

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
CARRERA DE
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD**

**ANÁLISIS DE LAS FUENTES DE CONTAMINACIÓN EN UN LABORATORIO
DE CULTIVO DE TEJIDOS: DETECCIÓN Y MEDIDAS DE CONTROL**

**FRANCISCO AGUILAR CASCANTE
2000.**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
CARRERA DE
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD**

**ANÁLISIS DE LAS FUENTES DE CONTAMINACIÓN EN UN LABORATORIO
DE CULTIVO DE TEJIDOS: DETECCIÓN Y MEDIDAS DE CONTROL**

**FRANCISCO AGUILAR CASCANTE
CARTAGO
2000.**

**ANÁLISIS DE LAS FUENTES DE CONTAMINACIÓN EN UN LABORATORIO
DE CULTIVO DE TEJIDOS: DETECCIÓN Y MEDIDAS DE CONTROL**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de
Costa Rica por Francisco Aguilar Cascante como requisito parcial para
optar al título de bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

Dr. Miguel Rojas
Profesor Guía

Ing. Marco Páez
Lector

Dra. Virginia Montero
Lectora

RESUMEN

En éste trabajo se analizaron las fuentes de contaminación de un laboratorio comercial de cultivo de tejidos las cuales fueron: el medio de cultivo, el papel, las ligas, los operarios, los instrumentos, los explantes y el aire del laboratorio.

Se detectaron los microorganismos de las fuentes utilizando distintos medios microbiológicos (caldos y agar). Se detectaron hongos filamentosos en las ligas, medio de cultivo (esterilizado) y en el aire, a su vez se detectaron bacilos en los instrumentos, medio de cultivo (no esterilizado), aire y explantes, por último se detectaron cocos en los operadores, aire y papel. Se analizaron distintos controles microbiológicos (físicas y químicas) a las fuentes de contaminación. Se esterilizó el medio de cultivo y el papel bajo 20 minutos de esterilización en la autoclave. Los instrumentos se esterilizaron bajo un minuto a 300° C en el incinerador. Se desinfectaron las manos de los operarios utilizando etanol 70° y se desinfectaron las ligas utilizando desinfectantes basados en cloro, glutaraldeído y sales cuaternarias. La contaminación se debe de prevenir detectando las fuentes de contaminación en las distintas etapas del proceso. Así pues es necesario tener un control preventivo y no correctivo.

ABSTRACT

This work analyzed the sources of contamination of a commercial culture tissue laboratory that were: the culture media, the paper, the strings, the operators, the instruments, the explants and the laboratory air. Microorganisms were detected from the sources using different microbiological media (agar and broth). Filamentous fungi were detected from the strings, the culture media (esterilized) and the air. Bacteria (Gram-negative) were detected from instruments, culture media (not esterilized), air and explants. Bacteria (Gram-positive) were detected from operators, air and paper. Different microbiological controls (physical and chemical) were analyzed to the sources of contamination. The culture media and the paper were esterilized at 20 minutes of autoclaving. The instruments were esterilized after one minute at 300° C in the incinerator. The hands of the operators were disinfected with ethanol of 70° and the strings were disinfected using disinfectants based in bleach, glutaraldehyde and quaternary ammonium salts. The contamination must be prevented detecting the sources of contamination in the different stages of the process. So then, it's necessary to have a preventive control and not corrective.

Palabras clave: Contaminación, microorganismos, cultivo de tejidos, desinfección, esterilización.

DEDICATORIA

A Dios, mi padre,
por haberme
iluminado

Francisco Aguilar

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a las siguientes personas y organizaciones su colaboración y ayuda en el desarrollo de esta Práctica de Especialidad:

A Esteban Loria, Ing. Desiree Quesada en especial al Ing. Marco Páez y a todo el personal de la empresa Cristal Vitro S. A. por el apoyo brindado para la realización de éste trabajo.

Al CEQIA-TEC (Laboratorio de servicios químicos y microbiológicos) y en especial a la Dra. Virginia Montero por colaboración en éste proyecto.

A mi profesor guía Dr. Miguel Rojas por sus valiosos aportes y recomendaciones para el trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	18
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	20
A. Contaminantes comunes en cultivos de tejidos.....	20
1. Bacterias Endógenas	24
2. Hongos filamentosos y levaduras.....	25
3. Virus, viroides y bacterias fastidiosas.....	28
4. Ácaros y áfidos.....	28
B. Fuentes de contaminación en cultivo de tejidos	29
1. El explante como la mayor fuente de contaminación	29
2. La piel de los operarios como fuente de contaminación.....	31
3. El aire del laboratorio como fuente de contaminación.....	31
4. Instrumentos y alcohol como fuente de contaminación.....	33
5. El medio de cultivo para plantas como fuente de contaminación.....	34
C. Métodos de detección de contaminantes.....	34
1. Detección de bacterias	34
2. Hongos filamentosos y levaduras.....	35
3. Detección de áfidos y ácaros	36
4. Micoplasmas, virus y viroides.....	36
5. Detección de contaminantes en el aire.	37

D. Controles microbiológicos	38
1. Controles microbiológicos físicos	38
a. Esterilización por calor.....	38
b. El autoclave	39
c. Radiaciones ultravioleta.....	40
d. Filtración	41
2. Controles microbiológicos químicos	41
a. Desinfectantes	41
b. Ajuste de pH en el medio de cultivo.....	44
c. Antibióticos	44
III. OBJETIVOS	46
1. Objetivo general	46
2. Objetivos específicos	46
3. Descripción del laboratorio.....	48
IV. METODOLOGÍA	50
Evaluación de la esterilidad del medio de cultivo y de los contaminantes presentes en él.....	50
Evaluación de distintos tiempos de esterilización en el autoclave para el medio de cultivo	50
Evaluación de la contaminación en los frascos con medio de cultivo durante su almacenamiento.	51
Evaluación de la esterilización del papel utilizado como base para la multiplicación de los explantes y de sus contaminantes.....	51
Detección de microorganismos presentes en el papel.....	51
Evaluación de diferentes tiempos de esterilización en el autoclave para el papel.....	52
Evaluación de la desinfección sobre las ligas utilizadas para sellar los frascos y de contaminantes aislados	52
Evaluación de distintas desinfecciones en las ligas	53

Evaluación del efecto de diferentes alcoholes sobre las manos de las operarias así como la evaluación de sus contaminantes	53
Evaluación de la esterilidad de los instrumentos (pinzas y bisturí) utilizados en la multiplicación de los explantes y de los contaminantes presentes en ellos.	54
Evaluación de diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento sobre los instrumentos en el incinerador.....	54
Evaluación de los contaminantes latentes en una cepa de banano Musa spp. a partir de la etapa de montaje hasta la fase de multiplicación.	55
Detección de contaminantes en el tejido de los explantes.....	55
Detección de contaminantes en el medio de cultivo de los explantes	56
Análisis de la asepsia del aire de los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio.....	57
Recuento de las U.F.C. del aire de los cuartos del laboratorio.	57
Análisis de las U.F.C. del aire en los cuartos de alto tráfico de personal y en las cámaras.....	58
V. RESULTADOS.....	59
A. Evaluación de la esterilidad del medio de cultivo y de los contaminantes presentes en él.....	59
1. Análisis microbiológico del agua utilizada para la preparación del medio de cultivo	59
2. Evaluación de distintos tiempos de esterilización en el autoclave para el medio de cultivo.....	60
B. Evaluación de la contaminación en los frascos con medio de cultivo durante su almacenamiento.....	61
1. Evaluación de la esterilización del papel utilizado como base para la multiplicación de los explantes y de sus contaminantes.....	61
2. Evaluación de diferentes tiempos de esterilización en el autoclave para el papel.....	62

C. Evaluación de la desinfección sobre las ligas utilizadas para sellar los frascos y de contaminantes aislados.....	63
1. Detección de microorganismos presentes en las ligas.....	63
2. Evaluación de distintas desinfecciones en las ligas	63
D. Evaluación del efecto de diferentes alcoholes sobre las manos de los operarios así como la evaluación de sus contaminantes	65
E. Evaluación de la esterilidad de los instrumentos (pinzas y bisturí) utilizados en la multiplicación de los explantes y de los contaminantes presentes en ellos.....	66
1. Detección de microorganismos presentes en los instrumentos.....	66
2. Evaluación de diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento sobre los instrumentos en el incinerador.....	66
F. Detección de los contaminantes latentes en una cepa de banano Musa spp. a partir de la etapa de montaje hasta la fase de multiplicación.....	69
G. Análisis de la asepsia del aire de los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio	71
1. Prueba preliminar para la determinación de un medio de cultivo y tiempos de exposición.....	71
2. Recuento de las U.F.C. del aire de los cuartos del laboratorio.....	73
3. Análisis de las U.F.C. del aire en los cuartos de alto tráfico de personal y en las cámaras	74
VI. DISCUSIÓN	79
A. Evaluación de la esterilidad del medio de cultivo de plantas IN VITRO y de los contaminantes presentes en él.	79
1. Análisis microbiológico del agua utilizada para la preparación del medio de cultivo de plantas IN VITRO	79
2. Evaluación de distintos tiempos de esterilización en el autoclave para el medio de cultivo de plantas IN VITRO.....	80

B. Evaluación de la contaminación en los frascos con medio de cultivo durante su almacenamiento.....	80
C. Evaluación de la esterilización del papel utilizado como base para la multiplicación de los explantes y de sus contaminantes.....	81
1. Detección de microorganismos presentes en el papel.....	81
2. Evaluación de diferentes tiempos de esterilización en el autoclave para el papel.....	81
D. Evaluación de la desinfección sobre las ligas utilizadas para sellar los frascos y de contaminantes aislados.....	82
1. Detección de microorganismos presentes en las ligas.....	82
2. Evaluación de distintas desinfecciones en las ligas	82
E. Evaluación del efecto de diferentes alcoholes sobre las manos de los operarios así como la evaluación de sus contaminantes	83
F. Evaluación de la esterilidad de los instrumentos (pinzas y bisturí) utilizados en la multiplicación de los explantes y de los contaminantes presentes en ellos.....	83
1. Detección de microorganismos presentes en los instrumentos.....	83
2. Evaluación de diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento sobre los instrumentos en el incinerador.....	84
G. Evaluación de los contaminantes latentes en una cepa de banano Musa spp. a partir de la etapa de montaje hasta la fase de multiplicación.....	84
H. Análisis de la asepsia del aire de los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio	85
1. Prueba preliminar para la determinación de un medio de cultivo y tiempos de exposición.....	85
2. Recuento de las U.F.C. del aire de los cuartos del laboratorio.....	87
3. Análisis de las U.F.C. en los cuartos de alto tráfico de personal y en las cámaras.....	88
VII. CONCLUSIONES	90

VIII. RECOMENDACIONES	93
1. Pruebas preventivas.....	93
2. Recomendaciones para el proceso productivo.....	94
IX. BIBLIOGRAFÍA	96
ANEXO I.....	99
Composición de los Medios de Cultivo utilizados en las pruebas	99
Agar Recuento Estándar (APHA)	100
Medio Murashige and Skoog (1962) Composición de las vitaminas (MS) .	100
utilizado.	100
ANEXO II.....	101
Microorganismos detectados en las distintas fuentes de contaminación	101
Bacterias gram (-) detectadas en el medio de cultivo MS	101
no esterilizado en la autoclave.	101
Bacterias gram (+) detectados en el papel.....	102
Hongos filamentosos detectados en las ligas.....	102
Bacterias gram (+) detectados en las manos de los operadores	103
Bacterias gram (-) detectados en los instrumentos (pinzas y bisturí)....	103
Bacteria endógena detectadas en los explantes de banano (Musa spp).	
.....	104
ANEXO III.....	105
Microorganismos detectados en el cuarto de transferencia utilizando el medio	
PDA.....	105
Pasillo (15' de exposición).....	105
Encima cámara (15' de exposición).....	105
Pasillo (30' de exposición)	106
Pasillo (30' de exposición)	106

Microorganismos detectados en el cuarto de transferencia utilizando el medio SDA	107
Encima cámara (15' de exposición)	107
Interior del Cuarto (15' de exposición).....	107
Microorganismos detectados en el cuarto de transferencia utilizando el medio TSA	108
Pasillo (30' de exposición).....	108
Pasillo (15' de exposición).....	108
ANEXO IV	109
Microorganismos detectados en los distintos cuartos del laboratorio.....	109
Entrada.....	109
Oficina	109
Bodega.....	110
Pasillo.....	110
Baño/vestidor de hombres	111
Baño/vestidor de mujeres.....	111
Cuarto de lavado	112
Comedor.....	112
Cuarto de medios	113
Autoclave.....	113
Cuarto de transferencia #3 (horas de trabajo, 11:00 a.m.).....	114
Cuarto de transferencia #3	114
(hora de descanso, 12:20 p.m.).....	114
Cuarto de transferencia #1	115
Cuarto de crecimiento #1	115
Cuarto de crecimiento #3	116
Cuarto de transferencia #2.....	116

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia para la detección de contaminantes en explantes in vitro. Etapa1. Indexación de secciones de explantes estériles removidos asépticamente e incubados en medios bacteriológicos (Leifert et al. 1994a). 35	35
Figura 2. Muestreador de ranura comercial (P100 MicroPortable Air Sampler) ...	37
Figura 3. Dinámica del proceso de esterilización de la autoclave	40
Figura 4. Recuento de microorganismos presentes en el agua en diferentes puntos de la instalación (tomada el 01/09/2000, 8:30 a.m.).....	59
Figura 5. Porcentaje de contaminación presentada en los frascos esterilizados después de dos semanas en los estantes.....	61
Figura 6. Porcentaje de contaminación presentada en las pruebas de papel sometidos a diferentes tiempos de esterilización en el autoclave	62
Figura 7. Porcentaje (%) de contaminación de placas frotadas con manos asperjadas con diferentes alcoholes (etanol 70° e isopropil 1:15).....	65
Figura 8. Porcentaje de contaminación en frascos utilizados para las pruebas con las pinzas del laboratorio incineradas a diferentes temperaturas y tiempos de exposición	66
Figura 9. Porcentaje de contaminación en frascos utilizados para las pruebas con los bisturís del laboratorio incinerados a diferentes temperaturas y tiempos de exposición	67
Figura 10. Diagrama de multiplicación de explantes para el análisis de contaminantes latentes.....	70
Positivo para el medio de indexación de los tejidos y del medio de cultivo	70
Explante muerto por medios filamentosos.....	70
Figura 11. Sumatoria de microorganismos utilizando diferentes medios de cultivo en 30 minutos de exposición en el cuarto de transferencia.....	71
Figura 12. Zonas sucias, intermedias y limpias de microorganismos en el cuarto de transferencia. C = Cámara de transferencia, P = Pasillo, A = Aire acondicionado. 1 y 3 = Encima de cámara. 2= Aire Acondicionado. 4,5 y 6 = corredor interior. 8 y 7 = Pasillo.....	72

Figura 13. Promedio de microorganismos presentes en los diferentes cuartos del laboratorio (10:30 a.m.) T = Cuarto de transferencia, C = cuarto de crecimiento, M = cuarto de preparación de medios..... 73

Figura 14. Recuento de U.F.C. presentes en los cuartos de mayor tránsito de personal del laboratorio (M=baño/vestidor de mujeres, P=pasillo y T=cuarto de transferencia #1) monitoreada durante cinco semanas..... 75

Figura 15. Promedio de U.F.C. de lunes a viernes (L=lunes, K=martes, M=miércoles, J=jueves y V=viernes) durante cinco semanas analizadas en los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio..... 76

Figura 16. Promedio de U.F.C. durante los días laborales (lunes a viernes) durante cinco semanas en los cuartos (baño/vestidor de mujeres, pasillo y cuarto de transferencia) y cámaras de transferencia del laboratorio..... 77

Figura 17. Promedio de U.F.C. durante cinco semanas en los cuartos (baño/vestidor de mujeres, pasillo y cuarto de transferencia) y en las cámaras de transferencia del laboratorio. 78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias Gram-Positivas aisladas como contaminantes en cultivo de células y tejidos.	21
Cuadro 2. Bacterias Gram-negativas aisladas como contaminantes en cultivo de células y tejidos.	23
Cuadro 3. Especies de levaduras descritas como contaminantes en cultivo de células y tejidos vegetales.....	27
Cuadro 4. Ácaros y áfidos encontrados en los cultivos de tejidos de plantas.....	29
Cuadro 5. Antisépticos y desinfectantes utilizados en diferentes actividades	42
Cuadro 6. Contaminación (%) presentada en frascos con medio de cultivo MS sometidos a diferentes tiempos de esterilización en el autoclave después de dos días.....	60
Cuadro 7. Porcentaje (%) de contaminación de los frascos con ligas sometidos a diferentes desinfectantes durante distintos tiempos de inmersión.	63

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que afecta las plantas propagadas mediante la técnica de cultivo tejidos, tanto en laboratorios comerciales como en investigación, es la contaminación microbial. En los laboratorios causan pérdidas del 3 al 15% en cada subcultivo lo que ha impulsado diversas investigaciones para encontrar formas para evitar este problema (Leifert et al. 1994a). Esta contaminación se traduce en bacterias y hongos, los cuales son comunes en las plantas in vivo, sin embargo son nocivas para las plantas in vitro. Debido al medio de cultivo utilizado en cultivo de tejidos, las plantas son muy susceptibles a los microorganismos in vitro (Skirvin et al. 1999).

