

Aplicación de Cadenas de Markov en un proceso de producción de plantas *in vitro*

Application of Markov Chain in a production process of *in vitro* plants

Andrés Sánchez-Brenes¹, Carlos Alvarado-Ulloa², Ricardo Solís-Blanco³, Randall Chacón-Cerdas⁴, Humberto Villalta-Solano⁵

Fecha de recepción: 15 de junio del 2015

Fecha de aprobación: 6 de octubre del 2015

Sánchez-Brenes, A; Alvarado-Ulloa, C; Solís-Blanco, R; Chacón-Cerdas, R; Villalta-Solano, H. Aplicación de Cadenas de Markov en un proceso de producción de plantas *in vitro*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 29, N° 1, Enero-Marzo. Pág 74-82.

- 1 Ingeniero en Biotecnología. Máster en Sistemas Modernos de Manufactura. Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica. Teléfono: (506) 2511-7878. Correo electrónico: andres.sanchez_b@ucr.ac.cr
- 2 Ingeniero en Biotecnología. Máster en Sistemas Modernos de Manufactura. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-2262. Correo electrónico: calvarado@itcr.ac.cr
- 3 Ingeniero en Producción Industrial. Máster en Sistemas Modernos de Manufactura. Departamento de Producción. Zollner Elektronik AG. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-5720. Correo electrónico: ricardo_solis@zollner-electronics.com
- 4 Ingeniero en Biotecnología. Máster en Sistemas Modernos de Manufactura. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9410. Correo electrónico: rchacon@itcr.ac.cr
- 5 Máster en Administración de Empresas. Escuela de Ingeniería en Producción Industrial, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9214. Correo electrónico: hvillalta@tec.ac.cr

Palabras clave

Cadenas Markov; plantas in vitro; métodos estocásticos.

Resumen

La aplicación de la biotecnología incluye una serie de procesos industriales que involucran organismos vivos o partes de ellos. La interacción del genotipo con los demás factores de manipulación industrial, aunque controlables, provoca que el sistema sea estocástico o no determinista, caracterizado por acciones predecibles y con elementos aleatorios. La producción masiva de plantas in vitro es un ejemplo de este tipo de industrias biotecnológicas, en el que se cultivan plantas seleccionadas bajo condiciones controladas de incubación y en medios nutritivos. Durante el proceso se producen pérdidas por contaminación o muerte del material y reprocesos, cuando las plantas se oxidan o deforman, pero una parte de ellas se puede rescatar y reintegrar a la etapa anterior. Tomando como modelo el proceso de producción de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum*) en la empresa VitroPlant S.A., se aplicó el método de Cadenas de Markov para determinar los requerimientos de material vegetal para cumplir con una demanda determinada de acuerdo con la etapa del proceso de la que se inicia, incluyendo en ese cálculo las pérdidas y reprocesos. Así, el método de Markov es una opción viable en los procesos biológicos productivos que podría aplicarse a otras especies vegetales e incluso a otros sistemas que utilicen diferentes organismos vivos, tales como hongos, bacterias, insectos y microalgas, todos comunes en la industria.

Keywords

Markov Chain Method; in vitro plants; stochastic methods.

Abstract

The application of Biotechnology includes a number of industrial processes involving living organisms or parts of them. The interaction of genotype with other industrial manipulation factors, characterized by predictable actions and random elements, makes the system to be stochastic. Commercial production of in vitro plants is one example of the biotechnology industry, where the production process consists of the propagation of plants in sterile growth media under controlled physical conditions. During this process, contamination or death of in vitro plants is considered as scrap (waste); however, if plants present oxidation or deformation they have to be reworked, in order to recover or reincorporate to the previous stage. Plant material requirement to accomplish a client demand was studied using the in vitro production process of *Solanum tuberosum* from the company VitroPlant S.A., to establish a model using Markov Chain Method, in which scrap and rework are included. Thus, the Markov method is a viable option in biological production processes that could be applied to other plant species and even other systems using different living organisms, such as fungi, bacteria, insects and algae, common in the industry.

