



---

## EVALUACIÓN DE UN MEDIO ALTERNATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE TOXINA TETÁNICA POR *Clostridium tetani* CEPA HARVARD

Arias Janeth<sup>2</sup>, Barrera Alexander, Nova Gloria, Gutiérrez Ivonne<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Subdirección Industrial. Aseguramiento de la Calidad. Instituto Nacional de Salud, Bogotá

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana  
Carrera 7 No. 43 – 82 , Bogotá  
jdcarias@javeriana.edu.co

### RESUMEN

Se evaluó un medio alternativo, buscando mejorar la producción de vacuna antitetánica utilizando *Cl. tetani* cepa Harvard a fin de conocer el comportamiento de éste frente a nuevos sustratos. El trabajo se dividió en dos fases, en la primera se evaluaron tres variables (glucosa, extracto de soya y sulfato ferroso) cada una con tres niveles (bajo, intermedio y alto), para la producción de la toxina tetánica. Por medio de un análisis estadístico se escogieron los ensayos más relevantes (Ensayos 5, 6, 7) para la segunda fase; teniendo en cuenta que éstos produjeron la mayor cantidad de toxina en el menor tiempo. En la segunda fase se realizaron tres fermentaciones de 5 L por duplicado utilizando el medio GIA01. Los parámetros medidos en cada muestra fueron: biomasa, pH, glucosa y producción de toxina; a la última muestra de cada fermentación se le determinó la dosis mínima letal. A partir de los resultados obtenidos se concluyó que el comportamiento de *Cl. tetani* en medio GIA01 es muy similar al reportado en el medio tradicional en cuanto a la producción de toxina y la cinética de crecimiento del microorganismo, sin embargo con el medio GIA01 se produce mayor cantidad de biomasa lo cual no es deseable para una producción a gran escala.

**Palabras claves:** Fermentación, Medio de cultivo, Toxoide tetánico

### ABSTRACT

In the search for alternatives to improve antitetanus vaccine production (tetanus toxin), it was decided to evaluate alternative means, using the Harvard strain of CL tetani, and to determine its behavior when confronted with new substrates. The project was divided into two phases; in the first, three variables were evaluated (glucose, extract of soya and ferrous sulphate), each one at three levels (low, intermediate and high), for the production of the tetanus toxin. The three sets of test conditions which gave the best results (Tests 5, 6, 7) were determined by means of a statistical analysis. These were chosen for the second phase because they produced the greatest amount of toxin in the shortest time. In the second phase, three 5L batch fermentations, using the three most favorable sets of conditions, were performed in duplicate, using the medium GIA01, determining biomass, pH, glucose and toxin production for each sample. For the final sample of each fermentation, the minimum lethal dose was determined. From the results, obtained we concluded that the behavior of CL tetani in the GIA01 medium is very similar to that reported in traditional media, considering the toxin production and the kinetics of microorganism growth. Nevertheless, with the medium GIA01, a greater amount of biomass is produced, which is not desirable for large-scale production.

**Key words:** fermentation, means of culture, Tetanus toxoid

## INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades que sigue causando víctimas en el mundo es el tétanos. El tétanos es una enfermedad grave que, a pesar de los tratamientos actuales en unidades hospitalarias especiales, presenta todavía una elevada letalidad. En general requiere un tiempo de hospitalización largo y los enfermos que sobreviven pueden presentar secuelas importantes, sobre todo de tipo muscular. En el contexto de la salud pública, el tétanos reviste especial importancia, no solo por su gravedad, sino fundamentalmente por ser una enfermedad para la que existe una vacunación muy eficaz y que, en consecuencia, podría ser prevenida de forma casi absoluta. (Bizzini *et al.*, 1969).

El Instituto Nacional de la Salud (INS) es el laboratorio encargado en Colombia, de la producción de la vacuna tetánica en sus tres presentaciones DPT, Td y TT siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para ello, se obtiene el toxoide tetánico a partir de cultivos sumergidos estacionarios de *Clostridium tetani* en jarros de vidrio de 60L. Desafortunadamente, aunque la tecnología de cultivo estático es sencilla, implica considerable manipulación, altos riesgos de contaminación tanto para el operario como para el cultivo, costos elevados, aumento de factores que conllevan a variaciones lote a lote y dificultad de escalamiento de la producción. Adicionalmente, la producción no alcanza a cubrir las necesidades de la población colombiana, obligando a importar una parte importante de la vacuna necesaria en los procesos de inmunización preventiva a nivel nacional, por ello se busca investigar y comprobar si hay un mayor rendimiento en la producción de la toxina con la cepa de Harvard.