La contaminación se puede definir como la introducción accidental de microorganismos (bacterias, hongos, algas), vectores y fuentes patogénicas indeseables, donde se incluyen contaminantes patógenos y no patógenos. (Kubota y Tadokoro. 1999). Sin embargo, las plantas in vitro se consideran como cultivos estériles por lo que la presencia de éstos microorganismos ha llevado a científicos a debatir ésta idea y definirlos mas bien como cultivos asépticos (Herman, 1990). La contaminación es difícil de determinar ya que los métodos de detección de contaminantes aun no son funcionales, por lo que muchos han pensado mas bien que son cultivos “libres de contaminación visual” o bien “libres de contaminantes detectables” (Leifert et al. 1994b).

Muchos de los contaminantes que afectan los laboratorios de cultivo de tejidos no son patogénicos, sin embargo al ser introducidos al medio se convierten en microbios saprófitos produciendo problemas de contaminación a los cultivos (Leifert et al. 1994a).

Las fuentes de contaminación no son contaminantes en si, mas bien acarrear dichos elementos. Entre las principales fuentes de contaminación está el explante, el cual arrastra gran cantidad de microorganismos del campo. El laboratorio contiene los microorganismos introducidos por personas, por entradas del exterior o bien propios de su construcción (Leifert et al. 1994a).

Existen entradas de contaminantes en las diferentes etapas en el proceso como en el caso de la introducción del material de campo donde la contaminación es propia de la planta. A la vez también existen introducciones accidentales como en la preparación de medios, o en el subcultivo de plantas los cuales son los momentos en que se abren los frascos y quedan expuestos, a su vez que una ineficiente técnica aséptica por parte de los operadores puede introducir los contaminantes. Los cultivos mas viejos almacenados en el cuarto de crecimiento sufren contaminaciones de hongos (Leifert et al. 1991).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. Contaminantes comunes en cultivos de tejidos

Bacterias

Uno de los principales problemas de los laboratorios de cultivo de tejidos comerciales es la contaminación bacteriana donde ésta alcanza de 20 al 55% del total de la contaminación. La introducción de éstos microorganismos a los medios estériles causan una disminución de las tasas de multiplicación y de enraízamiento así como la muerte de las plantas. (Leifert et al. 1991). A diferencia de los hongos filamentosos y levaduras, las bacterias muy a menudo no producen un crecimiento visible, y pueden ser detectados tiempo después de la introducción (Leifert et al. 1994a). La mayoría de las bacterias aisladas de los cultivos estériles no son patógenas para las plantas sino saprófitas del suelo, plantas o de la piel del hombre. Las bacterias no se alimentan de la planta sino del medio de cultivo. Éstos contaminantes afectan las plantas de forma indirecta como el caso de *Lactobacillus plantarum* el cual produce ácido láctico al medio matando a las plantas si él produce éste en una alta cantidad. Existen otras que son patogénicas para plantas como es el caso de *Erwinia carotovora* (Leifert et al. 1989).

Cuadro 1. Bacterias Gram-Positivas aisladas como contaminantes en cultivo de células y tejidos.

Género/especie de bacterias	Género de la planta
Actinomyces spp.	Malus
Bacillus spp.	Gerbera, Hevea, Nephrolepsis, Nauclea, Malus, Pteris, Saxifraga, viola
Bacillus circulans	Begonia, Fragaria, Primula
Bacillus cereus	Fragaria, Begonia
Bacillus polymyxa	Gerbera
Bacillus pumilus	Astilbe, Arunchus, Cotinus, Pulmonaria, Primula
Bacillus subtilis	Astilbe, Cotinus, Delphium, Hemerocallis, Malus, Thalictrum
Lactobacillus plantarum	Hemerocallis
Lactobacillus acidophilus	Delphinium
Propionibacterium	Hevea brasiliensis
Staphylococcus spp.	Choysia, Hemerocallis, Paeony
Staphylococcus capitis	Paeony, Hosta
Staphylococcus epidermidis	Choysia, Delphinium, Hemerocallis, Hosta
Staphylococcus saprophyticus	Choysia,
Staphylococcus warneri	Delphinium, Hosta, Paeony
Micrococcus spp.	Choysia, Delphinium, Paeony, Prunus
Micrococcus krisinae	Hemerocallis, Hosta

(Leifert et al. 1994a)

Se ha observado diferencias entre las comunidades bacterianas entre una especie de planta a otra. Esto se asoció a las bacterias específicas por especie de planta las cuales son introducidas al cultivo junto a la planta. Sin embargo, la mayoría de las bacterias identificadas de los cultivos estériles no se introdujeron con la planta sino después, en el manejo aséptico, por ello otros mecanismos deben de estar asociados a la presencia de las distintas comunidades bacterianas entre especies. El pH del medio de cultivo podría ser un factor importante donde un pH de 4.5 a 5.2 vs. 5.6 a 5.8 reduce la incidencia de bacterias. (Skirvin et al. 1999). Este mecanismo es desconocido, sin embargo se cree que la acidificación del medio enmascara los contaminantes bacterianos inhibiendo su crecimiento.

Cuadro 2. Bacterias Gram-negativas aisladas como contaminantes en cultivo de células y tejidos.

Género/especie de bacterias	Género de la planta
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Astilbe, Delphinium, Fragaria, Gerbera, Hevea, Hosta. 'árboles frutales'
<i>Achromobacter</i> spp.	Choysia
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Iris
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Hevea, Choysia, Paeony, Gerbera, Viola
<i>Enterobacter Erwinia</i> spp.	Choysia, Coffea, Fragaria, Gerbera, Hevea, Hosta, Prunus, Viola 'especies maderables'
<i>Erwinia carotovora</i>	Iris, Nephrolepsis, Saxifraga, Pteris,
<i>Enterobacter cloacae</i>	Coffea, Iris, Hevea, Hemerocallis
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coffea
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Delphinium
<i>Rhizobium aquatilis</i>	Iris, Hemerocallis
<i>Flavobacterium</i> spp.	Fragaria, Gerbera, Hosta
<i>Pseudomonas</i> spp.	Coffea, Daphne, Delphinium, Fragaria, Hevea, Hosta, Nauclea, Nephrolepsis, Prunus, Pteris, Saxifraga, Solanum 'árboles frutales'
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Hevea, Hosta
<i>Pseudomonas diminuta</i>	Hevea
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Delphinium, Gerbera, Hosta, Iris, Viola
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Delphinium,
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Choysia, Delphinium, Hevea, Hosta
<i>Pseudomonas putida</i>	Hevea, Gerbera
<i>Pseudomonas typhiflavum</i>	Hevea
<i>Xanthomonas pelargonii</i>	Pelargonium
<i>Xanthomonas</i> spp.	Prunus
Buding bacteria	
<i>Hyphomicrobium</i> spp.	Datura

(Leifert et al. 1994a)

Se ha observado en laboratorios comerciales en Europa que el 26% de la contaminación bacteriana ha sido de *Staphylococcus* o *Micrococcus*, (19%) *Pseudomonas*, (13%) *Bacillus*, (12%) *Enterobacter* o *Erwinia*, (11%) *Lactobacillus*, (3%) *Agrobacterium* y el (3%) de especies de *Acinetobacter* (Leifert et al. 1991).

1. Bacterias Endógenas

Las bacterias endógenas provocan grandes pérdidas en los laboratorios de cultivo de tejidos; afectan las tasas de multiplicación a la vez que logran transferir inóculos a las demás progenies producto de la multiplicación. Este tipo de bacterias permanece latente en la micropropagación y son detectados meses después de la introducción. Los efectos de éstos son numerosos como en el cultivo de papa donde contaminantes latentes provocaron una reducción del largo de la planta, número de hojas, ramas, nudos y el área de la hoja. Entre las bacterias endógenas se encuentran *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* (Leifert et al. 1994a).

La latencia se debe a la alta concentración de sales, concentración de azúcares, pH (Cassells y Barret, 1994). Otros creen que las bacterias permanecen latentes por que la planta no libera nutrientes esenciales. Y es que el medio Murashige and Skoog (1962) no posee éstos factores de crecimiento donde la adición de vitaminas a éste medio permite el desarrollo de microorganismos como *Bacillus circulans* y *Bacillus cereus*. Entre las vitaminas adicionadas al medio MS están: tiamina, riboflavina, pantotenato de calcio, biotina, ácido fólico (Leifert et al. 1994a).

Recientes investigaciones revelan la existencia de bacterias embebidas en el agua del tejido xilemático. Éstas logran sobrevivir el proceso de desinfección inicial debido a la poca penetración de dicho proceso. Con el paso del tiempo éstas logran desarrollarse y formar un “fantasma blanco” (Skirvin et al. 1999). Esta forma de expresión de la bacteria es ocasionada generalmente por bacilos, especialmente *Bacillus licheniformis* y/o *Bacillus subtilis* (Pierik 1990).

La temperatura juega un papel importante en la expresión de contaminantes como en *Hemerocallis* donde al aumentar la temperatura se dio la expresión de bacterias. Caso similar fue *Coffea* donde al aumentar de 20 a 28° C se expresó *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Bacillus*. A la vez, el tiempo de cultivo tiene efectos sobre la expresión. Se cree que las bacterias no logran desarrollarse ya que necesita un tiempo prudencial para adaptarse (Leifert et al. 1991). El cambio de medio (multiplicación a enraizamiento) produce la expresión de bacterias latentes en muchas especies debido al aumento de nutrientes secretados por las raíces. Se ha observado que las citocininas inhiben el crecimiento de bacterias como *Pseudomonas* cuando están en el medio con *Nicotiana*. Sin embargo, existen especies en que éste fenómeno no sucede. Se cree que la presencia de citocininas en el medio de cultivo produce una disminución en la producción de compuestos antimicrobianos en la planta.

2. Hongos filamentosos y levaduras

Se han aislado numerosos hongos y levaduras de los cultivos estériles, sin embargo no se ha profundizado su estudio. Las levaduras aisladas más comunes son *Candida* y *Rodotorula* (levaduras rosadas). Éstas pertenecen a un grupo de levaduras osmofílicas que presentan una tolerancia a las altas concentraciones de azúcar y sal. Los hongos más comunes son *Neurospora*, *Aspergillus*, *Microsporium*, *Cladosporium* (Leifert y Waites, 1990).

La mayoría de los hongos logran desarrollarse en el medio MS ya que es muy similar a los medios sintéticos micológicos en cuanto a su pH, concentración de azúcar. Éstos hongos utilizan los carbohidratos para su metabolismo liberando al medio de cultivo metabolitos fitotóxicos como ácido acético y etanol bajando el pH entre 2 y 3. Ejemplos de estos son *Aspergillus*, *Alternaria* y *Penicillium* los cuales redujeron el pH más rápido que las levaduras. En el suelo, superficie foliar y cultivos hidropónicos in vivo éstos hongos no logran producir la cantidad de éstos metabolitos. Por ello éstos contaminantes se consideran saprófitos in vivo y patógenos in vitro. (Leifert et al. 1994a).

Cuadro 3. Especies de levaduras descritas como contaminantes en cultivo de células y tejidos vegetales

Especie/género de levadura	Número de aislamientos	Especie de planta
<i>Candida albicans</i>	4	Astilbe, Hosta
<i>Candida famata</i>	1	Hosta
<i>Candida guilliermondii</i>	16	Astilbe, Doronicum, Hemerocallis, Hosta
<i>Candida parapsilosis</i>	4	Doronicum, Hosta, Hemerocallis
<i>Candida pelliculosa</i>	3	Delphinium, Hemerocallis
<i>Candida tropicalis</i>	ND	Hevea
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	Hemerocallis
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3	Astilbe, Rose
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	Delphinium
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	Astilbe, Hosta
<i>Torulopsis giabrata</i>	ND	ND

ND: No descrito

(Leifert et al. 1994a)

Se han observado hongos patogénicos in vivo (*Botrytis*, *Alternaria*, *Penicilina* y *Aspergillus*) presentes en los cultivos asépticos. Sin embargo, éstos en las primeras fases del cultivo no tienen un alto desarrollo. Los hongos crecen tiempo después de que la planta se ha desarrollado. Por ello, la planta tiene un mecanismo de resistencia contra patógenos donde libera al medio fitoalexinas y compuestos fenólicos antimicrobianos inhibiendo el crecimiento de hongos. Esta resistencia esta sujeta a las concentraciones de reguladores de crecimiento así como a las condiciones ambientales utilizadas. Estos últimos compuestos son liberados al medio debido a las heridas que sufren los explantes en los subcultivos (Leifert et al. 1994a). Las levaduras y hongos no parecen permanecer latentes ya que al inocular cultivos puros de dichos microorganismos éstos logran desarrollarse en presencia o ausencia de plantas en el medio (Leifert et al. 1994a).

3. Virus, viroides y bacterias fastidiosas.

Éstos microorganismos normalmente (in vivo) son parásitos obligados por lo que no se pueden separar de su hospedero. Los vectores de éstos microorganismos, al igual que bacterias y hongos, son normalmente los ácaros. Éstos afectan los frascos en los cuartos de crecimiento. Entre los principales síntomas producidos a las plantas tenemos una pobre tasa de crecimiento como en el caso de Delphinium donde además produce un amarillamiento en la planta. Entre las principales bacterias fastidiosas existen los micoplasmas, espiroplasmas y rickettsias (Leifert et al. 1994a).

Se considera que las plantas in vitro tienen una mayor resistencia para éstos patógenos con relación a las plantas in vivo. No obstante, se ha observado que éstos patógenos no causan sintomatologías in vitro pero al ser trasplantadas al suelo se vuelven virulentas. Éstos microorganismos están localizados en el interior de los tejidos y células por ello su resistencia se debe a mecanismos internos (Leifert et al. 1994a). Ciertas plantas liberan al medio metabolitos con acción antiviral cuando están en medios asépticos. Se ha observado un aumento en las concentraciones de las proteínas relacionadas con la patogenicidad (proteínas PR) en respuesta a ciertos reguladores de crecimiento (Leifert et al. 1994a).

4. Ácaros y áfidos

Se han identificado pocos ácaros en los cultivos in vitro. Entre los principales se han encontrado Sideroptes graminis, Stemeotarfomemus palidus o Trips tabaci. los cuales se conocen como habitantes o plagas de plantas in vivo. Otros encontrados en los cultivos asépticos como Tyrophagus putrescentiae. Es interesante el hecho de que no se han encontrado ácaros y áfidos que habitan en el polvo de las casas (Leifert et al. 1994a)

Cuadro 4. Ácaros y áfidos encontrados en los cultivos de tejidos de plantas

Género/especie	Especie planta	Vector para
Ácaros		
Stemeotarfomemus palidus	Geranium	*
Sideroptes graminum	Varios	Fusarium poe
Sideroptes spp.	Varios	Hongos
Tyrophagus putrescentiae	Varios	Hongos
Áfidos		
Thrips tabaci	Varios	ND
Aliothrips spp.	Simmondsia	ND

* Plantas fueron visiblemente no contaminadas con otros microorganismos

ND: No descrito

(Leifert et al. 1994a)

B. Fuentes de contaminación en cultivo de tejidos

Autores han afirmado la existencia de cuatro fuentes de infección de contaminantes: la planta (su exterior e interior), el medio nutritivo (no esterilizado), el aire y el operador (trabajo poco preciso). De todas éstas el mas importante es el material vegetal el cual debe ser esterilizado antes de su introducción (Pierik 1990)

1. El explante como la mayor fuente de contaminación

El explante es la mayor fuente de contaminación de hongos y levaduras. Las esporas y otras estructuras reproductivas se adhieren en los explantes o se esconden en sus estructuras. Las plantas pubescentes son un problema particular ya que el desinfectante tiene poca penetración debido a la formación de burbujas de aire en el explante. Por ello, los hongos y levaduras detectados la primera y segunda semana después de la introducción se deben al explante. Las contaminaciones futuras se deben a otra serie de factores (Skirvin et al. 1999).

Los cultivos asépticos son iniciados con un pequeño explante, el cual viene del campo. Éstos explantes son tomados, generalmente, de los órganos de las partes aéreas de la planta que están lejos del suelo. Sin embargo, se ha observado que existen poblaciones de bacteria en la superficie de las hojas convirtiendo al explante en una de las fuentes de contaminación mas importante. Éstas bacterias aisladas son saprófitas, no obstante, en la superficie de las hojas pueden estar microorganismos patógenos los cuales no son visibles (Leifert et al. 1994a).

La superficie de la hoja es como un bosque para las bacterias donde existen tricomas, protuberancias, estomas, ceras, etc. Por ello muchos de los microorganismos habitantes de la superficie foliar sobreviven la desinfección inicial del explante. Se cree que las poblaciones de bacterias viables habitan las cavidades subestomales y los espacios intracelulares (Leifert et al. 1994a).

Se ha observado que es mas difícil de esterilizar los explantes que están expuestos en o cerca del suelo, plantas en campos de ambientes tropicales y plantas irrigadas en la parte superior. En contraste es mas fácil de esterilizar las plantas cultivadas en un ambiente seco (Leifert et al. 1991).

