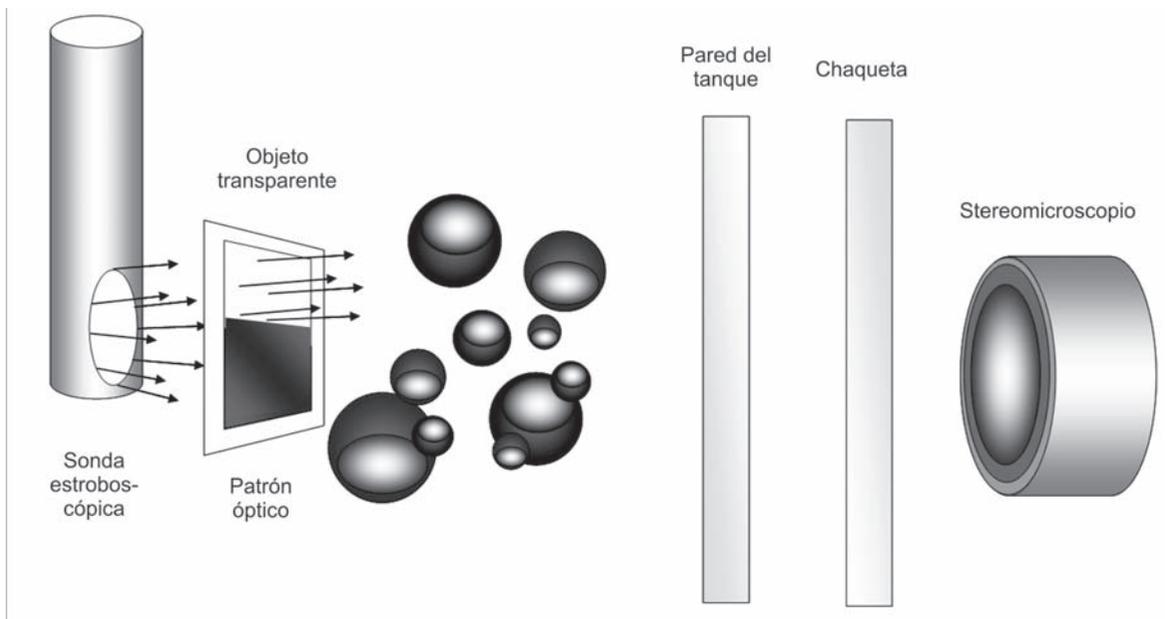


Figura 12. Objeto negro no translúcido instalado para obstruir la mitad de la ventana de salida de la luz de la fibra óptica, de tal manera que se proyecte un patrón de luz (mitad blanco, mitad negro) sobre las partículas que se van a evaluar.

be en Lucatero et ál., 2003). Este fenómeno se acentúa cuando hay concentraciones altas de biomasa, o bien, cuando en el medio existen proteínas, lo que puede modificar la transferencia de oxígeno al cultivo. Este aspecto tiene un efecto muy importante en el proceso de fermentación ya que el microorganismo, al tener mayor disponibilidad de oxígeno, generalmente maximiza la producción de metabolitos o biomasa. Hasta el momento se desconocen los mecanismos

por los cuales se forman estas gotas multifásicas. Una hipótesis es la posible ocurrencia de eventos que pudieran influir en dichas formaciones, tales como colisiones gota-burbuja o gota-micelio. El primer paso que dimos para empezar a dar respuesta a estos interrogantes fue la implementación de un sistema capaz de visualizar el proceso de formación de dichas estructuras, de manera que se puedan conocer los factores que están participando en su formación.

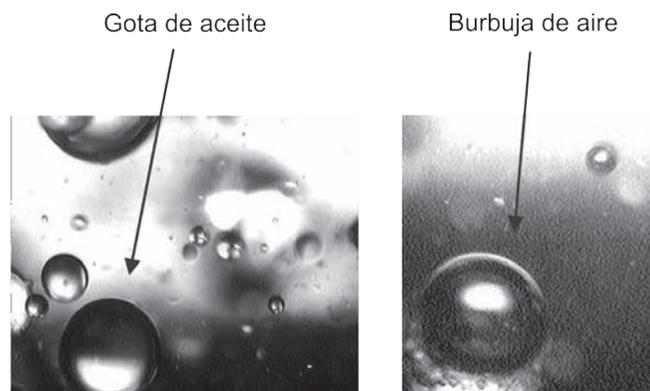


Figura 13. Patrones ópticos formados en gotas y burbujas: invertido para gotas, no invertido para burbujas.