Buscando nuevas alternativas que faciliten solucionar los inconvenientes que se

presentan con los medios y tecnologías tradicionales, la realización de este trabajo propone el uso de un medio alternativo para la producción del toxoide tetánico con el fin de aumentar la productividad para satisfacer las necesidades de la comunidad en general, así como cubrir a demanda nacional adoptando procesos novedosos que permitan dar un avance significativo en el mejoramiento tecnológico de los procesos por medio de desarrollo de proyectos de este tipo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa

Se utilizó el microorganismo *Clostridium tetani* cepa Harvard, segundo pase, El *Clostridium tetani* es un bacilo móvil Gram positivo, anaerobio, que posee una forma esporulada en forma de raqueta de tenis con una espora terminal; esta cepa se seleccionó ya que en resultados obtenidos por el estudio de Gutiérrez 2000 la cepa Harvard presentó en algunos casos un comportamiento mejor aunque no haya diferencia estadística significativa.

### Ensayos de la primera fase

Se evaluaron tres variables (glucosa, extracto de soya y sulfato ferroso) cada uno con tres niveles (bajo, intermedio y alto), para la producción de la toxina tetánica por *Clostridium tetani* cepa Harvard (tabla 1).

Se escoge un tipo de diseño factorial con tres factores independientes y sus respectivas variables de respuesta; en esta fase se efectuaron 10 ensayos los cuales se llevaron a cabo por duplicado para un total de 20 ensayos (tabla 2), estos experimentos se pueden observar en la anterior tabla. Los ensayos se hicieron en erlenmeyer con un volumen de 300 ml de medio en una incubadora agitadora, a 35°C y 100 rpm. Se tomó una muestra cada 24 horas evaluando biomasa (peso seco) y toxina tetánica (floculación de Ramón).

## Ensayos de la segunda fase

Con las mejores condiciones de medio de cultivo determinadas en la fase anterior se realizaron fermentaciones en un fermentador de 5L (BIOFLO II C y III New Brunswick).

### Fermentador Bioflo Iic y III

Las fermentaciones se realizaron en dos fermentadores marca New Brunswick Scientific, modelo BIOFLO Iic, cada uno con una capacidad máxima de siete litros, pero con una capacidad efectiva de 5 litros. Los equipos están diseñados para el cultivo de microorganismos por lotes y en forma continua, controlando automáticamente, temperatura del medio de producción, pH, agitación, oxígeno disuelto y espuma; los intervalos de agitación entre 25 y 1000 r.p.m. y los intervalos de temperatura entre 20 y 60 °C.

### Medio de cultivo GIA 01

Se utilizó un medio alternativo (GIA01), cuya composición (Tabla 3), ha sido propuesta por el Ing. PhD. Martin Krahe quien trabaja en la unidad de bioprocesos de Bioingenierin, con el fin de evaluar si con este medio se obtienen resultados satisfactorios en la producción de toxina durante la fermentación con *Cl tetani* cepa Harvard, Según Krahe con este medio se obtienen valores de títulos altos (110 Lf), comparados con los obtenidos en el medio Lathan-Mueller, por lo cual se decide probar con este medio.

Entre los sustratos principales que el microorganismo toma como fuente de energía y/o de carbono no figuran los carbohidratos, reportándose que el *Cl tetani* consume aminoácidos como fuente de energía, principalmente aspártico, glutámico e histidina. Muller en 1945 y algunos otros autores proponen que la glucosa actúa como agente reductor en el medio de cul-

tivo y que posiblemente durante la esterilización se forme un complejo glucosa aminoácidos (principalmente con la cisteína) que actúa como inductor en la formación de toxina.