Introducción

La biotecnología, definida como la aplicación de tecnologías en sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados, es aquella en la que convergen diferentes disciplinas con el fin de generar procesos biológicos con aplicaciones industriales o productos de alto valor agregado comercializables (Bolívar, 2005). Estos procesos biotecnológicos dependen en gran medida de los organismos vivos utilizados, ya que, a diferencia de los procesos de manufactura

industrial, cada uno cuenta con una biofábrica en su interior (Liese, 2005), aspecto que aumenta la dificultad de generar procesos estandarizados y controlados, ya que diferentes factores internos pueden afectar la respuesta del organismo, influyendo en las mermas o reprocesos (Kandelbauer et al., 2012).

Un ejemplo de este tipo de procesos es la producción comercial de plantas in vitro, que es una de las industrias biotecnológicas más difundidas en el área de la biotecnología vegetal. Este proceso incluye una serie de técnicas para la propagación masiva de plantas seleccionadas de acuerdo con sus características sobresalientes (rendimiento, fenotipo, genotipo, etc.), en el que se parte de explantes como meristemos, yemas, ápices, semillas y embriones, que son colocadas en un medio de cultivo estéril adecuado con nutrientes y hormonas. Estos explantes son inducidos a regenerar plantas completas que conservan las características del material madre del cual se originaron. Las plantas in vitro resultantes son clones o copias genéticamente idénticas entre sí e idénticas a la planta madre, excepto cuando el explante inicial es una semilla o embrión cigótico (George, 2008).

El proceso de transformación productiva se inicia con la selección del material parental, continúa con una serie de ciclos de multiplicación hasta dar con el número final de plantas requerido y termina cuando las plantas son inducidas al enraizamiento. Este proceso de producción, precisamente por manejar material vivo, está expuesto a una serie de factores que provocan variabilidad (genotipo, condiciones físicas y químicas), aunado a la posibilidad de pérdidas de material por contaminación y defectos en el crecimiento y desarrollo (George & Davies, 2008; Bolívar, 2005). Resulta entonces un reto estimar la capacidad del proceso, debido a que las pérdidas por desecho y reproceso, tienen un comportamiento probabilístico y es necesario tener en cuenta muchas variables aleatorias al mismo tiempo.

Los métodos estocásticos constituyen una herramienta para el estudio de procesos donde se toman en consideración las variables aleatorias. Un proceso estocástico es aquel cuyo comportamiento no es determinista y se caracteriza por acciones predecibles y con un elemento aleatorio de probabilidades tomando en cuenta la variabilidad (Allen, 2010; Lawler, 2006), donde las variables evolucionan a lo largo del tiempo de forma total o parcialmente aleatoria.

Uno de los modelos más utilizados es el de las Cadenas de Markov, propuesto por el matemático ruso Andrey Markov en 1906 con base en métodos probabilísticos dependientes del último evento precedente (Markov, 1906); poseen la peculiaridad de tener memoria, recordando el último evento y, por ende, este condiciona las posibilidades de los eventos futuros. Así, un proceso de Markov es aquel en el que, para predecir el comportamiento futuro de la variable aleatoria, únicamente es relevante su valor actual. Su aplicación en procesos productivos se realiza luego de tener información y análisis de tiempos de producción, producto desechado y reprocesos (Kirkwood, 2015).

Con este trabajo se pretende brindar una herramienta para que las empresas dedicadas a esta industria puedan determinar con mayor certeza su capacidad productiva, partiendo de parámetros simples, como el número de plantas iniciales requeridas para lotes específicos y probabilidades por etapa para la transformación en producto final.

Metodología

Descripción del proceso de producción

El estudio se realizó tomando como modelo un sistema productivo de plantas in vitro de papa (*Solanum tuberosum*) en la empresa VitroPlant S.A., en Cartago, Costa Rica.