Hasta el momento, el sistema descrito ha permitido la adquisición de imágenes en zonas cercanas a la pared del tanque, con base en un montaje externo de las cámaras de TV. Sin embargo, se tienen evidencias de que la formación de estructuras complejas ocurre en zonas más profundas del tanque, probablemente cercanas a la zona de los impulsores. Por esta razón, resulta poco probable poder capturar, en zonas cercanas a la pared del tanque, imágenes que describan las interacciones dinámicas entre las fases dispersas. Además, para poder filmar una secuencia de imágenes que permita observar la evolución de las estructuras en formación dentro del tanque, no basta la velocidad de una cámara de video estandar ya que entre un cuadro de video y otro se pierden los objetos de interés que se mueven a alta velocidad.

Para resolver este problema se implementó un sistema de video-endoscopía de alta velocidad que permite capturar secuencias de imágenes en diferentes zonas del tanque donde se estén generando las estructuras complejas, a fin de abrir la posibilidad para describir y entender los fenómenos que ocurren durante la interacción dinámica de las diferentes fases.

La figura 14 muestra el sistema diseñado para la adquisición de imágenes. El sistema está compuesto por una cámara digital de video de alta velocidad que permite adquirir hasta 5130 cuadros/segundo de 512 x 512 pixeles. Con esta cámara se pueden captar secuencias de imágenes de procesos que suceden a alta velocidad y, además, realizar una reconstrucción secuencial de los eventos de interés. Así mismo, se le acopló a la cámara un boroscopio de prisma oscilante. El uso del boroscopio permitió la captura de secuencias dinámicas de las interacciones de las fases dispersas en diferentes puntos del tanque. La iluminación se realizó con una fuente de luz Arco Xenon de 180W, directa, y de considerable mayor intensidad a la luz estroboscópica utilizada en el sistema desarrollado anteriormente. La luz se transmite al interior del tanque por medio de una guía de luz de fibra óptica, la cual fue acoplada al boroscopio de manera rígida (alineada con su eje óptico) de

manera que se puedan mover simultáneamente por el tanque, conservando constante una distancia luz-boroscopio. De esta manera se tiene la iluminación suficiente para capturar imágenes en zonas profundas del tanque. La cámara con el boroscopio y la luz fueron colocadas en un tripie para facilitar su manejo por las diferentes zonas del tanque.

Con este sistema se logró la toma de secuencias de imágenes en diversas zonas de turbulencia del tanque. La alta velocidad de adquisición (5130 imágenes/segundo) permitió visualizar de manera detallada las estructuras complejas que se forman en estas zonas, como las que se muestran en la figura 15. Para efectos de visualización, en esta figura se muestran sólo algunos cuadros de la secuencia completa que permite apreciar claramente el movimiento de las estructuras a través de la zona de enfoque.

Aplicación de las técnicas desarrolladas para la caracterización de parámetros críticos de la fermentación (viabilidad del hongo y transporte de nutrientes)

Las técnicas de análisis de imágenes que hemos desarrollado se han usado tanto para caracterizar la viabilidad del hongo *Trichoderma harzianum*, como para caracterizar la dispersión de las fases involucradas.

Uno de los aportes de mayor relevancia del uso de las técnicas de análisis de imágenes que hemos desarrollado se refiere a la posibilidad de cuantificar la viabilidad del hongo durante el proceso de fermentación. Esta metodología es, hasta el momento, la única reportada en la literatura, que permite cuantificar de manera rápida y precisa la viabilidad de un cultivo micelial. La importancia de esto radica en que en todo cultivo micelial, la productividad de metabolitos está relacionada con la proporción de la biomasa viva en un determinado momento en el cultivo (Hassan et ál., 2002). De esta manera, utilizando procedimientos de procesamiento