### Inóculo

Para la preparación del inóculo se tomó un tubo de presemilla y se sembró 0.3 mL de cultivo en cada uno de tres tubos los cuales contenían 30 mL de medio de tioglicolato cada uno. De acuerdo con lo recomendado por Ballen y Aldana en 1.995, el periodo de incubación del inóculo fue de 24 horas, tiempo en el cual se encuentra en la parte final de la fase exponencial de crecimiento y corresponde a 0.7-0.8 unidades de absorbancia.

### Condiciones de la fermentación

El medio de cultivo utilizado fue el GIA 2001 (5 Litros). Esterilizado en autoclave dentro del vaso del fermentador a 121 °C durante 35 minutos de acuerdo con la metodología utilizada por Muñoz y Quintero en 1997. Para el sistema de fermentación una vez alcanzada la temperatura de incubación (35°C) se inoculó con 50mL del inóculo (Ballén y Aldana, 1995). El pH inicial de las fermentaciones fue de 7.3 a 7.5 y la velocidad de agitación fue de 100 r.p.m. (Ballén y Aldana, 1995; Muñoz y Quintero, 1997).

En las primeras 12 horas de fermentación se tomaron muestras cada 2 horas con un volumen de 30 mL; posteriormente, se tomaron muestras de igual volumen cada 4 horas hasta las 76 horas de cultivo, cuando se estabilizó la producción de toxina. A cada muestra se le realizó análisis de biomasa, toxina, pH y glucosa.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con ayuda de la herramienta estadística

SAS Versión 6.02. Para todas las variables de respuesta se realizó un análisis de varianza y se aplicaron las pruebas de Duncan, Tukey y Scheffe para determinar si entre los niveles de cada factor hay diferencias entre los tres tipos de ensayos para cada una de las respuestas significativas. Para cada uno de los factores se inició el planteamiento de la hipótesis nula que hay igualdad de medias entre los niveles para cada factor. Todos los análisis se hicieron con un nivel de confianza del 95%.

### **Determinación de biomasa**

La concentración de biomasa se expresó como peso seco de células totales (vivas y muertas) por unidad de volumen. Para su determinación se utilizó una técnica turbidimétrica, utilizando un espectrofotómetro (GENESIS 5 A 550 nm) y una curva de calibración Absorbancia-peso seco.

### **Determinación de glucosa**

Se utilizó el método de Antrona con base en la condensación de Antronol, el cual reacciona con el ácido sulfúrico creando un derivado del furfural de los azúcares presentes; este derivado de color verde azulado absorbe luz a una longitud de onda de 628nm. Los amino azúcares y el N-cetil-amino azúcares no reaccionan con este reactivo.

### **Determinación de toxina tetánica**

La técnica para determinar la toxina tetánica presente en cada muestra se conoce como prueba de floculación de Ramón (WHO, 1978). La cual consiste en mezclar, bajo observación permanente y temperatura constante, cantidades variables de anti-toxina con cantidades constantes de toxina. La mezcla que primero flocule, indicará la cantidad aproximada de toxina presente en la muestra, la cual se mide en Lf (Limes Floculations), que significa la cantidad de toxina o toxoide que cuando se mez-

cla con una unidad internacional de la antitoxina produce un precipitado blanco (Floculación de Ramón) en el menor tiempo.

### **Determinación de dosis mínima letal**

La potencia de la toxina se determinó utilizando el método de dosis mínima letal, el cual se define como la cantidad de toxina que inyectada a un grupo de animales, mata a la mayoría (80%) en un término de 4 días. La dosis mínima letal es diferente para cada especie animal. En el ensayo se utilizaron 4 ratones por dilución, los cuales fueron suministrados por la división de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud. La dosis mínima letal se expresa como el inverso de la dilución mas alta que mata los 4 ratones dentro de un periodo de 96 horas después de inoculados.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los datos obtenidos en la primera fase se muestran en la Tabla 4, en la que se consiguen los valores de biomasa, presencia y tiempo de producción de toxina. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar los ensayos 5, 6 y 7 que fueron los más relevantes para avanzar con los ensayos en los fermentadores de 5 L debido a la mayor cantidad de toxina, menor biomasa y tiempo de expresión de la toxina. En cuanto a biomasa, el análisis de varianza indica que la única fuente de variación que tiene un efecto significativo sobre la variable respuesta es la que corresponde al sulfato ferroso; sin embargo, al aplicar los estadísticos de Tukey y Scheffe, se encuentra que entre los únicos niveles que no hay diferencias significativas son los ensayos 6 y 12. Para el factor soya, los niveles que no presentan diferencias significativas son los de 30g/L y 40g/L.