Se estudió y describió el proceso para la obtención de vitroplantas y, con datos históricos, se establecieron los tiempos de producción para las etapas.

Aplicación del modelo de Cadenas de Markov

Se aplicó el modelo de Cadenas de Markov para determinar el número de explantes iniciales que se requiere establecer para obtener un número definido de lote de producción (3,000 plantas finales mediante tres ciclos de multiplicación in vitro), según la estandarización de la empresa.

Se estableció un registro histórico del número de plantas que fueron desechadas, reprocesadas y aquellas que continuaron su ciclo de reproducción. Se calculó la matriz de transición de Markov tomando en cuenta un 95% de éxito en la etapa de enraizamiento y la transición al empaque final, según registros de la empresa.

A partir de la matriz obtenida, se estimaron las probabilidades de los estados adsorbentes (empaque y desecho) de cada etapa, mediante las operaciones matriciales:

- *Resta de Matriz Identidad con Matriz Transitoria: (I-N)*
- *Matriz Inversa de I-N: Minversa(I-N)*
- *Multiplicación de la Matriz Inversa por la Matriz Absorbente: Minversa(I-N)*M(A).*

Con el cálculo de las probabilidades anteriores, se planteó una fórmula para obtener el número de plantas requeridas para cumplir con el lote de producción final, de acuerdo con la etapa en la que se encuentre el material vegetal.

En esta fórmula, se presentó una relación entre el número de plantas deseadas, el coeficiente de multiplicación, el número de ciclos de multiplicación y la probabilidad correspondiente según la matriz de Markov.

$$\text{plantas iniciales} = \frac{N_d}{CM^{N_{\text{ciclos}}} P_{ij}}$$

donde:

N_d = Número de plantas deseadas

CM = Coeficiente de Multiplicación

N_{ciclos} = Número de ciclos de multiplicación

P_{ij} = Probabilidad de acuerdo a Markov (Factor Markov) dependiendo de donde se inicie el proceso.

El coeficiente de multiplicación utilizado fue de 3,74 y representa la relación de plantas finales entre plantas iniciales. Se obtuvo mediante el promedio de tres ciclos de multiplicación históricos de la empresa. Los cálculos se realizaron con el *software* Microsoft Excel 2010.

Resultados y discusión

Descripción del proceso de producción

El proceso productivo consiste en utilizar brotes axilares con capacidad regenerativa, obtenidos de campo o invernadero, que son desinfectados superficialmente e introducidos en medios nutritivos estériles bajo condiciones físicas controladas (temperatura, luz, humedad

y fotoperiodo). Esta etapa es el establecimiento in vitro, durante el cual los brotes se activan en las condiciones artificiales de laboratorio y se seleccionan para la siguiente etapa aquellos que no presenten contaminación ni anomalías. Estos brotes activados regeneran plantas completas durante un tiempo variable de incubación controlada y se utilizan para la etapa de multiplicación del material cuando alcanzan la altura y el desarrollo adecuados; estas plantas también pueden colocarse bajo condiciones de conservación (temperatura, nutrientes y luz reducidos) para tomarlas en el momento que se requieran para multiplicarlas.

Luego del establecimiento se inicia la etapa de multiplicación in vitro, en la que los operarios toman las plantas que los brotes generaron y las seccionan en explantes tipo microestacas y nuevamente se cultivan en medios nutritivos frescos a razón de cuatro microestacas por frasco, lo que se conoce como subcultivo.

Entre cada ciclo de subcultivo se define un período de incubación (aproximadamente 30 días) en cuartos controlados, durante los cuales el producto se transforma debido a procesos biológicos inducidos.

Durante la labor de subcultivo, los operarios, además de seccionar el material y cultivarlo, lo inspeccionan y reprocesan aquellas plantas del lote de producción que no lograron el desarrollo adecuado, regresándolas a una etapa anterior.