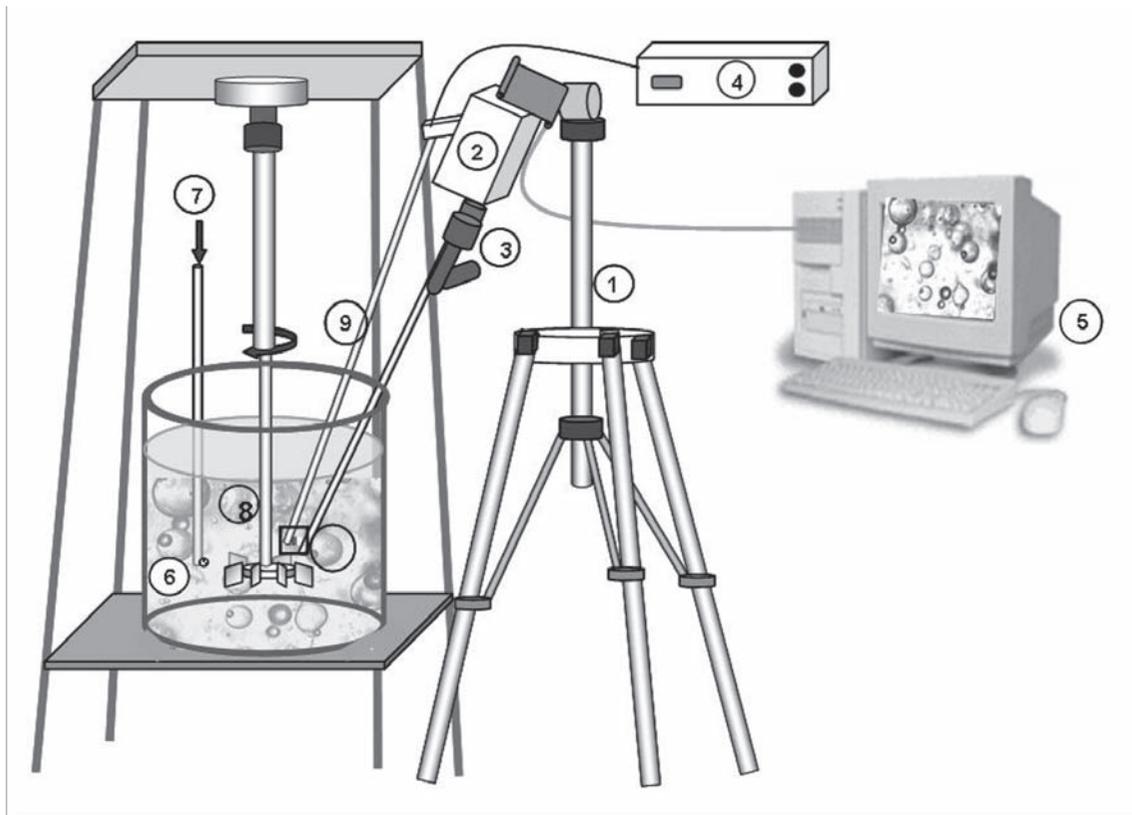


Figura 14. Sistema de adquisición de imágenes, configuración para analizar zonas profundas del tanque: 1) tripié, 2) cámara de alta velocidad, 3) boroscopio, 4) luz arco Xenon, 5) computadora, 6) tanque de mezclado, 7) difusor de aire, 8) turbina Rushton, 9) guía de luz de fibra óptica.

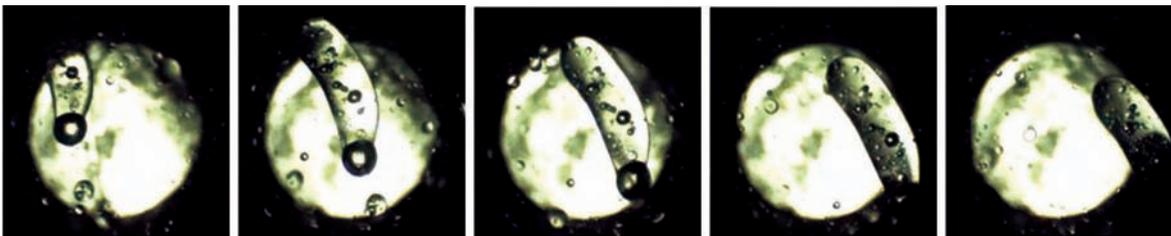


Figura 15. Ejemplos de una secuencia de estructuras complejas captadas mediante el uso del sistema de adquisición descrito en este trabajo.