Las bacterias detectadas en las primeras etapas (introducción) son gram (-) perteneciendo a las familias Pseudomonaceae y Enterobacteriaceae. Entre éstas se observaron que el 30% eran pseudomonas fluorescentes, 24% pseudomonas no fluorescentes, 16% Agrobacterium spp. y el 10% Erwinia spp.

Bacterias similares han sido aisladas de Ficus, Dieffenbachia, Syngonium y Zantedeschia. Es común encontrarse éstas bacterias en los primeros estadios de los explantes ya que éstos microorganismos son el grupo dominante de la superficie de las hojas en el campo (Leifert et al. 1994a).

2. La piel de los operarios como fuente de contaminación

Los operarios son una fuente de contaminación debido a que en la piel residen gran cantidad de microorganismos. Entre los microorganismos mas comunes que residen en la piel tenemos *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Pityrosporum*, *Propionibacterium*. Éstos microorganismos no habitan toda la superficie de la piel, solo las áreas mas húmedas como el cuero cabelludo, cara, orejas, regiones axilares, zonas genitourinaria y anal, y palmas y espacios interdigitales de los dedos de los pies (Madigan et al. 1997). Investigaciones han revelado que la piel de las manos y brazos de operarios de plantas expelen 95 bacterias por minuto. Al lavar o esterilizar las manos solo retarda éste fenómeno (Hedrick et al. 1975).

Muchos de los contaminantes observados en los cultivos viejos están asociados con los humanos como lo es *Staphylococcus epidermidis*. Por lo que una mala técnica aséptica por parte de los operarios transfiere microorganismos a los medios de cultivo. Otros microorganismos asociados a los humanos observados en cultivos asépticos son: *Micrococcus*, y levaduras como *Candida albicans* (Leifert et al. 1991). En laboratorios europeos se han observado diferencias en los porcentajes de contaminación entre los operarios, sugiriendo que una ineficiente técnica aséptica sea una importante razón de contaminación (Leifert et al. 1994a).

3. El aire del laboratorio como fuente de contaminación

Se ha observado una correlación entre especies de hongos y levaduras encontrados en las partículas de polvo del aire del laboratorio y en los cultivos contaminados más viejos. Esto sugiere que el ambiente del laboratorio es una fuente de contaminación (Skirvin et al. 1999).

Se cree que los contaminantes se introducen a la hora de dispensar el medio puesto que crecieron en el medio de cultivo sin las plantas. Ahora bien éstos contaminantes eran similares a los encontrados en los cultivos asépticos de mas de un año de edad. Otra evidencia es que los picos de contaminación de hongos filamentosos y levaduras de las plantas coincidieron con los del aire del laboratorio. Los hongos identificados anteriormente se encuentran en los edificios, ambiente externo y en el aire del laboratorio (Leifert et al. 1994a).

Los microorganismos presentes en el interior de los cuartos están influidos por factores como tiempo de ventilación, hacinamiento, naturaleza y grado de actividad de los individuos. Los microorganismos son introducidos por los individuos. Estos expelen pequeñas gotas de la nariz y boca al estornudar, toser e inclusive hablar. Las gotas mas pequeñas permanecen flotando en el aire durante mucho tiempo pero las grandes, como el polvo, se sedimentan sobre las superficies (Pelczar et al. 1982). Por ello se considera el piso como el principal reservorio de microorganismos en todo cuarto (Coriell y McGarrity 1971).

En laboratorios europeos la levadura mas común fue *Candida guilliermondii* (40%), seguida por *C. parapsilosis* (20%) y otras *Candida*. En el caso de hongos filamentosos el más común fue *Penicillium* spp (35%) seguido de *Aspergillus* (17%), *Alternaria* (8%) y *Fusarium* spp. (8%) (Leifert et al. 1994a).

Debido a esto se han realizado cuestionamientos acerca de si las cámaras de flujo laminar dejan pasar ciertos contaminantes. Se cree que los contaminantes tienen una mayor oportunidad de introducirse en la cámara si se trabaja al borde la cámara ya que se han encontrado contaminantes en los primeros 15 y 20 cm del interior de la cámara. Otro punto es el polvo del ambiente que se deposita sobre las tapas y bordes de los frascos. Éstos se introducen en la cámara y al abrirlos se pueden introducir las partículas al medio estéril. Se ha observado que los hongos de éste polvo es similar a los hongos del ambiente. También se ha observado el desarrollo de hongos como *Penicillium* y *Botrytis cinerea* en el agua condensada ubicada en la parte interior de la boca del frasco (Leifert et al. 1994a).

4. Instrumentos y alcohol como fuente de contaminación

Se ha observado infecciones en los cultivos de bacterias del género *Bacillus* debido a una esterilización ineficiente de los instrumentos durante los subcultivos. Esto se debe a que *Bacillus* spp. forma endoesporas resistentes al alcohol y al calor (Skirvin et al. 1999).

Éste tipo de bacterias son capaces de sobrevivir en el alcohol durante horas, específicamente la bacteria *Bacillus macerans* sobrevive inmersiones en alcohol de 95° y 70° durante cinco minutos y flameados de 16 segundos en la lámpara de alcohol. Otras investigaciones han revelado que *Bacillus ciculans* y *Bacillus pumilus* persisten en el alcohol utilizado para esterilizar instrumentos durante mas de una semana (Leifert et al. 1991).

Ciertos trabajos han advertido que si no se calientan suficientemente los instrumentos éstos podrían esparcir *Bacillus* spp a los cultivos limpios. A su vez el flameo de instrumentos en la parte mas caliente de la llama de un quemador de Bunsen por 30 segundos logró una esterilización (Leifert et al. 1994a).

5. El medio de cultivo para plantas como fuente de contaminación.

Se han observado microorganismos presentes en el medio de cultivo los cuales sobrevivieron el proceso de esterilización de la autoclave. Ejemplo de esto tenemos a *Bacillus ciculans* y *Bacillus pumilus* los cuales resistieron un tiempo de esterilización en la autoclave de 20 minutos a 120° C (Skirvin et al. 1999).

Similarmente *Bacillus stearothermophilus* resistió el tratamiento anterior cuando el medio de cultivo se esterilizó en la autoclave en grandes contenedores plásticos (15 x 10 x 7.5 cm) (Leifert et al. 1991).

También se han observado diferencias en las cargas de los frascos resultan insuficientes como tratamientos térmicos. Las esporas resisten el proceso normal de esterilización en la autoclave en los lados del frasco pero no dentro del medio de los frascos de vidrio o plástico del cultivo (Leifert et al. 1994a)

C. Métodos de detección de contaminantes

1. Detección de bacterias

Las bacterias latentes se pueden detectar cortando la parte inferior y superior (ver figura 1) de explantes introduciéndola en medios líquidos para prueba de esterilidad, incubándolos a 26° C durante tres semanas. Después se cuantifica sobre la base de su turbidez. Otra forma es introducir plantas estériles en medios de cultivos sólidos. Una forma mas directa es sembrar la planta en un medio de cultivo para planta con la adición de nutrientes adicionales como peptona o extractos de levadura. Los medios bacteriológicos usados están basados en extractos de plantas o carne y son similares a los medios para bacterias, hongos y levaduras. En éstos medios se ha observado un buen crecimiento de los siguientes microorganismos: *Bacillus*, *Clavibacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Leifert et al. 1994a).

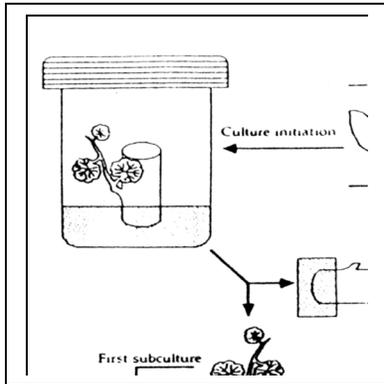


Figura 1. Estrategia para la detección de contaminantes en explantes in vitro. Etapa1. Indexación de secciones de explantes estériles removidos asépticamente e incubados en medios bacteriológicos (Leifert et al. 1994a).

En los medios líquidos se cuantifican las bacterias por medio de la turbidez haciendo uso de un espectrofotómetro el cual mide la absorbancia. De ésta forma se puede obtener el número de U.F.C./ 0.2 ml (Leifert et al. 1992). Otra forma de cuantificar éstos medio líquidos es utilizando el método de McFarland's. Este método mide la densidad de las bacterias sobre la base de su turbidez utilizando como unidad millones de bacterias en un mililitro. Para ello se hace uso de disoluciones estándar basadas en sulfato de bario (Mac Faddin, 1980).

Para detectar bacterias, debido a una esterilización ineficiente del medio de cultivo, es agregado al medio de cultivo un caldo nutritivo como tripticasa y soya. Éste aditivo fomenta el crecimiento bacteriano haciéndolos visibles las colonias facilitando su detección visual (Leifert et al. 1994a). Es importante la detección visual para evitar transmitir los contaminantes de un subcultivo a otro.

2. Hongos filamentosos y levaduras

La mayoría de éste tipo de contaminantes crece bien en el medio utilizado para plantas por lo que el método de detección es una inspección visual. Las levaduras como *Candida* y *Rhodotorula* se pueden detectar con pruebas de esterilidad o en medios de detección utilizados para detectar bacterias latentes (Leifert et al. 1991).

3. Detección de áfidos y ácaros

Éstos no son detectados a simple vista por lo que se necesita un examen microscópico del medio de la planta, frascos y tejido de la planta. Estos microorganismos son importantes vectores de contaminantes como hongos y levaduras. Por ello, incrementos en la contaminación de éstos últimos organismos en los cultivos está asociado con la infestación de áfidos y ácaros (Leifert et al. 1991).

4. Micoplasmas, virus y viroides

Estos microorganismos pueden ser detectados por inoculación a plantas indicadoras, microscopía electrónica o métodos de hibridación de ácidos nucleicos. Otros micoplasmas no pueden ser cultivadas en medios bacteriológicos por lo que se recurren a otras técnicas mas complejas como pruebas serológicas y métodos genéticos. Éstos métodos son muy específicos con respecto al contaminante, por ejemplo se ha utilizado para la detección de *Xanthomonas* pruebas inmunológicas como el ELISA y para *Xanthomonas pelargonium* se ha utilizado sondas de ADN_c en cultivos de *Pelargonium* (Leifert et al. 1991).

5. Detección de contaminantes en el aire.

Existen diversas técnicas para el análisis microbiológico del aire. Así pues el método más simple es el de sedimentación en placa. Ésta consiste en abrir una caja petri que contiene agar de manera que la superficie del medio queda expuesta al aire por varios minutos. En las placas se desarrollan colonias que representan una partícula portadora de microorganismos. Es una técnica tosca ya que solo las partículas de ciertas dimensiones caen en el plato, a la vez que no hay manera de conocer el volumen analizado. Otra forma es el muestreador de ranura el cual es un aparato que hace pasar un volumen de aire definido a través de un cedazo de metal. Bajo el cedazo existe una caja petri que está girando. Existen sistemas comerciales de gran eficiencia (figura 2) utilizados para el control de calidad microbiológico. Existen otros sistemas como los de trampa líquida los cuales se fuerza el aire a pasar a través de líquidos. Posteriormente las colonias atrapadas se siembran en placas (Pelczar et al. 1982).



Figura 2. Muestreador de ranura comercial (P100 MicroPortable Air Sampler)
(<http://www.totalaircare.co.nz>)

El aire del laboratorio no debería de exceder un recuento de 15 colonias/placa/15 minutos bajo un área de aire de 160/m² en 15 minutos de exposición. Para esto se puede utilizar el método de “swab” con platos “RODAC” (Standard Methods, 1995).

Los medios de cultivo utilizados para la detección son los comúnmente usados en microbiología como el medio de recuento standard, papa dextrosa, bilis rojo violeta. El tiempo de exposición de las placas mas utilizado es el de media hora. Las placas son incubadas al tiempo y temperatura oficial (Hedrick et al. 1975).

D. Controles microbiológicos

1. Controles microbiológicos físicos

a. Esterilización por calor

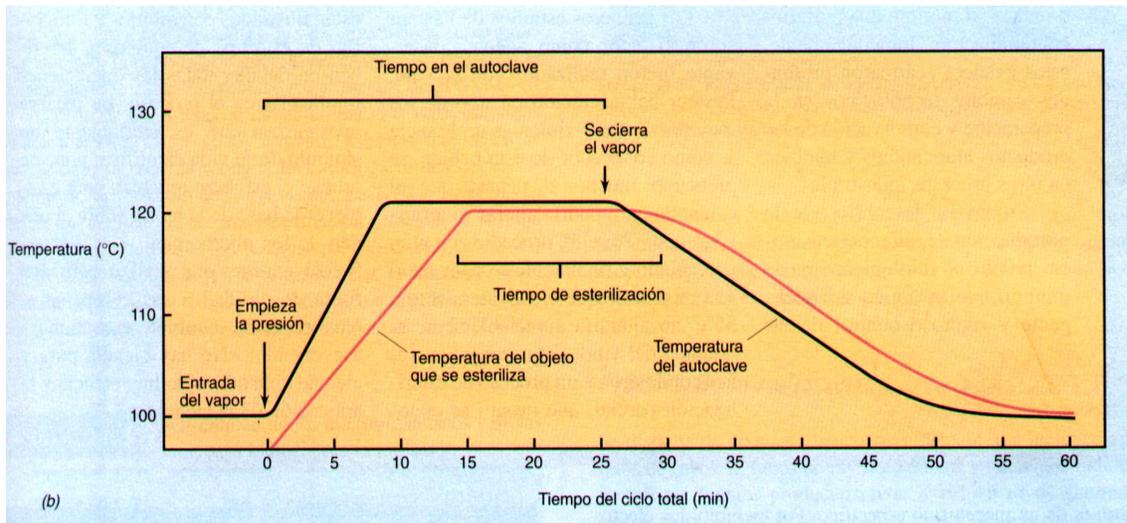
Se producen efectos letales a medida que la temperatura se eleva sobre la temperatura máxima de crecimiento. La muerte por calentamiento es una función exponencial y se produce mas rápidamente la muerte al incrementar la temperatura. Por ello la esterilización durará mas a bajas temperaturas que a altas temperaturas, a su vez será necesario ajustar el tiempo y la temperatura para lograr una esterilización eficiente (Madigan et al. 1997). Es importante considerar la naturaleza del calor, donde el calor húmedo es mas eficiente que el calor seco. El calor húmedo coagula las proteínas teniendo una acción rápida, en comparación el calor seco que desnaturaliza los constituyentes químicos.

Es importante que todo sistema de esterilización tome en cuenta las endosporas ya que son estructuras que resisten más el calor que las otras estructuras reproductivas. Son estructuras resistentes debido a que están deshidratadas producto de la acumulación de Ca^+ y síntesis de ácido dipicolínico. Las estructuras deshidratadas resisten más el calor. Las endosporas necesitan de 4 a 5 minutos de esterilización en la autoclave para reducirse a la décima parte de la población en comparación las células vegetativas necesitan tan solo – minutos de autoclavado para reducir la misma población (Madigan et al. 1997).

Se ha observado que *Bacillus* spp produce endosporas termo resistentes las cuales resisten 100°C de temperatura en la autoclave. Es de suma importancia éste microorganismo ya que es un contaminante común en los cultivos de tejidos vegetales. Como control algunos laboratorios han aumentado los tiempos de autoclavado lo que les ha permitido reducir la contaminación de un 7 a 0.1% en cada subcultivo (Leifert et al. 1994a).

b. El autoclave

Este sistema de control permite la entrada de vapor de agua a presión. Las bacterias mueren al calentar un 1.1 kg/cm^2 de presión de vapor a una temperatura de 121°C durante 10-20 minutos (figura 3). Si se va a calentar objetos voluminosos se necesita más tiempo ya que el calor penetra más lento (Madigan et al. 1997). Es importante evitar la sobre esterilización ya que trae como consecuencia la degradación de los componentes del medio como los carbohidratos. En éstos últimos ocurre la desnaturalización de los azúcares donde se separan a monómeros. (Hurtado y Merino. 1987).



(Madigan et al. 1997)

Figura 3. Dinámica del proceso de esterilización de la autoclave

c. Radiaciones ultravioleta

La radiación ultravioleta se encuentra entre 200 y 300 nm. Estas ondas tienen la suficiente fuerza para causar roturas en el ADN lo que provoca mutaciones al organismo. Se ha observado que la luz ultravioleta destruye los microorganismos hasta un 90% pero normalmente su rango oscila en un 50% (Hedrick et al. 1975). Este tipo de radiación se utiliza sobre objetos que no absorben luz como superficies, agua y aire. Esta no es útil sobre superficies sólida opacas que absorben la luz. Las cámaras de flujo laminar están equipadas con este sistema de luz (Hedrick et al. 1975). Sin embargo, se debe de tener cuidado puesto que éstos rayos causan irritaciones en la piel, por ello éstas luces se deben de prender cuando los cuartos a esterilizar estén vacíos. O bien encender en presencia de personas debidamente protegidas o encendidas dentro de los sistemas de ventilación del aire (Pelczar et al. 1982).

d. Filtración

Existen diferentes tipos de filtros utilizados para limpiar el aire de las partículas de polvo. Estos filtros son usados en los sistemas de ventilación de los cuartos y en las cámaras de flujo laminar. Existen filtros de algodón, vidrio u otros materiales donde su eficacia depende del tiempo en que se hace pasar el aire por el filtro, el tamaño de las partículas que se van a filtrar y la naturaleza del material así como su espesor. En los sistemas se instalan dos filtros gruesos (fibra de vidrio) seguidos de filtros finos (fibras de algodón). Las cámaras de flujo laminar utilizan filtros HEPA los cuales están hechos de acetato de celulosa rodeadas de arillo de aluminio. Éstos filtros logran detener partículas hasta de $0.3 \mu\text{m}$ (Pelczar et al. 1982).