El período de incubación, aunque no implica manipulación de las plantas, se considera una operación debido a que ocurre transformación (biológica) del producto; también hay desecho (básicamente por contaminación) y reproceso (caída de plantas, presencia de oxidación, por ejemplo), lo que obliga a un recultivo en esta etapa. De esta forma, la etapa de multiplicación implica ciclos de crecimiento exponencial del material, los cuales finalizan de forma inducida, cuando se llega al número final de explantes que potencialmente generaran las plantas requeridas para un lote. En este momento se transfieren a un medio de cultivo diferente que les permite desarrollarse en plantas y generar raíces, de manera que están listas para ser empacadas y transferidas a condiciones de invernadero.

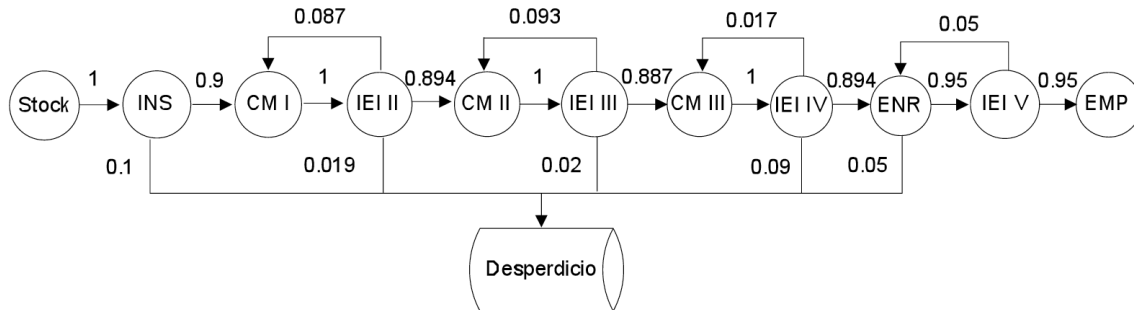
En todo el proceso de producción se tienen dos estados absorbentes, correspondientes al descarte y al producto terminado empacado al final.

El cuadro 1 muestra información de cada una de las etapas involucradas en el proceso de producción.

Cuadro 1. Etapas del proceso de producción de plantas in vitro de papa (*Solanum tuberosum*).

Código	Nombre	Tiempo (días)
DE	Desinfección	1
INT	Introducción	1
Stock	Almacenamiento en banco de germoplasma	<1 año
INS	Inspección I	1
CM I	Ciclo multiplicación I	1
IEI II	Incubación e inspección II	30
CM II	Ciclo multiplicación II	1
IEI III	Incubación e inspección III	30
CM III	Ciclo multiplicación III	1
IEI IV	Incubación e inspección IV	30
ENR	Enraizamiento	1
IEI V	Incubación e inspección V	30
EMP	Empaque	1

La Figura 1 muestra la secuencia de las etapas, así como las probabilidades de que en cada caso el material se descarte o sea reprocesado.



Stock= Banco de germoplasma
INS= Inspección

CM= Ciclo de Multiplicación
IEI= Incubación e Inspección

ENR= Enraizamiento
EMP= Empaque

Figura 1. Secuencia del proceso para la producción de plantas in vitro.

Aplicación del modelo de Cadenas de Markov

En la Figura 2 se presenta la matriz de transición de Markov, tomando en cuenta un 95% de éxito en la etapa de enraizamiento y la transición al empaque final.

MATRIZ			ESTADOS	STK	INS	CM I	IEI II	CM II	IEI III	CM III	IEI IV	ENR	IEI V	EMP	DES	
			STK	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
INS	0,000	0,000	0,900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	
I	Identidad	I	CM I	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
N	Transitoria	N	IEI II	0,000	0,000	0,087	0,000	0,894	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019
O	Cero	O	CM II	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A	Absorbente	A	IEI III	0,000	0,000	0,000	0,000	0,093	0,000	0,887	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	
			CM III	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
			IEI IV	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,894	0,000	0,000	0,090	
			ENR	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,950	0,000	0,050	
			IEI V	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,950	0,050	
			EMP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
			DES	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	

STK= Banco de germoplasma
INS= Inspección

CM= Ciclo de Multiplicación
IEI= Incubación e Inspección

ENR= Enraizamiento
EMP= Empaque
DES= Desecho

Figura 2. Matriz de transición de Markov.