de imágenes que permitieron determinar el área de las hifas que fluorescen, respecto al área total de las mismas (tomando dos imágenes, una con luz visible y la otra con luz ultravioleta), fue posible calcular el cociente entre ambas áreas y con ello medir experimentalmente la viabilidad de la biomasa, la cual se correlacionó con otros parámetros fisiológicos como la velocidad de crecimiento del hongo. Demostramos así mis-

mo que la relación de áreas (fluorescente/total) permite cuantificar la viabilidad sin importar la forma como la biomasa fue tratada para disminuir su viabilidad (por estrés mecánico, térmico o electromagnético). Como parte de la aplicación de esta técnica se llevó a cabo un estudio de los efectos hidrodinámicos sobre la producción de la 6-pentil-alfa-pirrona por *Trichoderma harzianum*. Se estudió el

efecto del estrés hidrodinámico sobre la producción de la 6-pentil-alfa-pirona (fungicida) por *Trichoderma harzianum* bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto. De manera general, el aumento en la energía suministrada redujo el diámetro de los agregados miceliares (debido a que se favoreció su fragmentación) y originó cambios en el metabolismo de la fuente de carbono (necesarios para satisfacer los requerimientos energéticos del hongo), los cuales favorecieron, hasta un valor crítico, la producción del metabolito de interés. Demostramos que es posible manipular la velocidad de crecimiento y la productividad de *Trichoderma harzianum* (y posiblemente la de otros hongos) a través de la energía suministrada al cultivo, al inducir cambios en el metabolismo de la fuente de carbono (Rocha-Valadez et ál., 2005). Desde el punto de vista tecnológico, se demostró que, manipulando el estrés hidrodinámico, es posible inducir el metabolismo secundario de un microorganismo filamentoso. Esto constituye una gran herramienta tecnológica pues la productividad de los procesos con microorganismos filamentosos está limitada por los largos tiempos de fermentación usualmente necesarios para que se inicie el metabolismo secundario de estos microorganismos.

En lo que se refiere a la caracterización de la dispersión de las fases (aceite-aire-hongo), hemos desarrollado un sistema de adquisición y análisis de imágenes único en su tipo a nivel internacional, capaz de realizar estudios *in situ* en dos y tres dimensiones sobre los eventos microscópicos que ocurren en el interior del fermentador. La alta calidad de imágenes obtenida nos permitió observar y registrar fenómenos muy interesantes, por ejemplo, la introducción de burbujas de aire dentro de gotas de aceite y la presencia de microgotas de agua dentro de las mismas. El descubrimiento de estos fenómenos tiene una gran trascendencia ya que implica el replanteamiento de lo comúnmente aceptado sobre el transporte de nutrientes en la fermentación. La otra técnica implica el uso de video digital de muy alta velocidad.

Con una cámara que puede tomar más de 5000 imágenes por segundo hemos registrado los eventos que suceden en las dispersiones (principalmente interacciones entre burbujas, gotas de aceite y biomasa micelial), lo que nos permitirá establecer los mecanismos de estas interacciones y colisiones y, con ello, contribuir al entendimiento básico de los fenómenos que ocurren en el fermentador, lo que redundará en un mejoramiento –basado en conceptos fundamentales– de los procesos de manufactura de metabolitos secundarios.

Las metodologías que hemos desarrollado nos han permitido analizar varios fenómenos que suceden en los cultivos (Galindo et ál., 2005), incluyendo con detalle el análisis del porcentaje de burbujas que se encuentran dentro de gotas (Larralde-Corona et ál., 2002), la influencia de la morfología de la biomasa sobre la dispersión agua-aceite-aire (Lucatero et al., 2003) y el efecto que tiene la presencia de proteínas (y su grado de hidrofobicidad) (Pulido-Mayoral y Galindo, 2004). Hemos demostrado que la morfología de la biomasa tiene un efecto importante en la dispersión de las fases, sobre todo cuando el hongo crece en forma de agregados laxos. En ese caso, un aumento en la biomasa disminuye los diámetros promedio tanto de burbujas de aire como de gotas de aceite. Esto está en contra de lo que se esperaría al aumentar el contenido de biomasa (debido al incremento de la viscosidad) pero claramente indica que el área disponible para la transferencia de sustratos (que es inversamente proporcional al diámetro de las burbujas de gas –oxígeno– y de las gotas de aceite –ácidos grasos como fuente de carbono–) aumenta conforme el microorganismo se multiplica en el cultivo. Por su parte, cuando la biomasa se encuentra en forma de *pellets*, prácticamente no tiene influencia sobre los diámetros de estas estructuras.