2 Controles microbiológicos químicos

a. Desinfectantes

Los desinfectantes se refieren a los agentes químicos que matan a los microorganismos que se utilizan sobre objetos inanimados (cuadro 5). En contraste los antisépticos son productos químicos que matan o inhiben microorganismos y no son tan tóxicos por lo que se aplican a tejidos de organismos vivos. (Hedrick et al. 1975).

Cuadro 5. Antisépticos y desinfectantes utilizados en diferentes actividades

Agente	Uso en campos relacionados con la salud	Modo de acción
Antisépticos		
Mercuriales orgánicos	Piel	Se combina con los grupos –SH de las proteínas
Nitrato de plata	Ojos del recién nacido para evitar ceguera	Precipita las proteínas
Solución de Yodo	Piel	Yodo los residuos de la tirosina de las proteínas; agente oxidante
Alcohol (70% de etanol en agua)	Piel	Disolvente de lípidos y desnaturizante de proteínas
Bifenoles (Hexaclorofeno)	Jabones, lociones	Rompe la membrana celular
Detergentes catiónicos (compuestos de amonio cuaternario)	Algicida en las piscinas	Interacciona con los fosfolípidos de la membrana
Peróxido de hidrógeno (solución al 3%)	Piel	Agente oxidante
Desinfectantes		
Dicloruro mercuríco	Mesas, superficie de los bancos, suelos	Se combina con los grupos –SH
Sulfato de cobre	Algicida en las piscinas	Precipita las proteínas
Solución de yodo	Instrumental médico	Yodo residuos de tirosina
Gas cloro	Depuración de suministros de agua	Agente oxidante
Compuestos de cloro	Industria lechera, equipos de la industria, alimentaria, suministros de agua	Agente oxidante
Compuestos fenólicos	Superficies	Desnaturaliza proteínas
Detergentes catiónicos (compuestos de amonios cuaternarios)	Instrumental médico, equipos de la industria lechera y alimentaria	Interacciona con fosfolípidos

(Madigan et al. 1997).

Para la desinfección de explantes se pueden utilizar antisépticos como cloro (hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio, etanol, y peróxido de hidrógeno). El cloruro de mercurio es tóxico por lo que se debe manejar con cuidado. La desinfección común es utilizar hipoclorito de sodio (5.25 ingrediente activo) diluido en agua (v/v) a una concentración de 5 al 20%. Éste proceso es mas efectivo cuando el compuesto Tween 20[®] (0.01%) es agregado. El explante se inmersa en dicha disolución durante sesenta minutos y su eficiencia aumenta si se agitan. Unas plantas son sensibles al hipoclorito de sodio pero son menos sensibles al hipoclorito de calcio, sin embargo éste es inestable por lo que es necesario mezclarlo antes de usarlo (10 g de hipoclorito de calcio en 140 ml de agua bajo una agitación de quince a veinte minutos) y se debe de usar antes de seis o siete horas. De cinco a treinta minutos es suficiente para desinfectar. Este método se ha utilizado para la desinfección de semillas de orquídeas y esporas de helechos (Skirvin et al. 1999).

Otro producto químico utilizado es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Éste es usado en concentraciones del 3 al 12% i.a. con surfacante en períodos de 5 a 15 minutos. No es necesario remover el H₂O₂ debido a que éste rompe la capa de agua y libera el radical (O[•]). Sin embargo en altas concentraciones es necesario removerlo ya que puede decolorarlo de su clorofila (Skirvin et al. 1999).

Para la desinfección del explante se puede utilizar alcohol de 70° y no el de 96° C ya que éste deshidrata el tejido. Después de sumergirlos en alcohol durante unos cuantos segundos no es suficiente para matar todos los microorganismos por lo que después se trata con hipoclorito. Ciertos frutos, como orquídeas, se tratan con alcohol de 96° C y después se flamean (Pierik, 1990).

b. Ajuste de pH en el medio de cultivo.

Una forma para inhibir el crecimiento bacteriano es ajustar el pH. Se ha observado en el cultivos in vitro de Aster, Hemerocallis, Iris y Rosa la disminución de bacterias ajustando el pH inicial del medio de cultivo debajo de 4. Además se observó que el pH inicial de 3,5 no afecta el desarrollo del cultivo de Delphinium. Además se observó que después de dos o tres días el pH del medio sube a 5.8 (Leifert et al. 1994b).

c. Antibióticos

La adición de antibióticos generalmente ocasiona fenómenos fitotóxicos. Esto se debe a que se necesitan concentraciones tan altas que inhiben también el crecimiento y desarrollo de la planta superior. A su vez, el uso de antibióticos puede produce la selección de microorganismos resistentes (Pierik 1990).

Se han utilizado antibióticos con éxito en cultivo de tejidos solo cuando existe un contaminante característico el cual es muy sensible al antibiótico. Así pues existen antibióticos para el tratamiento de *Hyphomicrobium*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus saprophyticus*, y *Pseudomonas paucimobilis*. Sin embargo, existen microorganismos donde no hay un tratamiento efectivo como *Xanthomonas maltophilia*, ni aun las altas concentraciones de antibióticos resultaron efectivas. También resultaron no efectivos los tratamientos aplicados a combinaciones de contaminantes, aun más resultaron hasta tóxicos para la planta (Leifert et al. 1991).

La mayoría de los fungicidas utilizados en cultivo de tejidos resultan tóxicos para la planta. Sin embargo se han encontrado grupos de fungicidas que resultan efectivos. Ejemplos de éstos tenemos al grupo de los benzimidazoles como el tiabendazol y el fenbendazol a una concentración de 30 µg/ml e imazalil a una concentración de 10-20 µg/ml (Shields, et al 1984).

Existen antibióticos que causan inhibición del crecimiento como la rifampicina, cloramfenicol y la neomicina (Leggat and Waites, 1988). Los antibióticos se agregan al medio por medio de una esterilización de filtrado. Ciertas investigaciones han revelado la eficiencia de antibióticos como la tetraciclina, 8-hidroxiquinolina, penicilina, acromicina. En el cultivo de *Cryptocoryne* y *Cichona* se observó que la rifampicina inhibía las bacterias a la vez que permitió un buen crecimiento y desarrollo de las plantas (Pierik 1990).

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Analizar las fuentes de contaminación de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales con el fin de evitar el crecimiento de éstos microorganismos a los cultivos vegetales in vitro.

2. Objetivos específicos

Detectar contaminantes del medio de cultivo, analizar diferentes tiempos de su esterilización en la autoclave y determinar la contaminación sufrida durante su almacenamiento con el fin de obtener el tiempo de esterilización y de almacenamiento más eficiente.

Determinar los contaminantes del papel y analizar sus diferentes tiempos de esterilización en el autoclave con el fin de obtener el tiempo de esterilización más eficiente.

Detectar los microorganismos de las ligas utilizadas para sellar los frascos y analizar diferentes desinfecciones con el fin de obtener la desinfección eficiente.

Detectar los microorganismos presentes en las manos y evaluar la acción de diferentes alcoholes sobre ellos con el fin de determinar el alcohol más eficiente.

Detectar los contaminantes presentes en los instrumentos (pinzas y bisturís) y analizar diferentes tiempos y temperaturas en el incinerador con el fin de determinar la menor temperatura y tiempo para esterilizar.

Detectar contaminantes endógenos en una cepa de banano de la fase de montaje hasta la multiplicación con el fin de determinar los factores de expresión de la bacteria.

Analizar la asepsia de los cuartos del laboratorio, con el fin de determinar su contaminación diaria y semanal.

3. Descripción del laboratorio

Para el proceso de esterilización del medio de cultivo en la autoclave se utilizan cargas de 530 frascos aproximadamente.

En el proceso de multiplicación se utilizan frascos tipo Gerber con tapas tipo magenta, los cuales se utilizan para contener las plantas.

Al final de la jornada destapan los frascos manipulados y los sellan con plástico y ligas. Por ello los frascos son abiertos dos veces: después de su manipulación y al final de la jornada.

El proceso de manipulación y disección de los explantes lo realizan sobre papel tipo kraft previamente esterilizado.

El laboratorio donde se realizaron las experimentaciones está dividido en tres secciones: una sección de oficina (oficinas y bodegas), una sección miscelánea (baños/vestidores, comedor y de lavado) y otra de trabajo (cuarto de medio, autoclave, transferencia y crecimiento).

El personal que labora dentro de las cámaras de transferencia en su totalidad es femenino. El ingreso de éste personal al laboratorio es el siguiente: 1- Puerta del baño/vestidor de mujeres. 2- Pasillo principal. 3- Cuartos de transferencia.

Abreviaturas de los medios de cultivo utilizados en la experimentación

Abreviatura	Medios *
MS	Murashige and Skoog (1962).
PDA	Agar papa dextrosa (Oxoid).
SDA	Agar sabouraud dextrosa (Difco).
APHA	Agar de recuento estandar (Oxoid)
TSA	Agar tripticasa y soya (Merck, 1970)
TSB	Caldo tripticasa y soya (Merck, 1970).
Medios enriquecidos	
MS+TSB	Murashige and Skoog (1962) mas 4 g/L de TSB
TSA+V	Agar tripticasa y soya (Merck, 1970) mas 5 ml/L de vitaminas del MS.
TSB+V	Caldo tripticasa y soya (Merck, 1970) mas 5 ml/L de vitaminas del MS

*Ver Anexo I para las formulaciones

IV. METODOLOGÍA

Evaluación de la esterilidad del medio de cultivo y de los contaminantes presentes en él.

Análisis microbiológico del agua utilizada para la preparación del medio de cultivo. Se analizó el recuento de bacterias, hongos y levaduras presentes en el agua en cinco puntos de la instalación. Se tomaron muestras en el pozo, tanque, pileta externa, cuarto de lavado y cuarto de preparación de medios. Para cada punto se abrió la llave de agua 30 minutos antes de tomar la muestra. Las muestras se dispensaron en bolsas plásticas estériles y se almacenaron en frío hasta su análisis en el laboratorio. El laboratorio donde se realizaron los análisis fue el CEQIA-TEC. Para el análisis se utilizó la técnica contenida en el "Manual para el Control de Calidad Microbiológico, FAO. Recuento Estándar, referencia BAM y Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food, APHA. Se determinó el número de U.F.C. de hongos y levaduras, y del recuento estándar para cada muestra.

Evaluación de distintos tiempos de esterilización en el autoclave para el medio de cultivo

Se evaluaron cinco tiempos de esterilización: 0 (control), 5, 10, 15 y 20 minutos. Para cada tiempo se utilizaron muestras de 30 frascos, el experimento se repitió tres veces. Las muestras consistieron en frascos Gerber con 20 ml de medio MS +TSB. Éste medio fue utilizado por Leifert y sus colaboradores (1994a) para la evaluación de la esterilidad del medio de cultivo de plantas. Para cada tiempo de esterilización la temperatura y la presión de vapor de la autoclave permanecieron constantes (temperatura 121° C y presión de vapor de 1.1 kg/cm²). El procedimiento consistió en colocar la muestra en el centro de la tómbola mas 500 frascos con 20 ml de agua. Se esterilizó la carga de la tómbola (530 frascos) en la autoclave. Posteriormente los frascos se almacenaron en los estantes donde se guarda el medio de cultivo durante un mes a temperatura y luz ambiente.

Después de dos días se obtuvo los porcentajes de contaminación de las muestras para cada tiempo de esterilización mediante la evaluación visual. Posteriormente se aislaron los contaminantes en las muestras contaminadas en placas petri con medio TSA mediante la técnica del rayado (Madigan et al. 1997). Las placas se incubaron a 23° C durante tres días. A los contaminantes aislados se les aplicó la tinción de gram (Madigan et al. 1997) para determinar la morfología de la bacteria.

Evaluación de la contaminación en los frascos con medio de cultivo durante su almacenamiento.

Después de un mes se obtuvo el porcentaje de contaminación de los frascos esterilizados correspondientes a la segunda, tercera y cuarta semana de almacenamiento. Se detectaron los contaminantes en los frascos mediante la evaluación visual.

Evaluación de la esterilización del papel utilizado como base para la multiplicación de los explantes y de sus contaminantes.

Detección de microorganismos presentes en el papel

Se cortaron pedazos de 3 x 3 cm del papel utilizado en el proceso con instrumentos estériles (pinza y bisturí) dentro de la cámara de transferencia y se introdujeron en frascos con 20 ml de medio TSB+V. Después de tres días se aislaron los contaminantes en placas petri con medio TSA+V mediante la técnica del rayado (Madigan et al. 1997). Los contaminantes se aislaron de las placas petri a cuadrados de papel esterilizado dentro de frascos esterilizados utilizando asas estériles. Al cabo de una semana se introdujeron éstos papeles en frascos con medio TSB+V utilizando pinzas estériles. Después de tres días se aislaron los microorganismos del caldo a una placa con TSA+V utilizando la técnica del rayado. Todas las pruebas se incubaron a 23° C durante tres días. A los contaminantes aislados se les aplicó una tinción de gram (Madigan et al. 1997) para determinar la morfología de la bacteria.

Evaluación de diferentes tiempos de esterilización en el autoclave para el papel

Los tiempos analizados para la esterilización del papel fueron 0 (control), 5, 10, 20 y 40 minutos en el autoclave. Para cada tiempo se evaluaron 15 cuadrados de papel, el experimento se repitió tres veces. Para cada tiempo la carga en el autoclave fueron cinco paquetes de papel, cada paquete contuvo 100 cuadrados de papel. El procedimiento consistió en inocular el papel con los microorganismos aislados en el punto anterior. La inoculación se realizó dentro de la cámara de transferencia. Posteriormente se esterilizó las cargas en el autoclave. Después de terminado el proceso en la autoclave los paquetes se abrieron dentro de la cámara de transferencia. Se seleccionaron cuadrados de papel ubicados en el centro de los paquetes. Con instrumentos estériles se cortaron cuadrados de 3 x 3 cm en el centro de cada papel. Una vez cortados se colocaron en frascos con 20 ml de medio TSB+V. Las muestras se incubaron durante tres días a 23° C. Después de una semana se obtuvo el porcentaje de contaminación para cada tiempo de esterilización mediante la evaluación visual.

Evaluación de la desinfección sobre las ligas utilizadas para sellar los frascos y de contaminantes aislados

Detección de microorganismos presentes en las ligas

Se tomaron ligas de uso rutinario de laboratorio y se introdujeron en el medio TSA+V, a su vez se tomó el talco de las ligas y se introdujo en el mismo medio. Para ambos tratamientos se utilizó instrumentos estériles y se realizó en la cámara de transferencia. Se dejó incubar a 23° C durante seis días. Se raspó los contaminantes encontrados con un asa micológica y se pusieron sobre un portaobjetos. Seguidamente se agregó unas gotas de azul de lactofenol y se observó al microscopio.

Evaluación de distintas desinfecciones en las ligas

Se evaluaron tres desinfectantes a una concentración definida en cuatro tiempos diferentes en las ligas. El primero era un desinfectante basado en glutaraldeído al 1.6% v/v (0.05% i.a.), el segundo era basado en cloro al 23% v/v (1.25% i.a) y el tercero basado en una sal de amonio cuaternario al 8 % v/v (1.12% i.a.). También se evaluó el efecto del agua y jabón y ningún tratamiento (control). Las ligas se introdujeron por tiempos definidos de 0.15, 0.3, 1 y 2 minutos. Para cada tratamiento se utilizaron diez ligas, el experimento se repitió tres veces. Para éste análisis se utilizaron las ligas del laboratorio. El procedimiento consistió en lavar las ligas con agua y jabón. Seguidamente las ligas se llevaron dentro de la cámara de transferencia donde se introdujeron, mediante el uso de pinzas estériles, a baekers los cuales tenían 250 ml de tres desinfectantes. Una vez terminado cada tiempo se sacaron las ligas y se introdujeron en frascos con 20 ml de medio TSB+V. Para cada uno las muestras se incubaron a 23° C durante seis días. Después de ese tiempo se obtuvo el porcentaje de contaminación para cada tratamiento. Se detectaron los contaminantes de forma visual.

Evaluación del efecto de diferentes alcoholes sobre las manos de las operarias así como la evaluación de sus contaminantes

Se evaluaron dos tipos de alcoholes (etanol 70° y alcohol isopropílico 1:15) sobre las manos de las operarias (previamente lavadas). Para cada tratamiento se utilizaron muestras de 8 operarias . El experimento se repitió tres veces. El procedimiento consistió en rociarse las manos con los alcoholes mediante una bomba. Seguidamente se frotaron las manos sobre placas con medio TSA+V. Además se tomaron muestras de manos que no fueron rociadas con alcohol como control. Cada placa se incubó a 23° C durante tres días. Posteriormente se obtuvo el porcentaje de contaminación de las placas utilizadas. A los contaminantes se les aplicó una tinción de gram (Madigan et al. 1997) para determinar la morfología de la bacteria.

