

Cómo fabricar un biorreactor artesanal para la macropropagación de brotes organogénicos de tejidos vegetales... con componentes de catálogo

Reinhardt Acuña ¹

Palabras clave

Cultivo de tejidos vegetales, micropropagación, macropropagación, biorreactores, suspensiones celulares, secundarios.

Introducción

En las diferentes instituciones públicas de enseñanza superior que posee el país, existen carreras biotecnológicas orientadas principalmente hacia el *cultivo de tejidos vegetales*. Dichos procesos, como es bien sabido, se basan en la *micropropagación* manual de los diferentes tejidos vegetales involucrados. El proceso es oneroso y requiere de considerable tiempo, esfuerzo y trabajo humano. La *macropropagación* es el recurso que viene a solventar todas estas dificultades. Los *biorreactores* han sido tradicionalmente utilizados en *suspensiones celulares*, para la

producción de *metabolitos secundarios*, en cuanto a cultivos celulares vegetales se refiere. En estos reactores biológicos, generalmente debe mantenerse el *estado indiferenciado*, mientras crecen y se multiplican las células en suspensión, para luego *inducir* en ellas un *estado semidiferenciado*, en el cual se acumularán metabolitos en las células, antes de su *senescencia*. En el primer estado (indiferenciado), las células deben crecer en ausencia de luz y el segundo (semidiferenciado), a lo sumo, deben tener una fuente baja de luz en el rojo o rojo lejano. El *tejido organogénico*, por su parte, es un *tejido completamente diferenciado*; las *auxinas* y *citoquininas* inducen el *crecimiento de brotes y ápices*, pues hay gran proliferación de *meristemas*. Para poder mantener estas características fisiológicas y metabólicas, el tejido organogénico debe tener un *estímulo lumínico*, preferentemente de forma constante. Por cuanto lo anterior, el

¹ Correo electrónico: (reinhard-707@hotmail.com). Teléfono: 292-8379.

biorreactor debe proveer este estímulo, de forma que, acertadamente, se estará diseñando un *fotobiorreactor*. Finalmente, el objeto de utilizar *componentes de catálogo* es primordialmente que esta práctica resulta mucho más económica que fabricar los componentes requeridos; además, aun cuando no muchos comparten esta opinión, *ensamblar*, aunque no es una práctica válida de diseño, sí es una muy buena práctica correcta de ingeniería, en su más estricto sentido etimológico: *ingeniar*.

El explante

Cualquier tejido vegetal que se utilice como *explante* debe ser organogénico en fase germinal. La *organogénesis somática* se logra vía *embriogénesis somática*, permitiendo al embrión maduro desarrollarse hasta formar tejidos y estructuras especializadas. Lo anterior, bajo estímulo lumínico y con una correcta y adecuada selección de *reguladores de crecimiento*, acorde a las necesidades metabólicas y fisiológicas del explante seleccionado.

La macropropagación Air Lift

La *proliferación de plántulas*, carentes de raíces, se dará por el desprendiendo de brotes en crecimiento, como consecuencia directa de la *turbulencia* ejercida sobre los tejidos (brotes), por efecto de la formación de *Edies* (*Edie bodies*), en la superficie de contacto entre la *columna de burbujeo de aire* y la base del brote en crecimiento. Con lo anterior, indico que, técnicamente, el biorreactor utilizado es del tipo *air lift*; es decir, de levantamiento por aire, con algunas modificaciones, un *híbrido*. Como se observa en la figura 2, la columna de burbujeo de aire ocasiona un movimiento fluido ascendente-



Figura 1

Fotografía descriptiva etapas del cultivo de tejidos: a la izquierda, en el frasco Erlenmeyer, una suspensión vegetal; a la derecha, en el Petri mediano, clusters vegetales en etapa de diferenciación celular; al centro, en el petri pequeño, callo organogénico con brotes de plántulas.

descendente que arrastra y revuelca el tejido vegetal, facilitando el desprendimiento de brotes nuevos.

El biorreactor

Consiste en un reactor de levantamiento por aire híbrido (*air lift*). La presión de aire por lo general es proveída por un compresor de aire; pero he encontrado que es operacionalmente más adecuado un “motor” de pecera, ya que está diseñado para operar continuamente.

El difusor de aire es la otra variación de este híbrido.