De forma también relevante hemos podido establecer que un mayor contenido de biomasa (en forma de agregados laxos), o la presencia de bajas concentraciones de proteína aumentan el porcentaje de burbujas que se

encuentran dentro de gotas de aceite, llegando a constituir hasta un 60% del total (Lucatero et ál., 2003). Este hecho es particularmente relevante ya que la transferencia de oxígeno (de la burbuja al seno del líquido, donde puede ser aprovechado por el microorganismo) es muy complejo, ya que involucra, primero, la difusión del oxígeno de la burbuja de aire al medio aceitoso (que es cerca de 500 veces más viscoso que el agua, pero que tiene una solubilidad de cerca de 8 veces más alta que en agua) y luego su difusión de la gota de aceite al seno del líquido. Usualmente, los modelos aceptados de transferencia de oxígeno en fermentaciones solo asumen que la principal resistencia a la transferencia de masa sucede en la interfase gas-agua. En consecuencia, nuestros descubrimientos permitirán explicar mejor los fenómenos que suceden en las fermentaciones multifásicas y, por tanto, proponer mejores modelos de transferencia de oxígeno en estos sistemas.

Impacto tecnológico y perspectivas

El proyecto ha contribuido a entender la influencia de parámetros de cultivo relevantes sobre la productividad de cultivos de microorganismos filamentosos. Los resultados obtenidos hasta ahora permitirán establecer estrategias racionales para un desarrollo de procesos eficientes en la producción de ingredientes activos farmacéuticos. En este trabajo se resumen las metodologías y estrategias de proceso que permiten incrementar la sobrevivencia y la productividad de microorganismos filamentosos productores de metabolitos secundarios. Lo anterior incidirá positivamente en la economía del proceso al permitir a los productores de estos metabolitos incrementar su producción sin necesidad de inversiones adicionales en infraestructura. Por otra parte, el incremento en la productividad de los procesos permitirá hacer más eficiente el uso de la infraestructura de la industria al abrir la posibilidad de utilizar su capacidad instalada para la producción de otros principios activos.

Desde el punto de vista de la tecnología desarrollada, el estudio de las interacciones dinámicas entre los componentes del medio de cultivo constituye una herramienta fundamental en el diseño y la operación de los reactores biológicos para el cultivo de microorganismos filamentosos productores de farmoquímicos. Este trabajo demostró que existen oportunidades muy grandes para la reducción de costos de los procesos tradicionales de producción. Entre estas oportunidades está el uso de impulsores más eficientes que incrementen la disponibilidad de los nutrientes (oxígeno y aceites) sin daño para el microorganismo. Esto puede incidir positivamente en el desarrollo de nuevos procesos para la obtención de nuevos productos con tecnología competitiva, lo que debería acelerar el desarrollo de la industria farmoquímica.

Cabe mencionar que la mayor parte de los procesos para la producción de farmoquímicos están basados en conocer el cómo hacerlo (“*know-how*”) pero sin conocer el porqué del proceso (“*know-why*”). Este trabajo propone conocer el porqué las variables de proceso influyen la productividad de los cultivos miceliarios para implementar procesos más robustos y eficientes. Si bien los retos por vencer son aún importantes, tal vez el mayor de ellos esté constituido, particularmente en Latinoamérica, por la pobre interacción entre la industria y la academia. Sin embargo, del desarrollo de esta interacción depende en buena medida la competitividad de la industria farmoquímica.

Si bien este trabajo ha permitido alcanzar logros muy relevantes, existen aún retos importantes. Uno de los principales es lograr una caracterización profunda de los fenómenos de dispersión en la totalidad del biorreactor. Esto incidirá en el desarrollo de modelos precisos que permitan estimar velocidades de transferencia de nutrientes así como del grado de homogeneidad del proceso. Establecer y validar estos modelos revolucionaría el área de la ingeniería bioquímica tanto en sus aspectos académicos como tecnológicos.