Evaluación de la esterilidad de los instrumentos (pinzas y bisturí) utilizados en la multiplicación de los explantes y de los contaminantes presentes en ellos.

Detección de microorganismos presentes en los instrumentos.

Se detectaron los microorganismos presentes en los instrumentos (no esterilizados). Para ello se utilizaron los instrumentos de uso rutinario del laboratorio. El tratamiento constó de ocho muestras, el experimento se repitió tres veces. El procedimiento constó en sumergir la punta de las pinzas durante 30 segundos en frascos con 20 ml de medio TSB + V. Las pruebas se incubaron a 23° C durante tres días. Posteriormente se aislaron los microorganismos en placas petri con medio TSA mediante la técnica del rayado (Madigan et al. 1997). Las placas se incubaron a 23° C durante tres días. A los contaminantes aislados se les aplicó una tinción de gram (Madigan et al. 1997) para determinar la morfología de la bacteria.

Evaluación de diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento sobre los instrumentos en el incinerador.

En éste apartado se analizó la esterilización de instrumentos de trabajo (bisturí y pinzas) a diferentes tiempos y temperaturas en el incinerador. Se utilizaron tratamientos de 100, 200 y 300° C a tiempos de incineración de 0" (control), 15", 30", 1', 2' y 4' respectivamente. Cada tratamiento constó de tres muestras, el experimento se repitió tres veces. El procedimiento consistió en sumergir la punta de los instrumentos en un caldo con las bacterias aisladas de los instrumentos momentos antes de ser calentados en el incinerador. Posteriormente los instrumentos fueron calentados y después se sumergieron durante 30 segundos en frascos con 20 ml de medio TSB+V. Las muestras se incubaron a 23° C durante tres días. Después de ese tiempo se obtuvo el porcentaje de contaminación para cada tratamiento. Los contaminantes se detectaron de forma visual. Para comprobar los resultados se realizaron pruebas de vaciado a las muestras.

Evaluación de los contaminantes latentes en una cepa de banano *Musa spp.* a partir de la etapa de montaje hasta la fase de multiplicación.

Se analizaron los contaminantes presentes en el tejido y el medio de cultivo que embebe a los explantes. Para ello se utilizaron 22 explantes de banano *Musa spp.* variedad Vallery en la fase de montaje. Se realizaron tres multiplicaciones, el intervalo entre cada multiplicación fue de un mes aproximadamente, por lo que se llevó el material de la fase de montaje hasta la multiplicación. Las plantas se incubaron en el cuarto de crecimiento que estuvo a 23° C, 10 horas de luz por día. Se analizó la multiplicación de cada explante de forma individual, formando un diagrama de multiplicación así como de la contaminación.

Detección de contaminantes en el tejido de los explantes

En cada subcultivo, se cortó la parte inferior y superior del tejido para cada explante (Leifert et al; 1994) y se introdujeron en frascos con 20 ml de medio TSB+V. Las muestras se incubaron en el cuarto de crecimiento durante diez días. La detección de contaminantes se realizó de forma visual, donde los contaminantes encontrados se aislaron en placas petri con medio TSA mediante la técnica del rayado (Madigan et al. 1997). Las placas se incubaron a 23° C durante tres días. A los contaminantes aislados se les aplicó una tinción de gram (Madigan et al. 1997) para determinar la morfología de la bacteria.

Detección de contaminantes en el medio de cultivo de los explantes

Para cada multiplicación se aisló una parte del medio de cultivo que embebe a los explantes y se introdujeron en frascos con 20 ml de medio TSB+V. El procedimiento se realizó dentro de la cámara de transferencia haciendo uso de pinzas estériles. Las muestras se incubaron en el cuarto de crecimiento durante diez días. La detección de contaminantes se realizó de forma visual, donde los contaminantes encontrados se aislaron en placas petri con medio TSA mediante la técnica del rayado (Madigan et al. 1997). Las placas se incubaron a 23° C durante tres días. A los contaminantes aislados se les aplicó una tinción de gram (Madigan et al. 1997) para determinar la morfología de la bacteria.

Análisis de la asepsia del aire de los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio

Prueba preliminar para la determinación de un medio de cultivo y un tiempo de exposición.

Se comparó la capacidad de detección de contaminantes del aire de los siguientes medios: PDA, SDA, TSA y APHA. Para cada medio se establecieron dos tiempos de exposición (15 y 30 minutos). Para ésta prueba se utilizó la técnica de sedimentación en placa (Pelczar et al; 1982). Se utilizaron placas petri de 100 x 15 mm. Se analizaron ocho zonas en el cuarto de transferencia. El procedimiento consistió en abrir las placas con el medio de cultivo de acuerdo de los tratamientos. Las placas se incubaron a 23° C (misma condición del cuarto de crecimiento) durante ocho días. Se obtuvo el número de las U.F.C. (unidades formadoras de colonias) de acuerdo al medio y al tiempo de exposición. Para ello se realizaron conteos de forma visual de U.F.C. el tercer y octavo día.

Recuento de las U.F.C. del aire de los cuartos del laboratorio.

Se analizó el número de U.F.C. de cada cuarto del laboratorio. Para cada cuarto se utilizaron duplicados (dos placas por cuarto). Se utilizaron placas petri con medio TSA+V a un tiempo de exposición de 30 minutos. Éste medio tiene vitaminas, ciertos investigadores como Leifert, C. y sus colaboradores (1992) las han utilizado antes. Sin embargo, ésta metodología utilizó otras vitaminas las cuales son las que están presentes en el MS.

Las placas se incubaron a 23° C durante ocho días. Posteriormente se obtuvo el promedio de U.F.C. de cada cuarto y se determinó los cuartos de mayor contaminación.

Análisis de las U.F.C. del aire en los cuartos de alto tráfico de personal y en las cámaras

Se realizó una prueba para determinar el número de U.F.C. en los cuartos de mayor tránsito del laboratorio y las cámaras de transferencia utilizando la metodología del punto anterior. Los cuartos analizados fueron en el baño/vestidor de mujeres, el pasillo y el cuarto. El procedimiento consistió en exponer las placas al aire todas las mañanas (7:10 a.m.) durante los días laborales, utilizando como respaldo duplicados para cada punto. Para las cámaras se utilizó el procedimiento anterior con la diferencia que se instalaron las placas a la hora del cierre de la jornada, lo cual fue variable (4:30 p.m. o 5:30) dependiendo del día y de la semana. Las pruebas se realizaron durante cinco semanas. Las placas se incubaron a 23° C durante ocho días. Posteriormente se obtuvo el porcentaje de U.F.C. de acuerdo a los cuartos, días (lunes a viernes) y semanas (1 a la 5)

V. RESULTADOS

A. Evaluación de la esterilidad del medio de cultivo y de los contaminantes presentes en él.

1. Análisis microbiológico del agua utilizada para la preparación del medio de cultivo

El análisis de agua mostró el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) de bacterias, hongos y levaduras en un ml de agua. El agua del laboratorio presentó un mayor recuento de bacterias con relación a los hongos (5 U.F.C.). Se observó una disminución de microorganismos del pozo al cuarto de lavado (figura 4), siendo la excepción a ésta tendencia el agua del cuarto de medios ($1,3 \times 10^3$ U.F.C.). Ésta última se tomó de la salida del purificador de agua, el cual poseía un filtro para materia orgánica y otro para aniones y cationes.

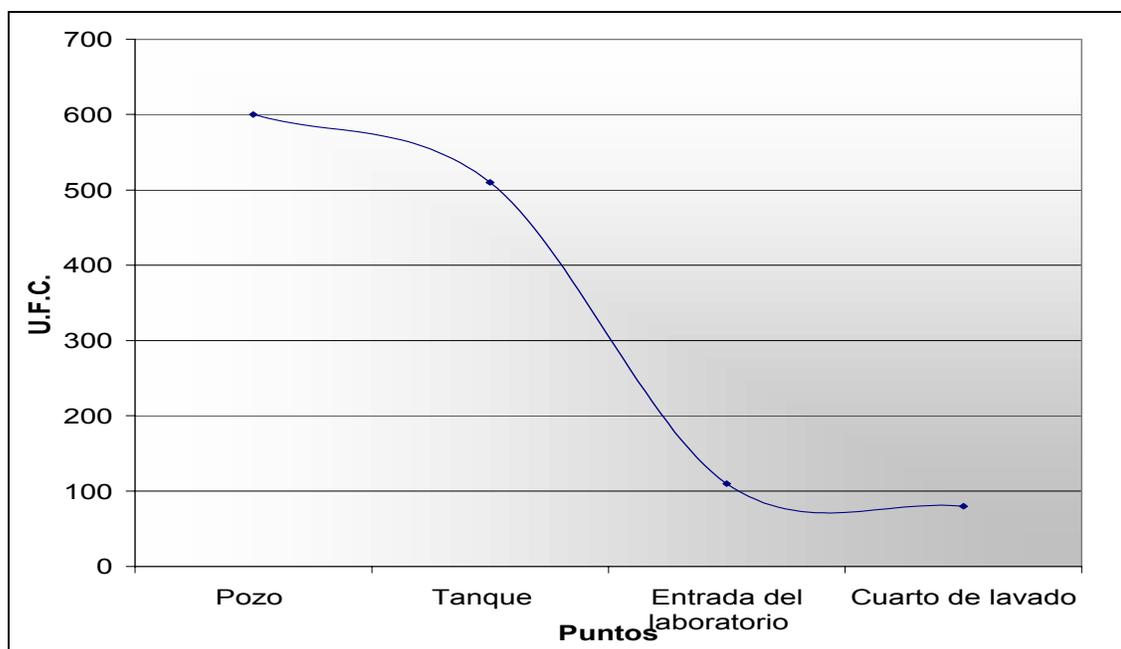


Figura 4. Recuento de microorganismos presentes en el agua en diferentes puntos de la instalación (tomada el 01/09/2000, 8:30 a.m.).

2. Evaluación de distintos tiempos de esterilización en el autoclave para el medio de cultivo

En los tratamientos de 0 y 5 minutos de esterilización se presentó una contaminación del 100% después de dos días. Los contaminantes encontrados fueron gram (-). En los tratamientos de 10, 15 y 20 minutos de esterilización el porcentaje de contaminación fue del 0% (cuadro 6).

Cuadro 6. Contaminación (%) presentada en frascos con medio de cultivo MS sometidos a diferentes tiempos de esterilización en el autoclave después de dos días.

Tiempo (minutos)	Contaminación (%)
0	100
5	100
10	0
15	0
20	0

En los frascos con MS esterilizados por 20 minutos se observaron varios medios hidrolizados (1.6%), es decir el medio perdió soporte y se volvió acuoso. En los otros tratamientos (0, 5, 10 y 15 minutos de esterilización) el medio permaneció rígido. Los tiempos de esterilización de 10 y 15 no mostraron contaminación ni hidrólisis del medio, por lo que fueron tiempos balanceados.

B. Evaluación de la contaminación en los frascos con medio de cultivo durante su almacenamiento.

Después de quince días aparecieron contaminantes (hongos filamentosos) en todos los tratamientos donde se presentó la siguiente contaminación: Segunda semana 1.3%, tercera semana 2% y cuarta semana 2.6%. Los contaminantes eran hongos filamentosos y se encontraron en la superficie del medio y cerca de los bordes. Se observó una tendencia donde a mayor tiempo de almacenamiento aumentaba la contaminación de los frascos.

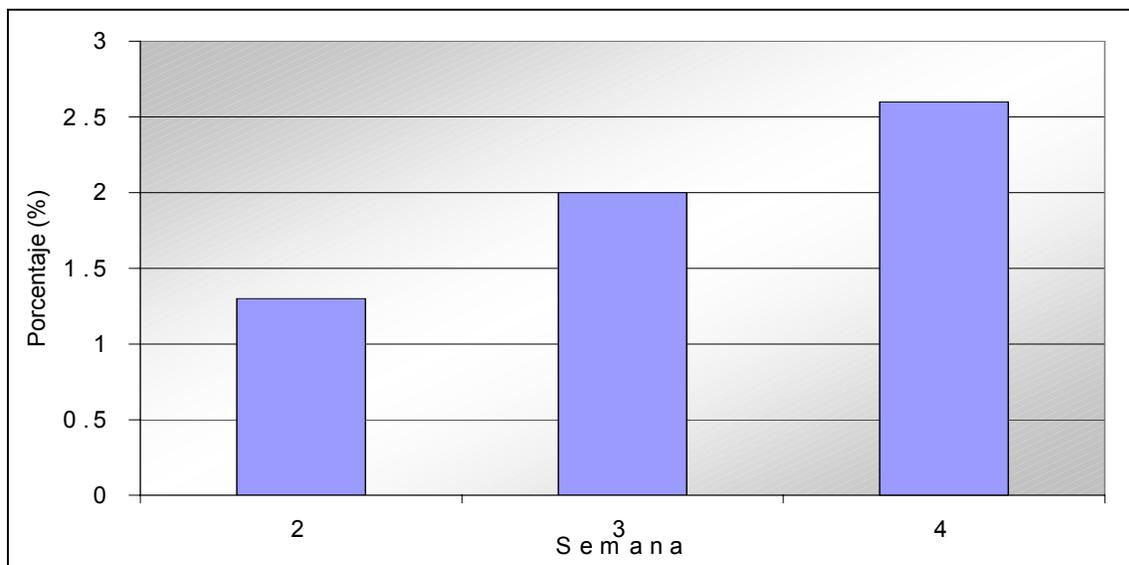


Figura 5. Porcentaje de contaminación presentada en los frascos esterilizados después de dos semanas en los estantes.

1. Evaluación de la esterilización del papel utilizado como base para la multiplicación de los explantes y de sus contaminantes.

Detección de microorganismos presentes en el papel

Después de tres días se observaron bacterias gram (+) en todas las muestras de papel pruebas. Esto evidenció que las bacterias pueden permanecer en el papel por cierto tiempo.

2. Evaluación de diferentes tiempos de esterilización en el autoclave para el papel

El porcentaje de contaminación de los papeles esterilizados en la autoclave a 5, 10, 15, 20 minutos fue del 0%. El control, el cual no se esterilizo en la autoclave, tuvo una contaminación del 100% (figura 6). No se encontró un tiempo mínimo para esterilizar ya que el tiempo más bajo para esterilizar fueron cinco minutos y en éste tiempo no se encontraron contaminantes. En sí, los tratamientos para esterilizar el papel en la autoclave fueron efectivos.

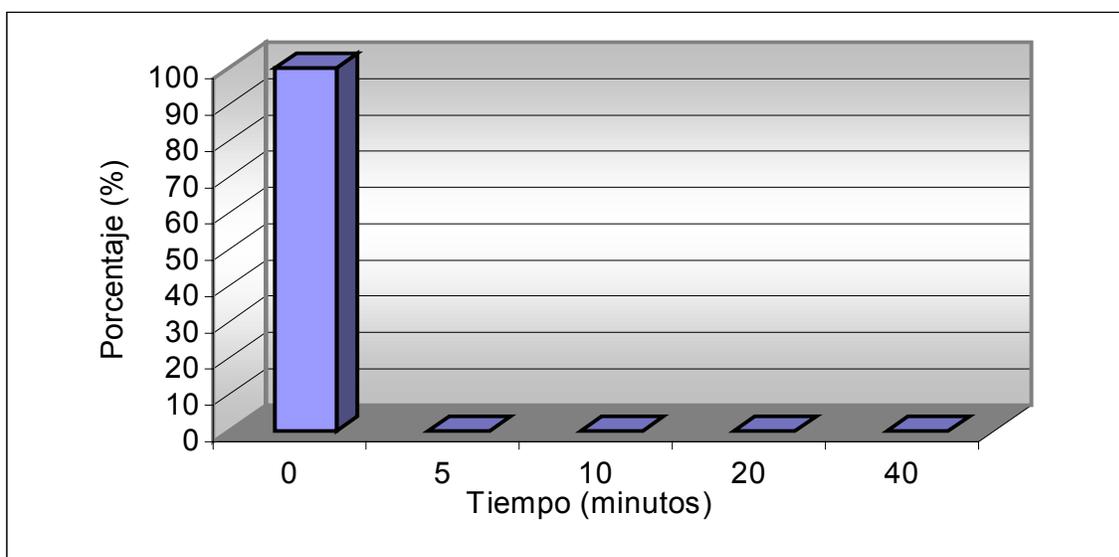


Figura 6. Porcentaje de contaminación presentada en las pruebas de papel sometidos a diferentes tiempos de esterilización en el autoclave

C. Evaluación de la desinfección sobre las ligas utilizadas para sellar los frascos y de contaminantes aislados

1. Detección de microorganismos presentes en las ligas

En el talco y las ligas se detectaron los mismos contaminantes (hongos filamentosos). De acuerdo a las pruebas microscópicas y a las observaciones macroscópicas éstos hongos fueron similares a los encontrados en las plantas in vitro. La forma y tamaño de las estructuras reproductoras fueron similares al hongo filamentoso *Penicillium* spp.