Normalmente, el difusor es un plato cilíndrico hueco, de acero inoxidable, con la tapa superior finamente perforada y un acceso lateral para la entrada de aire. Funcionalmente, también resulta más conveniente un difusor de “pecera” de piedra pómez. Este difusor suministra una abundante columna de burbujeo; con burbujas de diámetro muy pequeño (< 1 mm); lo que genera una gran superficie de transferencia de oxígeno

hacia las células (\gg kla) con bajos esfuerzos cortantes (T). La formación de *Edies* también se favorece en estas condiciones. Adicionalmente, en los

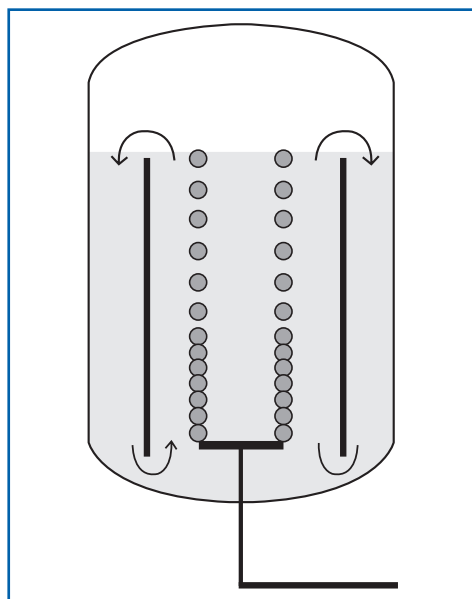


Figura 2
Esquema de un reactor "Air-Lift" o Reactor de Levantamiento por Aire: este reactor utiliza una columna de finas burbujas de aire para movilizar las partículas o células suspendidas en el medio de cultivo.

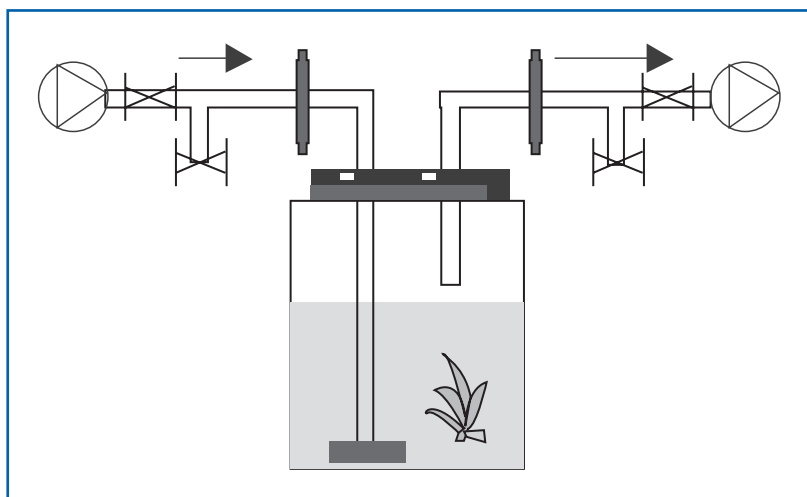


Figura 3
Esquema del Biorreactor Híbrido - Air Lift + Foto-Biorreactor: corresponde al diseño propuesto para el biorreactor a utilizar para la macropropagación de especies vegetales.

“acuarios”, también se consiguen válvulas adecuadas para la regulación del flujo de aire y el costo es muy económico. Las mangueras, aunque del mismo diámetro que el utilizado en “peceras”, deben ser de plástico autoclavable. Similarmente, el contenedor, los filtros y otros materiales requeridos, deben ser autoclavables y conseguidos a través de catálogo.

Materiales y equipos

El contenedor más adecuado deberá ser de plástico claro, translúcido y autoclavable, preferiblemente de boca ancha. En este sentido se recomienda de catálogo: la marca Nalgene que posee botellas de “Carboy” de boca ancha (83B), en policarbonato (PC), autoclavable, de 10 L y 20 L (litros) de volumen, con un costo aproximado de \$110 y \$150, respectivamente. Estas botellas tienen como aditivo aparte tapas ventiladas para relleno (*filling-venting caps*), con mangueras de 6” y 30” de longitud, de tubo *platinum-curado* de silicón (*platinum-cured silicone tubing*), ambos autoclavables; utilizaremos la 83B con dos (2) tubos de silicón de 1/4” de diámetro y 30” de longitud, con un costo aproximado de \$30.

Las mangueras recomendadas son de la marca “Tygon” de silicón autoclavable (*Tygon Silicone Tubing*), de 1/4” de diámetro (L/S 25), con un precio aproximado de \$75 por 25 ft (7,6 m). Los “sostenedores” de los filtros de aire en línea (*in-line filter holders*), deben ser autoclavables y con “pitón” de entrada y salida de 1/4” de diámetro; en este sentido, recomiendo un “sostenedor” marca Delrin para membranas de 25 mm de diámetro que cuestan aproximadamente \$120 el paquete de 6 unidades. Las membranas de 25 mm de diámetro de teflón (PTFE), son las más adecuadas para filtrar aire/gas hasta condición de esterilidad y cuestan aproximadamente \$65, el paquete de 100 unidades de 0,2 μ de poro.

En mi experiencia, el biorreactor funciona adecuadamente y de manera comprobable en la propagación de bromeliáceas de ornamentación y plántulas de piña para exportación.