Como resultado de las operaciones matriciales, se calcularon las probabilidades para los estados absorbentes, que se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Probabilidades de los estados adsorbentes del proceso de producción de plantas in vitro.

	Etapa	Empaque	Desecho
STK	Stock	0,707	0,294
INS	Inspección	0,707	0,294
CM I	Ciclo multiplicación I	0,786	0,215
IEI II	Inspección e incubación II	0,786	0,215
CM II	Ciclo multiplicación II	0,803	0,198
IEI III	Inspección e incubación III	0,803	0,198
CM III	Ciclo multiplicación III	0,821	0,180
IEI IV	Inspección e incubación IV	0,821	0,180
ENR	Enraizamiento	0,902	0,097
IEI V	Incubación e inspección V	0,950	0,050

De acuerdo con el cuadro anterior, para la columna de empaque se observa que las probabilidades de que una planta llegue hasta producto terminado aumentan conforme se avanza en las etapas del proceso de producción. Así, por ejemplo, la probabilidad de que una planta que se tome del *stock* y se convierta en producto terminado es menor (0,707) en comparación con una planta que se tome del ciclo de multiplicación III (0,821). Esta probabilidad involucra el reproceso que sufren las plantas en las respectivas etapas de inspección y ciclos de multiplicación.

Desde el punto de vista biológico, el comportamiento ascendente de los valores de probabilidad a lo largo del proceso para que las plantas se conviertan en producto terminado, es un reflejo de la adaptación de los individuos a las condiciones de producción, conforme se avanza en el procedimiento. Con respecto a las probabilidades de desecho, se evidencia un comportamiento descendente, en que se pierden menos plantas conforme se avanza en el proceso. Aunque la contaminación es un factor muy variable, otras fuentes de pérdida, como la muerte de las plantas, puede estar incidiendo en esta tendencia; es decir, es probable que la cantidad de plantas que se pierden por mortalidad disminuya conforme se avanza en el sistema, debido a una mejor adaptación a las condiciones de crecimiento (Berthouly & Etienne, 2005).

Con la ecuación;
$$plantas\ iniciales = \frac{N_d}{CM^{N_{ciclos}} * P_{ij}}$$
, se estimó el número de plantas iniciales requeridas para la producción de un lote final de 3,000 vitroplantas para aclimatación. Para el coeficiente de multiplicación de la etapa de enraizamiento se utilizó un valor de 1, porque en esta fase únicamente se hace un cambio de medio de las plantas generadas por el ciclo de multiplicación III sin segmentarlas (cuadro 3).

Cuadro 3. Estimación de plantas iniciales requeridas para la obtención de un lote de 3,000 plantas in vitro.

Componentes de fórmula	STOCK	CM I	CM II	CM III	ENR
Plantas deseadas	3000	3000	3000	3000	3000
Coficiente multiplicación	3,74	3,74	3,74	3,74	1,00
Ciclos multiplicación	3	2	1	0	0
Probabilidad	0,707	0,786	0,803	0,821	0,902
Plantas iniciales	81	272	998	3655	3324
Desecho	24	59	198	659	324
Plantas disponibles	57	214	800	2996	3000

STK= Banco de germoplasma CM= Ciclo de Multiplicación ENR= Enraizamiento

De esta forma, se requieren 81 plantas para obtener 3,000 finales, si se parte del *stock* inicial, el cual se encuentra a una distancia de tres ciclos de multiplicación para luego enraizar y posteriormente empacar las plantas. De manera análoga, si se parte del ciclo de multiplicación I, se requieren 272 plantas para obtener 3,000 finales; en comparación con el dato obtenido para el *stock*, este valor es mayor debido a que atravesará menos ciclos de multiplicación (dos ciclos). Si se parte de los ciclos de multiplicación II y III, se requieren 998 y 3,655 plantas, respectivamente. Con respecto al número de ciclos requeridos si se parte del ciclo III, el valor es cero, debido a que este es el último que se contempló en el proceso, quedando solo la etapa de enraizamiento, la cual no es considerada un ciclo de multiplicación (Cuadro 3).