2. Evaluación de distintas desinfecciones en las ligas

Los tratamientos sometidos a agua y jabón presentaron una contaminación del 100% (cuadro 7). En ellos apareció en mayor proporción bacterias y no hongos como lo traen las ligas sin tratamiento.

Cuadro 7. Porcentaje (%) de contaminación de los frascos con ligas sometidos a diferentes desinfectantes durante distintos tiempos de inmersión.

	Tiempo (minutos)			
	0.15	0.3	1	2
Agua y Jabón	100	100	100	100
Glutaraldehído (1.6% v/v, 0.05% i.a.)	0	0	0	0
Sal de amonio cuaternario (8 % v/v, 1.12% i.a.)	0	0	0	0
Cloro (23% v/v, 1.25% i.a.)	0	0	0	0

En los tratamientos de desinfectantes basados en glutaraldehído, sal de amonio cuaternario y cloro no se contaminaron y no se observaron diferencias entre los distintos desinfectantes así como en los tiempos de inmersión. Al finalizar los tratamientos las ligas quedaron libres del talco, sin perder sus propiedades elásticas y de resistencia. Por ello, todos los tratamientos con desinfectantes fueron efectivos para desinfectar los contaminantes propios de las ligas (hongos).

D. Evaluación del efecto de diferentes alcoholes sobre las manos de los operarios así como la evaluación de sus contaminantes

Las placas frotadas con manos tratadas con etanol de 70° obtuvieron un porcentaje de contaminación menor con relación a las tratadas con el isopropil 1:15 (figura 7). Sin embargo, los porcentajes de contaminación de ambos tratamientos fueron muy altos. Los contaminantes encontrados en las placas fueron bacterias gram (+).

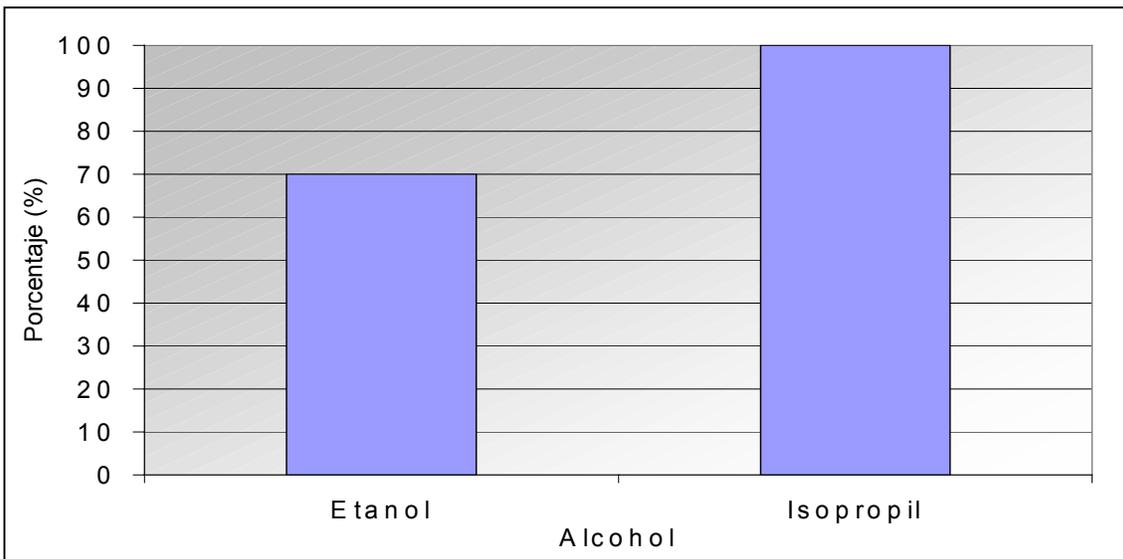


Figura 7. Porcentaje (%) de contaminación de placas frotadas con manos asperjadas con diferentes alcoholes (etanol 70° e isopropil 1:15).

E. Evaluación de la esterilidad de los instrumentos (pinzas y bisturí) utilizados en la multiplicación de los explantes y de los contaminantes presentes en ellos.

1. Detección de microorganismos presentes en los instrumentos.

El porcentaje de contaminación de los frascos fue del 87.5 %. Los contaminantes fueron bacterias gram (-). Los microorganismos aislados sirvieron como inóculo para la prueba de esterilidad de los instrumentos.

2. Evaluación de diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento sobre los instrumentos en el incinerador.

La temperatura de 100° C fue insuficiente para esterilizar las pinzas (figura 8), sin embargo la temperatura de 200° C fue eficiente para esterilizar después de dos minutos de exposición al incinerador. Igualmente la temperatura de 300° C fue eficiente para esterilizar las pinzas después del minuto de exposición.

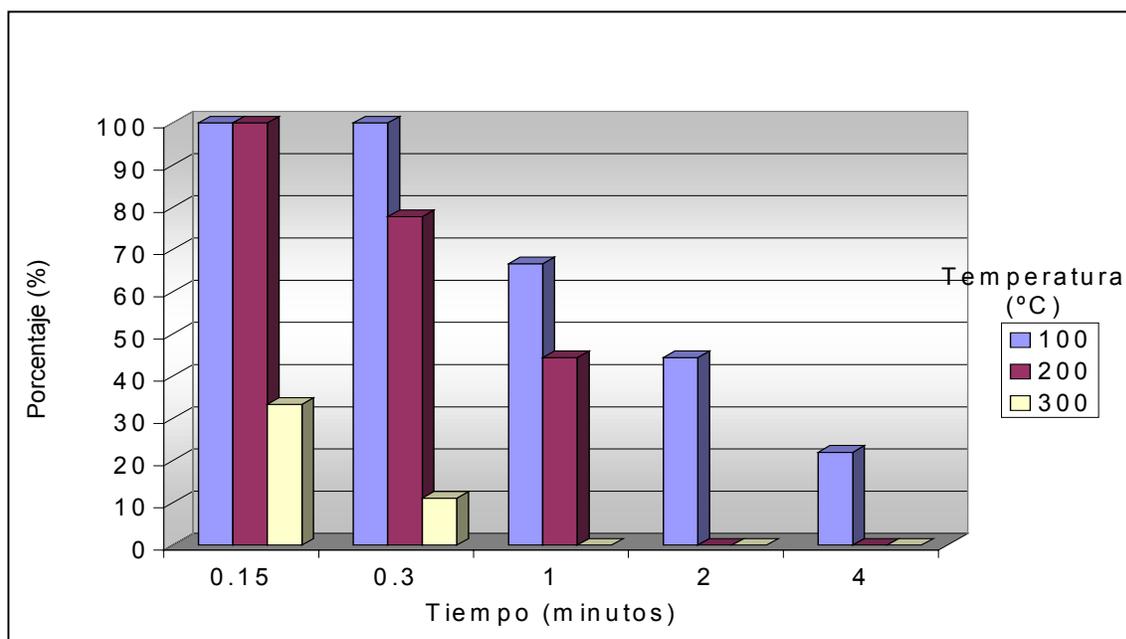


Figura 8. Porcentaje de contaminación en frascos utilizados para las pruebas con las pinzas del laboratorio incineradas a diferentes temperaturas y tiempos de exposición

La temperatura de 100° C fue insuficiente para esterilizar los bisturíes (figura 9), sin embargo la temperatura de 200° C fue eficiente para esterilizar después de cuatro minutos de exposición al incinerador. Igualmente la temperatura de 300° C fue eficiente para esterilizar las pinzas después del minuto de exposición.

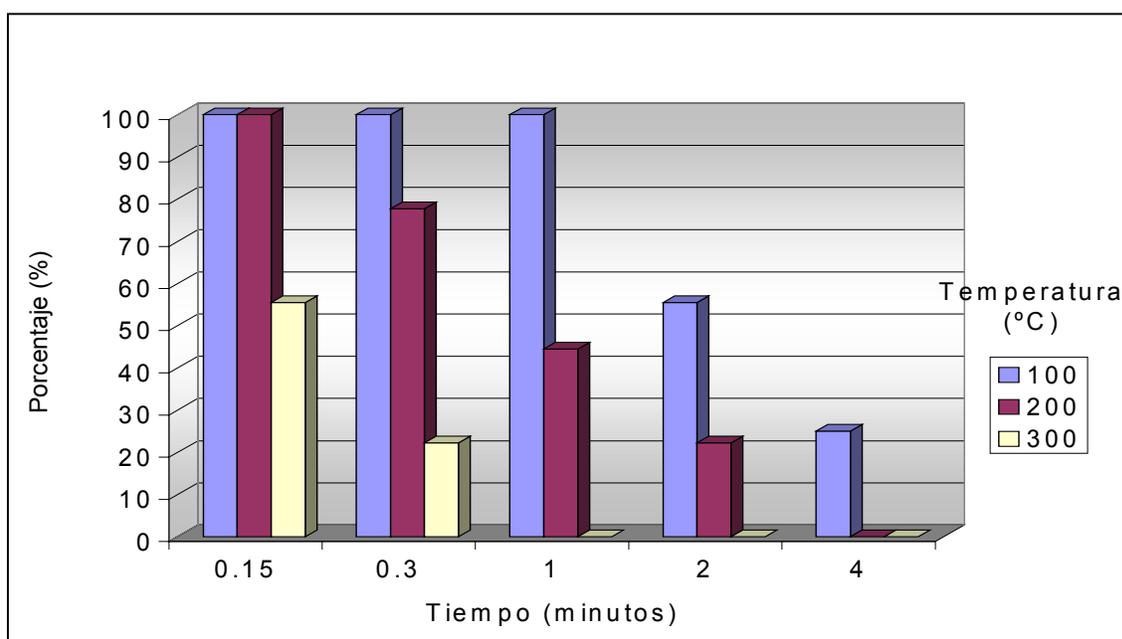


Figura 9. Porcentaje de contaminación en frascos utilizados para las pruebas con los bisturís del laboratorio incinerados a diferentes temperaturas y tiempos de exposición

La temperatura de incineración de 100° C fue insuficiente para esterilizar los instrumentos. La temperatura de 200° C logró esterilizar a partir de 4 minutos de incineración, mientras que la temperatura de 300° C logró esterilizar a partir del minuto uno. Se observó una tendencia donde al aumentar la temperatura el porcentaje de frascos contaminados disminuía. A la vez, al aumentar el tiempo de incineración disminuía el porcentaje de frascos contaminados (figura 8 y 9).

Éstos resultados fueron respaldados por las pruebas de vaciado, donde los tratamientos que presentaron un 0 % de contaminación no aparecieron U.F.C. En éste punto no fue necesario cuantificar los contaminantes sino determinar a que temperatura murieron los microorganismos.

F. Detección de los contaminantes latentes en una cepa de banano *Musa spp.* a partir de la etapa de montaje hasta la fase de multiplicación.

Ciertos explantes no se dividieron sino que se pasaron a un nuevo medio en cada subcultivo debido a que no alcanzaron un tamaño suficiente para ser divididos. Se observó oxidación alrededor del medio de cultivo en que estuvieron los explantes.

Otros frascos se contaminaron de hongos filamentosos, éstos estaban localizadas lejos del explante. Éstos se pasaron a medios de cultivo nuevos, sin embargo existieron casos que no se pudieron rescatar como el explante 1B, 7, 11A, 11B, 12A, 17A y 17B (figura 10).

El valor de la tasa de división de los explantes fue menor a dos en cada subcultivo. Se partieron de 22 explantes y se multiplicaron a 106 explantes obteniendo una tasa de multiplicación fue de 1,2.

Se detectaron bacilos (Anexo II) en los medios de indexación de las secciones de medio MS y de tejido de las plantas. No obstante no se visualizó en las plantas. En las secciones de tejido y medio de cultivo de los explantes uno y dos (figura 10) se detectó un crecimiento característico bacteriano a través de todos los subcultivos (en total fueron tres). No obstante la bacteria no se expresó en las plantas. En las secciones de tejido y medio de cultivo de los explantes tres y cuatro se detectaron bacterias similares al caso anterior. A diferencia, los explantes tres y cuatro presentaron contaminantes a partir del segundo subcultivo. De forma similar con los explantes tres y cuatro no se expresó en las plantas.

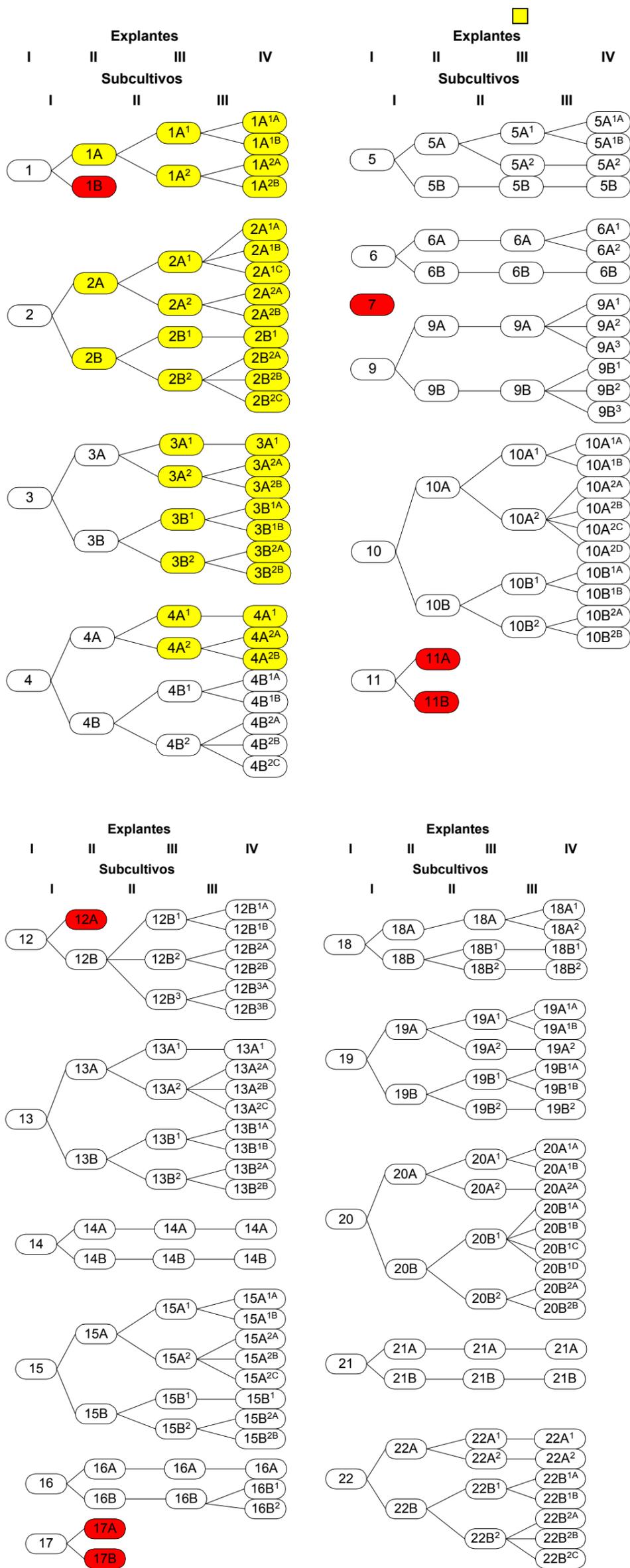


Figura 10. Diagrama de la multiplicación de explantes para el análisis de contaminantes latentes. Positivo para en el medio de indexación de los tejidos y del medio de cultivo ■ Explante muerto por hongos filamentosos ■

Figura 10. Diagrama de multiplicación de explantes para el análisis de contaminantes latentes. Positivo para el medio de indexación de los tejidos y del medio de cultivo ■

G. Análisis de la asepsia del aire de los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio

1. Prueba preliminar para la determinación de un medio de cultivo y tiempos de exposición.

Se observaron diferencias entre los medios utilizados así como en las zonas analizadas. El medio TSA tuvo un mayor recuento de microorganismos en comparación con los demás medios (Figura 11). A su vez éste medio permitió detectar hongos filamentosos y bacterias (Anexo III). El medio PDA fue el segundo de mayor recuento, detectando hongos y mohos. El medio APHA presentó el tercer mayor recuento detectando, en su mayoría, bacterias. El menor recuento fue el medio SDA detectando, en su mayoría, hongos filamentosos. A pesar de las diferencias, los medios marcaron las mismas tendencias con respecto a las zonas analizadas.