El compresor de aire requerido es una “bomba de aire” (*air pump*), de pecera de alta capacidad de flujo; digamos, para una pecera de 10 galones o más, este tiene un costo aproximado de \$60. El difusor de aire y las válvulas reguladoras (2), también son aditivos de pecera y cuestan aproximadamente \$10 en conjunto. El estímulo lumínico lo brindarán tres (3) luces fluorescentes del tipo “luz de día” (*day light*), de 25 w a 30 w, cuyo costo aproximado es de \$60, incluidos conectores, bases y alambrado. El montaje de las luces se debe hacer de forma que queden equidistantes alrededor del perímetro del biorreactor (120 °) y una distancia de 2 m a 3 m de cuerpo del *air lift*; con un costo aproximado de \$30.

Como se observa, el costo total es considerablemente inferior (20 veces para ser exacto), al de un desarrollo similar con BIT (véase más adelante). Para instrucciones y consultas sobre el montaje, favor contactarme a: reinhardt360@msn.com.

Aplicaciones

En mi experiencia, el biorreactor funciona adecuadamente y de manera comprobable en la propagación de bromeliáceas de ornamentación y plántulas de piña para exportación. En ambas, se puede utilizar el medio básico De Wall con ácido indol acético (IAA, por sus siglas en inglés) como regulador de crecimiento. Este explante genera abundantes brotes, que se desprenden fácilmente de las plántulas madre, por acción de la turbulencia.

Una aplicación interesante, que aun cuando no ha sido ensayada, y tiene buenas posibilidades, es la maduración y desarrollo de esporas de orquídeas, hasta pequeñas plántulas. Estas (las plántulas) podrían ser transferidas directamente del biorreactor al área de enraizamiento y crecimiento.

Desarrollos similares

El Centro de Bioplantas en Cuba desarrolla y vende a través de su página web, tecnologías de biorreactores de inmersión temporal (BIT).

Cuadro de costos y materiales

Material	Descripción	Cantidad	Costo (\$)
Contenedor	Carboy, 83B, 20 L	1	150
Tapa ventilada	PC, 83B, 30" (tubos (2), 1/4")	1	30
Mangueras	Tygon Silicone L/S 25, 1/4"	1 paquete (25 ft.)	75
Sostenedor filtro	Delrin 25 mm	1 paquete (6 unid.)	120
Membranas	Teflón, 25mm, 0.2µ	1 paquete	65
Compresor aire	Bomba aire de pecera + 10 gal.	1	60
Difusor aire	Difusor aire de pecera (pómez)	2	20
Luces fluorescentes	Day Light, 25W	3	60
Montaje	3 apoyos verticales	1	30
Subtotal	610		
Imprevistos	90		
Total	700		

Valor del BIT (destinado a la producción)		Valor del BIT (destinado a la investigación)	
Equipamiento	\$9,850.00 USD	Equipamiento	\$14,000.00 USD
Especialista (salario/mes)	\$2,000.00 USD	Especialista (salario/mes)	\$2,000.00 USD

El sistema consiste de dos recipientes de plástico autoclavable translúcidos, mangueras de silicona esterilizables en autoclave, filtros hidrofóbicos de 0,2 mm, electroválvulas y un compresor de aire. Un frasco es el vaso de cultivo para los explantes y el otro, el recipiente para el medio de cultivo. Ambos frascos se comunican a través de mangueras de silicona. Las condiciones de esterilidad se logran mediante el empleo de filtros hidrofóbicos de 0,2 mm de diámetro. Las baterías de cultivo (formadas por un frasco para el cultivo de los explantes y un frasco para el almacenamiento de medio) se colocan en estantes de aluminio de dimensiones de 0,7 m de ancho x 2,3 m de largo x 2,5 m de alto. La distribución de aire desde el compresor a los frascos se realiza a través de una conexión de PVC. Cada piso en el estante tiene un panel de luces (blancas fluorescentes) que garantizan una DFFF entre 30 y 50 m mol. m⁻². s⁻¹. (Figura 5). La frecuencia y el tiempo de inmersión se controlan a través de un autómata programable. Según el tiempo programado, se abre una válvula y el aire proveniente del compresor impulsa el medio de cultivo hacia el frasco que contiene los explantes. Durante el período de inmersión, el flujo de aire permite el burbujeo del medio, remueve los explantes y cambia la atmósfera dentro del recipiente de cultivo. Pasado el tiempo de inmersión, se activa una segunda válvula y se regresa el medio al recipiente de almacenamiento. Mediante el controlador automático, se regula la frecuencia y el tiempo de inmersión.



Figura 5
Fotografía del *Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT)*: desarrollado por el Centro de Bioplasmas en La Habana, Cuba.

Costo del biorreactor de inmersión temporal

Los BIT están diseñados para su uso tanto en laboratorios destinados a la producción como a la investigación, teniendo estos últimos un mayor número de sensores y dispositivos que permiten el estudio de las condiciones de cultivo en cada frasco.

Bibliografía

- Centro de Bioplasmas. Tecnologías. Biorreactores de Inmersión temporal /BIT.html.
- Air Lift Fermenters / Air Lift Fermenters.html
- Bioreactors /Bioreactors.html
- Cole-Parmer Handbook 2003 A
www.coleparmer.com
- Sigma-Aldrich Handbook 2003 A
www.sigmaaldrich.com