Para la segunda fase, con los datos obtenidos de toxina máxima y tiempo de toxina

máxima junto con la estadística realizada se pudieron establecer las condiciones más favorables para comenzar con el desarrollo de la segunda fase donde luego de las tres fermentaciones en fermentador de 5L por duplicado en medio GIA 01, se obtienen los resultados que se muestran en la tabla 5. No hay diferencia significativa entre las tres fermentaciones realizadas y en las variables en estudio el sulfato ferroso es igual para los tres ensayos (450 mg); la glucosa y el extracto de soya sí cambia en su cantidad. Es decir que al utilizar estas proporciones en las variables de estudio se obtienen cantidades de toxina muy similares.

En la figura 1, se muestra el comportamiento cinético, donde no se observa claramente una fase de adaptación (lag); desde la hora 0 hasta la 4 hay un fenómeno de muerte celular por estrés, donde comienza

una fase exponencial hasta la hora 8; continúa creciendo de una manera rápida agotando parte de la glucosa, luego entra en una fase estacionaria desde la hora 12 hasta la 36 que coincide con el mayor consumo de glucosa, la producción de toxina inicia en el mismo momento que comienza la fase de muerte, esto indica que se encuentra asociada a la lisis celular; la biomasa máxima es de 0.85g/L en un tiempo de 20 horas y la toxina se expresa desde la hora 40 y alcanza un máximo título de 70Lf/ml a la hora 68; comparado con los ensayos de la primera fase, la biomasa fue de 0.88g/L en la hora 72 con una toxina máxima de 60Lf/mL en la hora 156.

Al igual que la cinética de crecimiento, la cinética de consumo de glucosa presenta dos zonas bien definidas desde la hora 0 hasta la hora 32 que muestra un descenso en la concentración de glucosa y una segunda fase desde la hora 36 hasta la hora 76 donde prácticamente se estabiliza el consumo de la glucosa.

El comportamiento del pH es similar a los ensayos reportados por las investigaciones desarrolladas en el Instituto Nacional de Salud con medio Latham-Mueller (Gutiérrez, 2.000). El pH disminuye al comienzo de la fermentación debido a la producción de ácidos mixtos, luego comienza a incrementar de una manera moderada. La producción de toxina con respecto al tiempo, presentó un comportamiento lineal, con una velocidad de formación de toxina constante de 2.062Lf/L/h. La concentración de glucosa en el medio presentó un descenso desde 16.57g/L hasta 13.34g/L con una velocidad de consumo de 0.296 g de glucosa/L/h y un rendimiento de biomasa sustrato de 0.296g de Biomasa/g de glucosa, con una productividad de 1029.4Lf/L\*h.

## CONCLUSIONES

El medio evaluado GIA 01 el comportamiento del *Clostridium tetani* cepa Harvard es diferente al reportado en el medio tradicional Latham-Mueller donde se presenta una cinética de crecimiento con una fase de muerte, una de adaptación y finalmente lisis. La cinética de consumo de glucosa muestra dos zonas bien definidas, la primera donde prácticamente no se consume la glucosa y una segunda en donde se presenta una estabilización en el nivel de la misma. Esta cinética de consumo se ajusta perfectamente a la cinética de crecimiento.

El tiempo en el que se alcanza el valor máximo de toxina en el medio coincide con el final de la fase de lisis, lo que comprueba que la toxina es sintetizada dentro de la bacteria y liberada al medio durante la lisis. Los valores de toxina máximos (70Lf) fueron relativamente diferentes a los reportados con el medio tradicional (50Lf) utilizando la cepa Harvard, aunque en el medio GIA 01 la lisis no se realiza de una manera total; tal vez se alcanzarían niveles mayores si esta se realizara completamente.