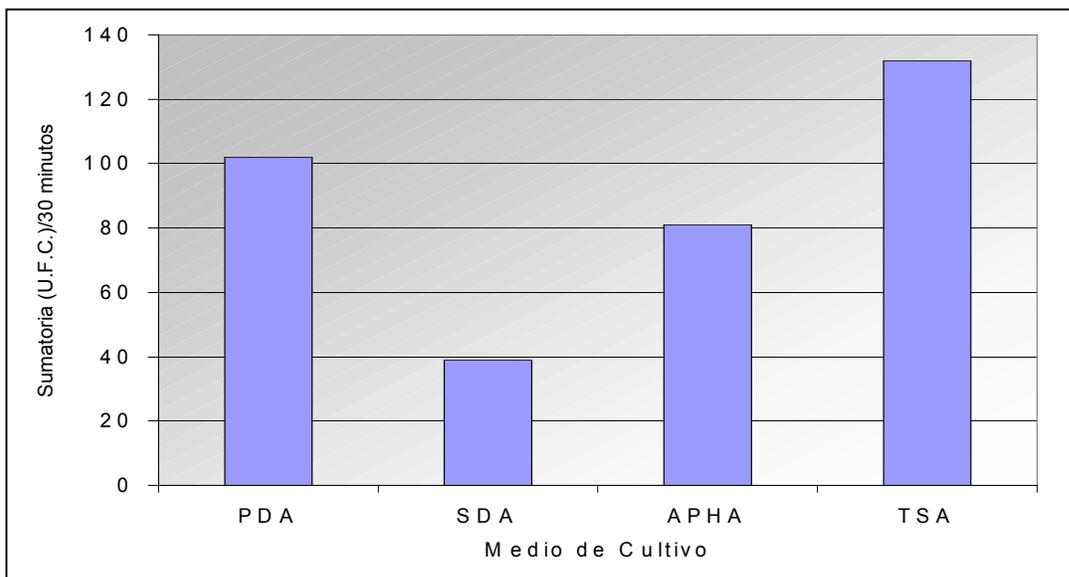


Figura 11. Sumatoria de microorganismos utilizando diferentes medios de cultivo en 30 minutos de exposición en el cuarto de transferencia.

El tiempo de exposición de 30 minutos en las placas mostró un mayor recuento con relación al tiempo de exposición de 15 segundos. A su vez el primer tiempo de exposición permitió establecer diferencias entre las zonas del cuarto de transferencia, agrupándolas en zonas limpias, intermedias y sucias.

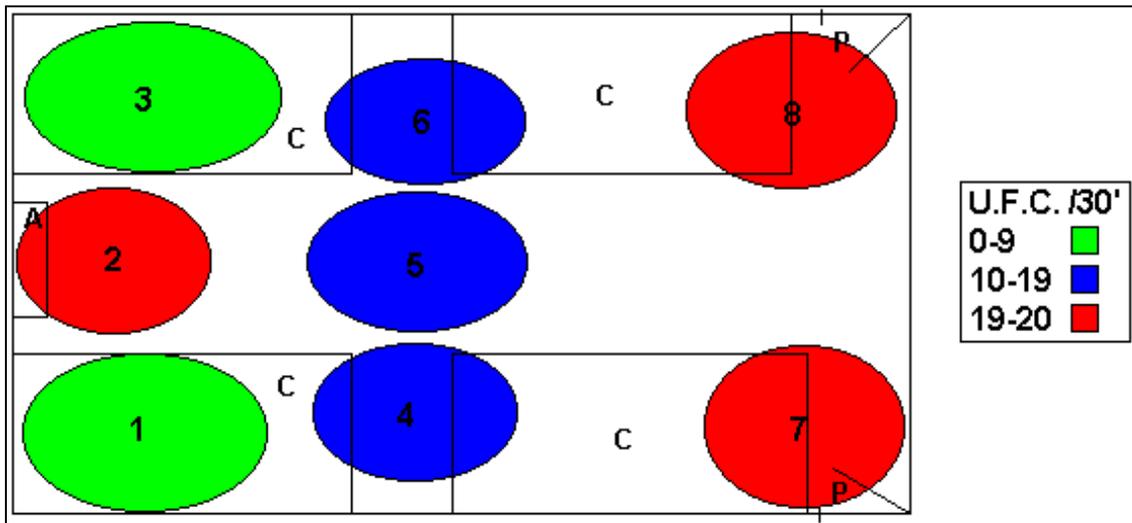


Figura 12. Zonas sucias, intermedias y limpias de microorganismos en el cuarto de transferencia. C = Cámara de transferencia, P = Pasillo, A = Aire acondicionado. 1 y 3 = Encima de cámara. 2= Aire Acondicionado. 4,5 y 6 = corredor interior. 8 y 7 = Pasillo.

Las zonas 1 y 3 presentaron un bajo recuento (zonas limpias) con relación a las áreas del pasillo y aire acondicionado (2, 7 y 8) que presentaron un alto recuento (zonas sucias). El área del corredor interior presentó un recuento medio (Figura 12).

2. Recuento de las U.F.C. del aire de los cuartos del laboratorio.

En las placas expuestas en los cuartos del laboratorio se detectaron bacterias y hongos filamentosos. Estos últimos aparecieron en mayor cantidad en la entrada, la oficina, el baño/vestidor de mujeres, pasillo y comedor (mas de 20 U.F.C.). Fue de suma importancia éstos hongos filamentosos ya que éstos fueron los contaminantes principales del laboratorio, por lo que lo que la fuente pudo ser el aire del laboratorio.

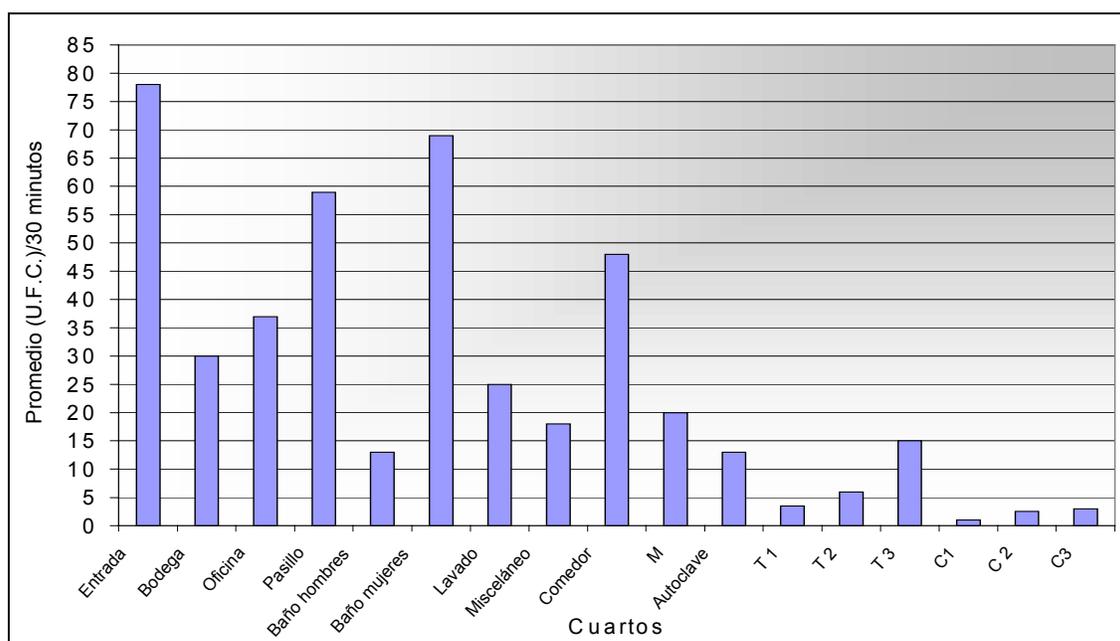


Figura 13. Promedio de microorganismos presentes en los diferentes cuartos del laboratorio (10:30 a.m.) T = Cuarto de transferencia, C = cuarto de crecimiento, M = cuarto de preparación de medios.

La zona de oficina, compuesta por la entrada, bodega y oficina, tuvo una alta frecuencia de contaminantes. En el área de laboratorio se observaron contaminantes, en especial el baño/vestidor de mujeres, pasillo, comedor (altos recuentos). En éstos se observó gran cantidad de hongos filamentosos. En éstas zonas se presentaron un alto tránsito de personal.

El cuarto de transferencia #3 presentó el mayor recuento de microorganismos con relación a los demás cuartos de transferencia (figura 13). Éstos cuartos tienen un sistema de filtrado de aire. Cabe destacar que en el momento del monitoreo el cuarto de transferencia #3 era el único cuarto de transferencia que estaba en uso (8 operarios). El cuarto de lavado, baño/vestidor de hombres, misceláneo, autoclave y preparación de medios presentaron recuentos más bajos que los anteriores. En ellos existió poco tránsito de empleados (4 operarios). Los cuartos de crecimiento tuvieron un sistema de filtrado de partículas y presentaron los menores recuentos, donde transitaron dos operarios.

3. Análisis de las U.F.C. del aire en los cuartos de alto tráfico de personal y en las cámaras

Se observó un comportamiento heterogéneo de los contaminantes en los distintos cuartos. El pasillo tuvo el mayor recuento de U.F.C. seguido por el baño/vestidor de mujeres y después por el cuarto de transferencia. El personal entró por el baño/vestidor de mujeres después por el pasillo y terminó en el cuarto de transferencia. La contaminación aumentó del baño/vestidor de mujeres a el pasillo y disminuyó hasta el cuarto de transferencia (figura 14). Los recuentos presentados no fueron tan altos con relación al análisis de los cuartos del laboratorio anterior.

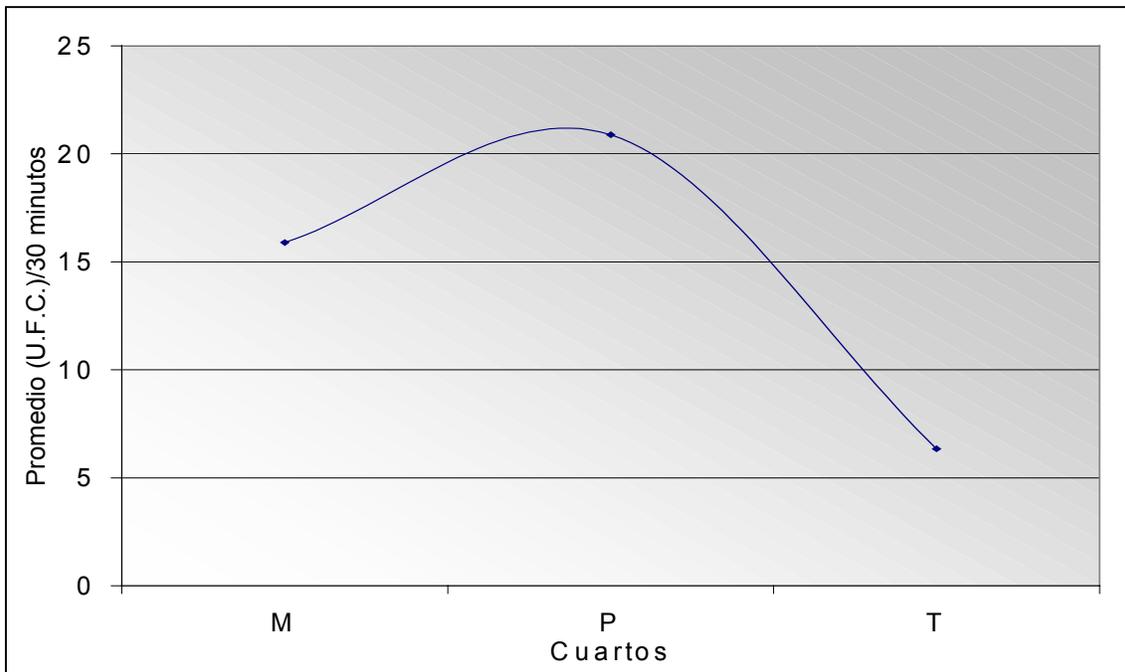


Figura 14. Recuento de U.F.C. presentes en los cuartos de mayor tránsito de personal del laboratorio (M=baño/vestidor de mujeres, P=pasillo y T=cuarto de transferencia #1) monitoreada durante cinco semanas.

El efecto de las aspersiones de fungicidas no provocó una disminución considerable de los microorganismos presentes en los cuartos. Se realizaron fumigaciones el primer lunes y miércoles. También el segundo jueves y el tercer miércoles con fungicidas basados en sales de amonio cuaternario. De éstas la única que logró disminuir el número de microorganismos fue la fumigación del segundo jueves (figura 15). Para éste día la fumigación se realizó momentos antes de realizar el monitoreo en diferencia las otras fumigaciones se realizaron momentos después del monitoreo. Por ello el número de microorganismos aumenta de forma considerable después de fumigar.

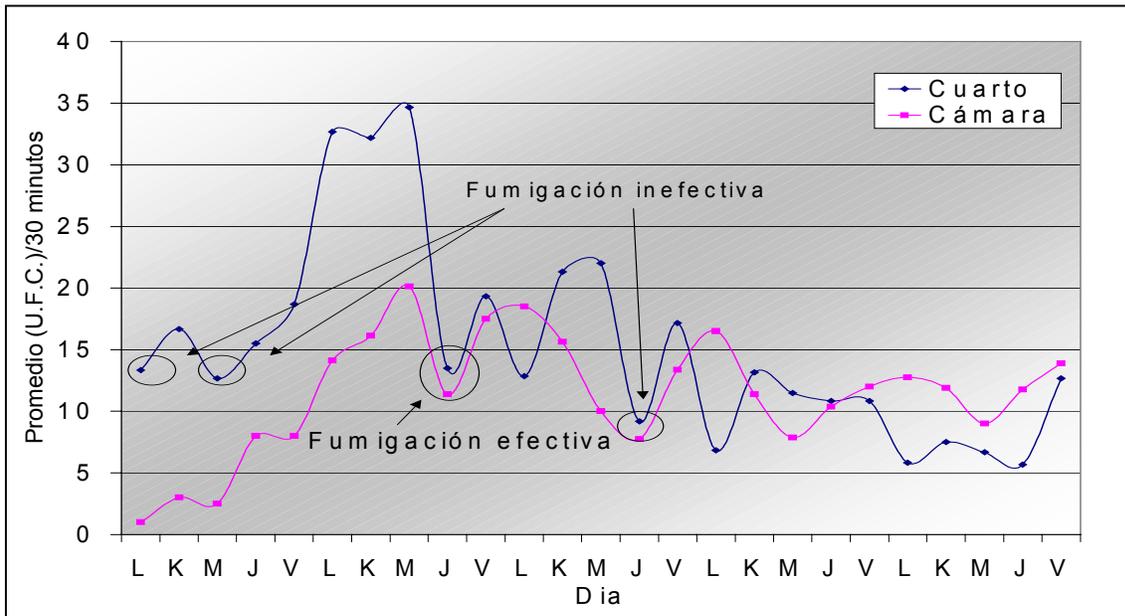


Figura 15. Promedio de U.F.C. de lunes a viernes (L=lunes, K=martes, M=miércoles, J=jueves y V=viernes) durante cinco semanas analizadas en los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio.

En los cuartos el número de microorganismos aumentó de lunes a miércoles, disminuyó de miércoles a jueves y volvió a aumentar de jueves a viernes (figura 16). Las diferencias entre los días fueron pocas siendo la mayor diferencia en 7 U.F.C. (de miércoles a jueves). En diferencia el número de microorganismos en las cámaras disminuyó de lunes a jueves y aumentó de jueves a viernes. En este caso las diferencias fueron menores, siendo la mayor diferencia de 4 U.F.C. (de lunes a jueves).

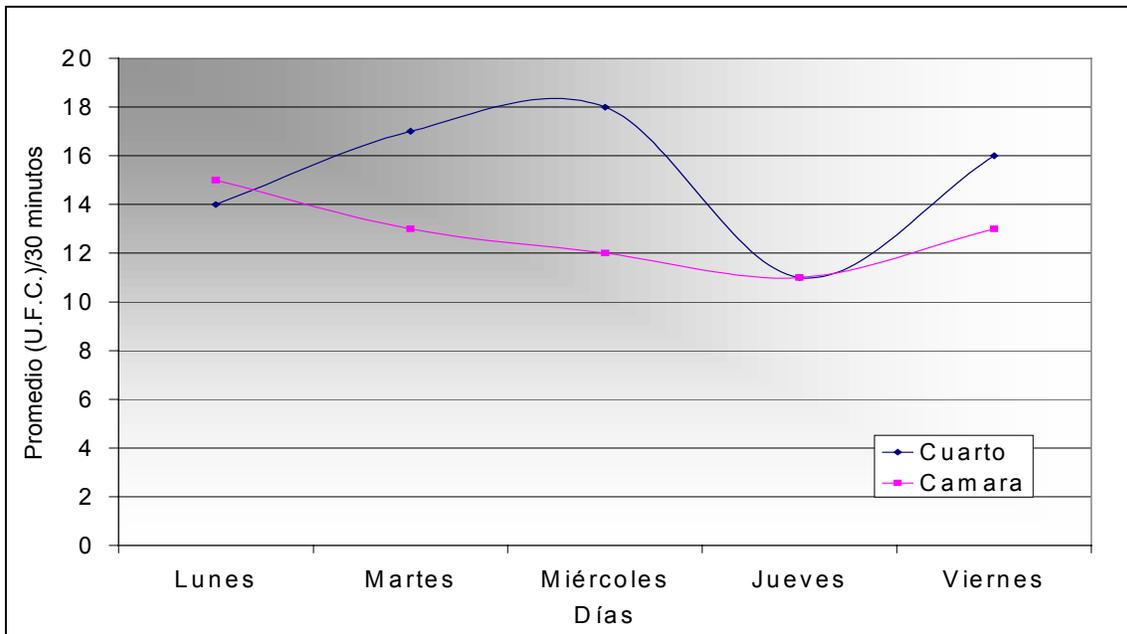


Figura 16. Promedio de U.F.C. durante los días laborales (lunes a viernes) durante cinco semanas en los cuartos (baño/vestidor de mujeres, pasillo y cuarto de transferencia) y cámaras de transferencia del laboratorio.

No existió una relación entre el comportamiento de los cuartos y las cámaras con relación a los días de la semana.