Conclusiones

Las Cadenas de Markov se perfilan como una herramienta válida para implementarse en procesos de manufactura estocásticos, en los que intervienen organismos vivos y procesos biológicos. En este caso se logró demostrar, con un correcto registro de datos históricos, cuales son los requerimientos iniciales de material vegetal según la etapa en la que se encuentre el proceso para lograr una demanda específica, aplicando las probabilidades obtenidas a través de las Cadenas de Markov. El modelo aplicado puede ajustarse a otras especies y variedades diferentes a *Solanum tuberosum*, que presenten coeficientes de multiplicación y patrones particulares de crecimiento y desarrollo.

Con un adecuado cálculo de material vegetal de entrada al proceso, se pueden estimar de forma más confiable y realista los costos y tiempos de producción, pues se conocen las probabilidades de que el producto se convierta en desecho o reingrese al sistema por reproceso, aunque al sistema solo reingrese material vegetal y no los demás materiales de soporte. Estas herramientas de estimación permiten maximizar recursos y planear de mejor forma el manejo de las mermas y reprocesos.

Para el caso en estudio, se determinó que para una demanda de 3,000 plantas, se debe iniciar con 81, 272, 998, 3,655 y 3,324 plantas si se parte de la etapa de *stock*, CM I, CM II, CM III y enraizamiento, respectivamente.

El valor que agrega el análisis estadístico en estos procesos con variabilidad inherente al tipo de producto biológico, radica en la precisión con que se estiman los tiempos de entrega de acuerdo con su capacidad y el comportamiento particular de cada especie.

Bibliografía

- Allen, L. (2010). *An Introduction to Stochastic Processes with Applications to Biology*. 2 ed. Florida, USA: Chapman & Hall/CRC.
- Berthouly, M. & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. Chapter 11. En A.K. Hvoslef-Eide y W. Preil (Eds.), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 165-195). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Bolívar, F.G. (2005). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. 2 ed. México D.F.: El Colegio Nacional.
- George, E.F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure - Background. En E.F. George, M.A. Hall y G. Jan de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 1-28). 3 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- George, E.F. & Davies, W. (2008). Effects of the Physical Environment. En E.F. George, M.A. Hall y G. Jan de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 423-464). 3 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Kandelbauer, A., Rahe, M. & Kessler, R. (2012). Process Control and Quality Assurance: Industrial Perspectives. En J. Popp, V.V. Tuchin y S. Heinemann (Eds.), *Handbook of Biophotonics*. Vol. 3: Photonics in Pharmaceuticals, Bioanalysis and Environmental Research (pp. 3-69). New York: Wiley-VCH.
- Kirkwood, J. (2015). *Markov Processes*. London: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Lawler, G.F. (2006). *Introduction to Stochastic Processes*. 2 ed. Florida, USA: Chapman & Hall/CRC.
- Liese, A. (2005). Technical Application of Biological Principles in Asymmetric Catalysis. En T. Scheper y U. Kragl (Eds.), *Technology Transfer in Biotechnology*. Series: Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology. Vol. 92 (pp. 197-224). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Markov, A.A. (1906). *Rasprostranenie zakona bol'shih chisel na velichiny, zavisyaschie drug ot druga*. *Izvestiya Fiziko-matematicheskogo obschestva pri Kazanskom universitete*, 2-ya seriya, tom 15(94): 135-156.