La presencia de toxina en el medio evaluado coincide con la fase estacionaria de crecimiento lo que es indicativo de un producto no asociado al crecimiento. Un factor importante en la producción de toxina es la concentración de hierro presente en el medio, por lo cual este se reconoce como factor limitante y se requiere en concentraciones adecuadas ya que si posee demasiado no hay presencia de toxina.

Los niveles de rendimiento del medio alternativo son relativamente altos frente al medio Latham-Mueller sin embargo existen diferencias en cuanto a los costos de producción debido a que este último es más económico.

## REFERENCIAS

- ANTHONY, C. and GUEST, J.R. 1998. Deferred Metabolism of Glucose by *Clostridium tetanomorphum*. En: Journal General Microbiology. Vol. 54; p. 277-286.
- AMOUREUX, G. ET POCHON, J. 1943. Composition Chimique du Milieu de Culture et Formation de la Toxine Tetanique. En: Comp. Rend. Soc. de Biol. Vol. 137; p. 350-353.
- BALLÉN, L. y ALDANA, N. 1995. Estudio Preliminar de la Concentración Inicial de Células en la Producción de Toxina por Fermentación del *Clostridium tetani*. Santafé de Bogotá. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.
- BARKER, H. A. 1981. Amino Acid Degradation by Anaerobic Bacteria. En: Ann. Rev. Biochem. Vol. 50, p. 23-40.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 1984. *Clostridium tetani*. Vol. 2. 1195-1196.
- BIZZINI, B.; TURPIN, A. et RAYNAUD, M. 1969. Production et Purification de la Toxine Tetanique. En: Annales de l'Institut Pasteur, Vol. 116, No. 5; p. 686-712.
- BIZZINI, B. TETANUS TOXIN. *Microbiological Reviews*. 1979. Vol. 43, No. 2; p. 224-240.
- BOORSMA, H. J. A 1939. Propos de la Fermentation du Glucose par *Plectridium tetani*. *Comptes rendus de la Societe de Biologie*. Vol. 13.1 p. 74-76.
- BUCKEL, W. and BARKER, H. A. 1974. Two Pathways of Glutamate Fermentation by anaerobic Bacteria. En: Journal of Bacteriology. Vol. 117; p. 1248.
- CHEYROUX, M. 1954. Toxine Tetanique et Formol. En: Annales de l'Institut Pasteur. Vol. 86; p. 356-369.
- CLIFTON, C. E. 1942. The utilization of Amino Acids and Related Compounds by *Clostridium tetani*. En: Journal of Bacteriology. Vol. 44; p. 179-183.
- DE OLIVEIRA, E.; HIGASHI, H. G. y LIZUKA, H. 1979. Algumas Modificacoes na Técnica de Titulacao das Toxinas e Anatoxinas Tetanicas "in Vitro". En: Rev. Microbiology. Vol. 10, No. 1; p. 6-9.
- FEENEY, R. E.; MUELLER, J. H. and MILLER, P. A. 1943. Growth Requirements of *Clostridium tetani*. II : Factor Exhausted by Growth of the Organism. En: Journal of Bacteriology. Vol. 46; p. 559-562.
- FEENEY, R. E.; MUELLER, J. H. and MILLER, P. A. 1943. Growth Requirements of *Clostridium tetani*. III : A. "Syntetic Medium". En: Journal of Bacteriology. Vol. 46; p. 563-571.
- FRATELLI, F. *et al.*, 1993. Toxina Tetanica: Producao e Purificacao em Escala Industrial. En: Bol. Biotecnology. Vol. 4; p. 19-29.