Agradecimientos

Se reconoce y agradece la extensiva colaboración del doctor Rufino Díaz del Laboratorio de Óptica del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET) de la UNAM. Se agradece el apoyo técnico de Blanca Taboada, Leticia Vega, Ma. Soledad Córdova y Celia Flores.

Se reconoce la participación de los doctores Patricia Larralde, José A. Rocha, Teddy Voisson, Mainul Hassan, y de los estudiantes Ma. Teresa Brito, Savidra Lucatero, Nancy Pulido, Jean-Baptiste Brière, Othón Escobar, Luz Helena Horita, Suani Velázquez, Eliane Guevara, Itzma Itzel Ruiz y Gabriela Maciel en el desarrollo de las técnicas y los trabajos de caracterización de sistemas de análisis de imágenes que conforman este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Córdova-Aguilar, M. S.; Díaz-Urbe, R.; Escobar, O.; Corkidi, G.; Galindo, E. 2008. An optical approach for identifying the nature and the relative 3D spatial position of components of complex structures formed in multiphase dispersion systems, *Chemical Engineering Science* 63 (11): 3047-3056.
- Corkidi, G.; Voinson, T.; Taboada, B.; Córdova, M.S.; Galindo, E. 2008. Accurate determination of embedded particles within dispersed elements in multiphase dispersions, using a 3D micro-estereoscopic vision system. *Chemical Engineering Science* 63 (2): 317-329.
- Demain, A. L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 455-463.
- Galindo, E.; Flores, C.; Larralde-Corona, P.; Corkidi-Blanco, G.; Rocha-Valadez, J. A.; Serrano-Carreón, L. 2004. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochem. Engin. J.* 18: 1-8.
- Galindo, E.; Larralde, P.; Brito, M. T.; Córdova, M. S.; Vega, L.; Corkidi, G. 2005. Development of advanced image-analysis techniques for the *in situ* characterization of multiphase dispersions occurring in bioreactors. *Journal of Biotechnology* 116: 261-270.
- Hassan, M.; Corkidi, G.; Flores, C.; Galindo, E.; Serrano-Carreón, L. 2002. Accurate and rapid viability assesment of *Trichoderma harzianum* using fluorescence-based digital image analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 80 (6): 677-684.
- Hough, P. V. C. 1962. Methods and means for recognizing complex patterns. USA Patent 3, 069, 654.
- Larralde-Corona, C. P.; Córdova-Aguilar, M. S.; Galindo, E. 2002. Distribution of the free and oil-trapped air bubbles in simulated broths containing fungal biomass. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 80: 491-494.
- Lucatero, S.; Larralde-Corona, C. P.; Corkidi, G.; Galindo, E. 2003. Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology. *Biotechnology Progress* 19: 285-292.
- Omero, C.; Dror, Y.; Freeman, A. 2004. *Trichoderma* spp. Antagonism to the dermatophyte *Trichophyton rubrum*: implications in treatment of onychomycosis. *Mycopathologia.* 158: 173-180.
- Pulido-Mayoral, N.; Galindo, E. 2004. Phases dispersion and oxygen transfer in a simulated fermentation broth containing castor oil and proteins. *Biotechnology Progress* 20: 1608-1613.
- Rocha-Valadez, J. A.; Hassan, M.; Corkidi, G.; Flores, C.; Galindo, E.; Serrano-Carreón, L. 2005. 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnology and Bioengineering* 91 (1): 54-61.
- Serrano-Carreón, L.; Balderas, K.; Galindo, E.; Rito-Palomares M. 2002. Production and biotransformation of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2): 170-174.
- Taboada, B.; Larralde, C.; Brito, T.; Vega-Alvarado, L.; Díaz, R.; Galindo, E.; Corkidi, G. 2003. Images acquisition of multiphase dispersion in fermentation processes. *Journal of Applied Research and Technology* 1 (1): 78-84.
- Taboada, B.; Vega, L.; Córdova, M. S.; Galindo, E.; Corkidi, G. 2006. Semi-automatic image analysis methodology for the segmentation of bubbles and drops in complex dispersions occurring in bioreactors. *Experiments in Fluids* 41 (3): 383-392.