- HEPPLER, J. R. 1965. Large-scale Cultivation of *Clostridia*. En: Journal Appl. Bacteriology. Vol. 28, No.1; p. 52-55.
- HEYNINGEN, W. E. 1950. Bacterial toxins. Oxford, England. Blackwell Scientific publications. p.19-23.
- REYES, H. y FLORES, M. E. 1986. Tétanos. México. *Manual Moderno*.
- KOCH, W. and KAPLAN, D. 1953. A Simple Method for Obtaining Highly Potent Tetanus Toxin. En: Journal of Immunology. Vol. 70; p. 1-5.
- LATHAM, W. C.; DONALD, F. B. and LEO, L. 1962. Tetanus Toxin Production in the Absence of Protein. En: Applied Microbiology. Vol. 10; p. 146-152.
- LERNER, E. M. and MUELLER, J. H. 1949. "The Role of Glutamine in the Glucose Metabolism of *Clostridium tetani*". En: Journal of Biological Chemistry. Vol. 181; p. 43-45.
- LETTL, A. *et al.*, 1964. Effects of Products of Heat Degradation of Glucose on Growth and on Formation of Soluble Antigens of *Clostridium tetani*. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*. Vol.8; p. 301-306.
- LETTL, A. *et al.*, 1966. Etude de la Toxinogenese Chez *Pletridium tetani*: I. Comparaison des Methodes D'Evaluation des Proteines Toxiques Intracellulaires. En: Annales de L'Institut Pasteur. p. 608-614.
- LEV. M. 1956. Aerobic cultivation of *Clostridium tetani*. En: Journal of Bacteriology, Vol. 71; p. 718-719.
- MARTINEZ, R. and SYDNEY, C. 1959. Glucose Dissimilation by *clostridium tetani*. En: Journal of Bacteriology. Vol. 77; p. 156-163.
- MC CLUNG, L. S. *et al.*, 1934. Studies on Anaerobic Bacteria : I. A Corn-Liver Medium for the Detection and Dilution Counts of Various Anaerobes. En: Journal of Bacteriology. p. 267-277.
- MUELLER, J. H. and MILLER, P. A. 1948. Factors Affecting the Production of Tetanus Toxin : Temperature. *Journal of Bacteriology*. Vol. 55; p. 421-423.
- MUELLER, J. H. and MILLER, P. A. 1943. Large-Scale Production of Tetanal Toxin on a Peptone-Free Medium. En: The Journal of Immunology. Vol. 47; p. 15-22.
- MUELLER, J. H. and MILLER, P. A. 1954. Variable Factors Influencing the Production of Tetanus Toxin. En: Journal of Bacteriology. Vol. 67; p. 271-277.
- MUÑOZ, G. L. y QUINTERO, D. J. 1993. Determinación del Coeficiente Volumétrico de Transferecia de Oxígeno en la fermentación con *Bacillus thuringiensis*. Santafé de Bogotá, Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.
- NIELSEN, K. E. 1965. Growth and Toxin Production by *Clostridium tetani*. En: Symp. Series Immunobiology Standar. Vol. 3; p. 207-216.
- NIELSEN, P. A. 1967. Large-Scale Production of Tetanus Toxoid. En: Applied Microbiology. Vol. 15, No. 2; p. 453-454.
- OZUTSUMI, K.; SUGUMOTO, N. and MATSUDA, M. 1985. Rapid, Simplified Method for Production and Purification of Tetanus Toxin. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 49, No. 4 ; p. 939-943.
- PAEGE, L.; MARTIN, G. and BARD, R. C. 1956. Fermentation of C<sup>14</sup>- Labeled Glucose

by *Clostridium Perfringens*. En: Journal of Bacteriology. Vol. 72; p. 65-67.

PICKETT, M. J. 1943. Studies on the Metabolism of *Clostridium tetani*. En: Journal of Biological Chemistry. Vol. 151; p. 203-209.

RAYNAUD, M. *et al.*, 1952. Formation de Toxine Tetanique par des Suspensions de corps Microbiens. En: Annales de L'Institut Pasteur. Vol. 83; p. 693-704.

STADTMAN, T. C. 1954. On the Metabolism of an Amino Acid Fermenting Clostridium. En: Journal of Bacteriology. Vol. 67; p. 314-320.

TAYLOR, E. M. 1945. Production of Tetanal Toxin. En: Journal of Bacteriology. Vol. 50; p. 385-389.

THOMSON, R. O. 1957. A Semi-Continuous Method for the Large-Scale Production of Tetanus Toxin. *Nature*. Vol. 180. p. 1126-1127.

WACHSMAN, J. T. and BARKER, H. A. 1955. The Accumulation of formamide During the Fermentation of Histidine by *Clostridium tetanomorphum*. En: Journal of Bacteriology. Vol. 69; p. 83-88.

World Health Organization. 1978. Manual for the Production and Control of Vaccines: "Tetanus Toxoid".

ZACHARIAS, B. and BJORKLUND, M. 1968. Continuous Production of *Clostridium tetani* Toxin En: Applied Microbiology. Vol. 16, No. 1; p. 69-72.

ZACHARIAS, B. and BJORKLUND, M. 1969. Continuous Production of Highly Purified *Clostridium tetani* Toxin. En: Progr. Immunobiol. Standar. Vol. 3; p. 248-251.

**Recibido: 15-06-2004**  
**Aceptado: 2-02-2005**

**Tabla 1. Variables de los ensayos de la primera fase**

Niveles	Glucosa (g/l)	Extracto de soya (g/l)	Sulfato Ferroso (mg/l)
Alto	12	40	450
Intermedio	9	35	300
Bajo	6	30	150

**Tabla 2 . Diseño Experimental**

Run N°	Glucosa(g/L)	Extracto de soya(g/L)	Sulfato Ferroso(mg/L)
1	6	30	150
2	12	30	150
3	6	40	150
4	12	40	150
5	6	30	450
6	12	30	450
7	6	40	450
8	12	40	450
9	9	35	300
10	9	35	300



**Tabla 3. Composición del medio GIA01**

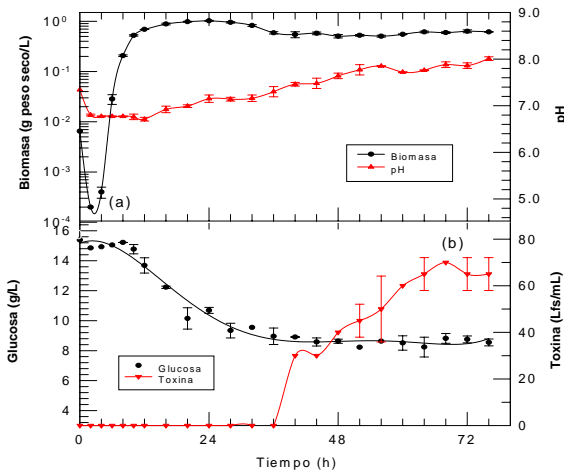
Compuesto	Concentración (g/L)
Digerido enzimático de caseína	23
Extracto de levadura	23
Extracto de soya	35
Glucosa	12.5
NaCl (p.a)	3.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (p.a)	1.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (p.a)	0.15
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (p.a)	0.15
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (p.a)	0.045
Cistína	0.3
Tirosina	0.5
Uracilo	3.0
Ca-pantotenato	1.0
Tiamina	0.25
Riboflavina	0.30
Piridoxina	0.30
Biotina	3.0

**Tabla 4. Promedios resultados obtenidos en la primera fase**

ENSAYO	Biomasa máx.	Tiempo Biomasa máx.(h)	Inicio de Toxina (h)	Toxina máx.	Tiempo de Toxina máx.
1	1.5247	144	0	0	0
2	1.8056	96	0	0	0
3	1.5145	108	0	0	0
4	1.3772	96	0	0	0
5	0.8038	24	72	60	120
6	0.9147	24	96	70	168
7	0.9806	24	96	60	120
8	0.3446	144	96	55	156
9	0.4069	168	96	55	144
10	0.3505	108	96	50	132

**Tabla 5. Resultados promedio de las fermentaciones del *Clostridium tetani* en medio GIA 01.**

Parámetro	Fermentación 5	Fermentación 6	Fermentación 7
Biomasa máxima (g/L)	1.023	0.850	0.956
Tiempo de Biomasa Máxima (h)	24	20	24
Porcentaje de consumo de Glucosa (%)	55.55	60.8	52.1
Velocidad de consumo de Glucosa (g glucosa/ L*h)	0.89	0.18	0.17
Rendimiento observado Biomasa-Sustrato (g biomasa/g glucosa)	0.1653	0.296	0.116
Inicio de detección de toxina (h)	40	40	44
Toxina Máxima (Lf/mL)	70	70	70
Tiempo toxina Máxima (h)	68	68	64
Velocidad de formación de toxina (Lf/L*h)	1.8958	1.620	1.791
Productividad	1029.4	1029.4	1093.7



**FIGURA 1.** Cinética de Crecimiento. Producción de Biomasa, Consumo de Glucosa, Producción de Toxina vs tiempo