En los cuartos la primera semana presentó el menor recuento y la segunda el mayor recuento. Presentó un aumento de la primera a y la segunda semana. Después disminuyó de la segunda a la quinta. En diferencia, el comportamiento del número de microorganismos encontrados en la cámara aumentó de la cuarta a la quinta semana (figura 18). Es importante recalcar que en esas semanas se pasaron dos empleados al trabajo de cámara. A pesar de esa diferencia las semanas anteriores tuvieron el mismo comportamiento.

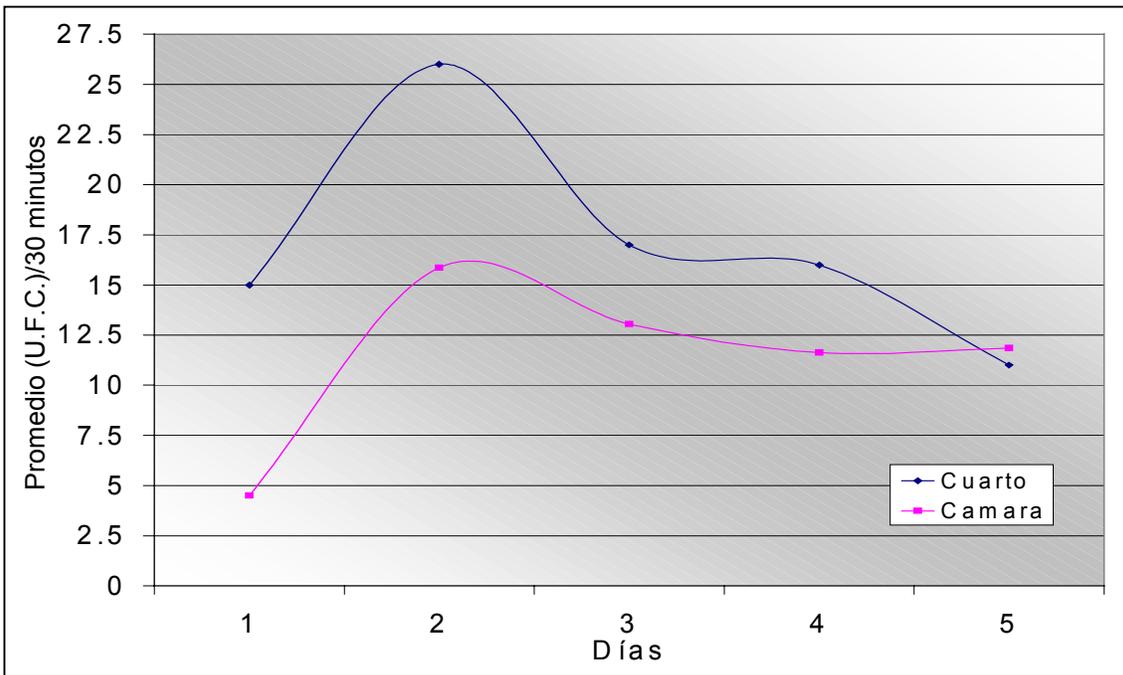


Figura 17. Promedio de U.F.C. durante cinco semanas en los cuartos (baño/vestidor de mujeres, pasillo y cuarto de transferencia) y en las cámaras de transferencia del laboratorio.

Además, los microorganismos encontrados en los cuartos fueron similares a los encontrados en las cámaras de transferencia. Por ello existió similitud entre los cuartos y las cámaras de acuerdo su recuento durante las cinco semanas.

VI. DISCUSIÓN

A. Evaluación de la esterilidad del medio de cultivo de plantas IN VITRO y de los contaminantes presentes en él.

1. Análisis microbiológico del agua utilizada para la preparación del medio de cultivo de plantas IN VITRO

Las muestras presentaron más bacterias que hongos y levaduras. Esto se debió a que las bacterias (como *Escherichia coli*) parásitos y virus son los contaminantes más comunes del agua. La tendencia en la disminución del recuento estándar en las muestras del pozo al cuarto de lavado se debió a las características del lugar donde las tomaron. En el pozo presentó un mayor recuento de microorganismos ya que esa agua estuvo en contacto con el suelo. El suelo posee materia orgánica que favoreció el crecimiento de los microorganismos. Conforme se va alejando del pozo también se va alejando los nutrientes por lo que el recuento es menor. El agua del purificador presentó el recuento mas alto. Esto se debió a que el purificador aísla los aniones y cationes los cuales son nutrientes para los microorganismos. El purificador dispensó agua libre de cationes y aniones, sin embargo estaba contaminada de microorganismos. Por ello, se utilizó el agua del cuarto de lavado para el proceso del laboratorio, ya que ésta presentó el menor recuento.

2. Evaluación de distintos tiempos de esterilización en el autoclave para el medio de cultivo de plantas IN VITRO

Obviamente los frascos sometidos a cero y cinco minutos en la autoclave tuvieron una contaminación del 100% ya que ese tiempo está por debajo de los estándares. Los contaminantes presentes en el medio pudieron provenir del agua ya que también eran bacterias. Además, ciertos medios de los frascos sometidos a 20 minutos sufrieron una hidrólisis, esto se debió a que a una mayor temperatura los enlaces del agar se rompieron. Los frascos sometidos a 10 y 15 minutos no sufrieron de éstos dos fenómenos (contaminación e hidrólisis) por lo que sería útil implementar éstos tiempos de esterilización en el proceso del laboratorio.

B. Evaluación de la contaminación en los frascos con medio de cultivo durante su almacenamiento.

Aparecieron contaminantes (hongos filamentosos) a partir de la segunda semana. Estos contaminantes se introdujeron durante el almacenamiento ya que los frascos no estaban debidamente sellados. Éstos solo estaban tapados por las tapas magenta. Por ello, las esporas de hongos se introdujeron por las orillas de las tapas ya que éstas tapas están diseñadas para permitir el intercambio gaseoso. Los frascos almacenados durante mas tiempos se contaminaron mas debido a que estuvieron mas expuestos al medio ambiente. La aparición de hongos filamentosos en los frascos con plantas podría estar relacionado con el medio de cultivo contaminado durante su almacenamiento.

C. Evaluación de la esterilización del papel utilizado como base para la multiplicación de los explantes y de sus contaminantes.

1. Detección de microorganismos presentes en el papel

Se comprobó que las bacterias aisladas en las pruebas permanecen en el papel durante cierto tiempo puesto que en todas las inoculaciones se encontraron bacterias gram (+). Esto sugiere la idea de que el papel sea un fomite el cual se contaminó de ésta bacteria.

2. Evaluación de diferentes tiempos de esterilización en el autoclave para el papel

Los papeles sometidos a diferentes tiempos de esterilización no presentaron contaminantes, por lo que el calor de la autoclave logró eliminar las bacterias a partir de los cinco minutos de esterilización. Esto se debió a que las cargas utilizadas eran livianas y el vapor penetró fácilmente hasta el interior de las muestras esterilizándolas. Por ello no existió mucha diferencia entre la temperatura de la autoclave con la del papel, por lo que al llegar la autoclave a 121° C el papel tuvo una temperatura similar. Sería eficiente utilizar un tiempo de esterilización en la autoclave de 10 minutos, incluso combinar la esterilización de papel con la del medio de cultivo.

Las consecuencias de una falta de control sobre el papel son altas. Ya que si el papel está contaminado también contaminará el explante, el cual no se podrá rescatar. Por ello, si aparecen explantes contaminados por bacterias gram (+) una de las posibilidades es que el papel acarreó la bacteria.

D. Evaluación de la desinfección sobre las ligas utilizadas para sellar los frascos y de contaminantes aislados

1. Detección de microorganismos presentes en las ligas

Los hongos detectados provinieron del talco ya que los hongos de las ligas y de los hongos eran similares. El talco sirvió como sustrato para el desarrollo de éstos microorganismos ya que estuvo compuesto de componentes orgánicos. Por ello, el acarreador secundario de los hongos fue el talco y el acarreador primario fueron las ligas. Los hongos observados en las ligas fueron iguales a los observados en ciertas plantas in-vitro por lo que existió una introducción de éstos. Ésta introducción se dio en el cierre de labores donde se introdujeron las ligas, en las cámaras de transferencia, para sellar los frascos. Al introducir las ligas a la cámara el talco se dispersó y se introdujo a los frascos con plantas. Por ello fue de suma importancia implementar una medida de control.

2. Evaluación de distintas desinfecciones en las ligas

Aparecieron bacterias en las ligas lavadas con agua y jabón y no hongos como en las ligas sin lavar. Este hecho sugiere la idea de que al lavarlas con agua y jabón se removi6 el talco, pero aun quedaron contaminantes. Estos podrían provenir de las ligas, del agua o del ambiente. Debido a la ausencia del hongo, permitió la expresión de otros contaminantes latentes como las bacterias. Con la aplicación de los desinfectantes no aparecieron contaminantes en las ligas. Por ello, la desinfección se puede realizar utilizando cualquiera de los desinfectantes y cualquiera de los tiempos analizados. Sin embargo, sería recomendable utilizar el cloro ya que su efecto es mas fuerte que los demás, además utilizar 2 minutos de inmersión con el fin de incrementar el desinfectante.

E. Evaluación del efecto de diferentes alcoholes sobre las manos de los operarios así como la evaluación de sus contaminantes

Las diferencias en los porcentajes de las placas se pudo deberse a que el etanol de 70° desnaturalizó las proteínas de una forma más efectiva con relación al alcohol isopropil. La diferencia entre la acción de éstos alcoholes se pudo deber a las diferencias entre sus estructuras moleculares. Además, el etanol de 70° se utiliza como antiséptico deshidratante en diferencia el alcohol isopropílico es un antiséptico rubefaciente que se utiliza mas con fines cosméticos como para colonias (The Merck Index, 1989). Por ello, sería más eficiente utilizar el etanol de 70° y para evitar irritaciones en las manos sería recomendable utilizar guantes quirúrgicos.

La aparición de bacterias gram (+) en los cultivos asépticos podría estar relacionada con las operarias debido a una mala técnica aséptica o de la ineficiencia del antiséptico utilizado.

F. Evaluación de la esterilidad de los instrumentos (pinzas y bisturí) utilizados en la multiplicación de los explantes y de los contaminantes presentes en ellos.

1. Detección de microorganismos presentes en los instrumentos.

La presencia de contaminantes en las pinzas se pudo deber a la exposición de los instrumentos al ambiente. Esto pudo permitir la deposición de partículas sobre ellos. La manipulación de los instrumentos ocasionaría la contaminación, en especial de las bacterias de la piel. El contacto de los instrumentos, a la hora del trabajo, con los explantes y papel pudo ocasionar su contaminación.

Sin embargo no todas las pinzas se contaminaron por lo que para la prueba de esterilidad fue necesario inocular los instrumentos con los contaminantes aislados para garantizar la presencia de contaminantes.

2. Evaluación de diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento sobre los instrumentos en el incinerador.

La menor temperatura de esterilización fue de 300° C bajo un minuto de esterilización. Éstos resultados complementan los trabajos previos (Leifert et al; 1994^a) los cuales lograron encontrar tratamientos de esterilización bajo 30 segundos de flameo en los quemadores Bunsen. Ellos encontraron un menor tiempo de exposición ya que la temperatura del Bunsen es superior a 300° C. Existió una tendencia, donde a mayor temperatura se necesita menos tiempo para esterilizar (Madigan et al; 1997). De ésta forma se podría ahorrar energía y se aumentaría la vida útil de los instrumentos así como de las resistencias de los incineradores.

G. Evaluación de los contaminantes latentes en una cepa de banano *Musa spp.* a partir de la etapa de montaje hasta la fase de multiplicación.

En las secciones de medio MS y tejido de los explante uno y dos se detectaron bacilos en todos sus subcultivos. No obstante, no se detectó éste contaminante en los explantes. Esto sugiere la idea de que el contaminante sea una bacteria latente. Esta latencia pudo deberse a que la bacteria pudo estar en el agua del tejido xilemático, como ya se ha observado las en investigaciones de Skirven y sus colaboradores (1999), soportando la desinfección inicial. También se observaron bacilos similares en las secciones del medio MS y tejido de los explantes tres y cuatro. Éstos se detectaron a partir del segundo subcultivo. No se determinó que las bacterias detectadas en los explantes 1, 2, 3 y 4 fueran iguales. Si hubieran sido iguales, la bacteria no sería endógena ya que en los explantes 3 y 4 apareció hasta el segundo subcultivo sugiriendo la idea de que se introdujo en el laboratorio. Lo que sí se pudo determinar fue que esta bacteria permaneció latente o no se desarrolla en el medio MS (con o sin planta).

La latencia de éste bacilo pudo ser que no encontró las condiciones necesarias para su desarrollo (pH, concentración de sales y azúcares). La bacteria no se identificó visualmente en el medio MS. Esto sugiere la idea de que las citocininas inhiben el desarrollo de ésta ya que al pasar ese medio al medio TSB+V (sin citocininas) se detectó visualmente un desarrollo. Posiblemente la planta secretó compuestos fenólicos antimicrobianos, como lo observados por Leifert y sus colaboradores (1994^a) que inhibieron el desarrollo de la bacteria en las pruebas con la planta y los tejidos, no así en el medio. Se han observado que los cambios de temperatura pueden provocar la expresión de bacterias latentes, en éste caso ésta bacteria permanece latente de 18 a 25°C.

El comportamiento de ésta bacteria afirmó investigaciones ya realizadas que afirman que microorganismos que no causan problemas in vivo se vuelven infecciosos in vitro. En si no son patógenas pero en cultivos asépticos se vuelven saprófitas, ya que la bacteria no se desarrolló en la planta, sino en el medio. Si apareciera la formación de una bacteria que se desarrolla a partir de la base del explante podría ser la expresión de ésta bacteria.

H. Análisis de la asepsia del aire de los cuartos y cámaras de transferencia del laboratorio

1. Prueba preliminar para la determinación de un medio de cultivo y tiempos de exposición.

El medio PDA permitió detectar hongos y mohos debido al extracto de papa el cual posee una alta concentración de carbohidratos. A su vez que el pH 5.6 ± 0.2 inhibió el crecimiento bacteriano.

El medio SDA detectó hongos filamentosos debido a que posee una peptona especial que brinda al medio los aminoácidos necesarios, a su vez posee una alta cantidad de carbohidratos (2%-4%). Inhibió el crecimiento de bacterias debido a su bajo pH=5.6±0.2

En diferencia con los medios anteriores, el medio APHA inhibió el crecimiento de hongos ya que es un medio que posee peptona libre de carbohidratos, y su pH es alto (7.2±0.2). El extracto de carne fomentó el desarrollo de bacterias. Éste medio casi no detectó hongos filamentosos por lo que tuvo un recuento menor con relación a los otros medio.

El medio TSA permitió el desarrollo de hongos ya que no posee inhibidores del crecimiento. También posee una alta concentración de carbohidratos en sus compuestos complejos (digerido pancreático de caseína y digerido paínico de grano de soya) fomentando su desarrollo. A su vez permitió el desarrollo de bacterias debido a su alto pH (7.2±0.2). Al detectar ambos contaminantes permitió obtener el recuento más alto de todos los medios, siendo el medio que reunió las características más deseables para el análisis.

Las diferencias de U.F.C. entre las zonas analizadas dentro del cuarto de transferencia podría deberse al flujo o tránsito de los empleados. Ya que en las zonas que presentaron un mayor recuento de U.F.C. (pasillo) también presentaron un alto tránsito (pasaron 13 empleados en 30 minutos). Otra posible explicación sea el flujo del aire del cuarto, donde el aire acondicionado expulsa el aire hasta el interior del corredor, donde las zonas 1 y 3 no presentarían un alto flujo de aire, presentando un bajo recuento.

2. Recuento de las U.F.C. del aire de los cuartos del laboratorio.

Se detectaron mas hongos filamentosos en las placas expuestas al aire con relación a las otras fuentes analizadas (papel, instrumentos, etc.). De acuerdo a sus características macroscópicas parecieron ser de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales son los contaminantes normales de la microflora del aire (Madigan et al, 1997). Los hongos filamentosos detectados en el laboratorio concordaron con las investigaciones realizadas por Leifert y sus colaboradores (1994a) los cuales aislaron éstos contaminantes de edificios, ambiente externo y del aire de laboratorios de cultivo de tejidos.

Se observaron mohos en las distintas entradas del laboratorio lo que sugiere la relación de ellos con los zapatos, partículas de suelo o bien del aire exterior. Se observó una disminución de microorganismos entre la entrada y la oficina por lo que el sistema de entrada disminuye la carga inicial de contaminantes. El área de oficina presentó altos recuentos, condición normal ya que no es una área limpia.

El baño/vestidor de mujeres, pasillo y comedor presentó un alto recuento de microorganismos. Esto se debió al movimiento de empleados antes del monitoreo, producto del descanso (9:30 a.m.) Los empleados, al hablar- estornudar liberaron contaminantes. A su vez, acarrearón partículas de polvo del exterior y las dispersaron en dichos cuartos.

El cuarto de lavado, baño/vestidor de hombres, misceláneo, autoclave y preparación de medios el tránsito de empleados era menor (4) por lo que presentó una menor contaminación con relación a los cuartos anteriores. De igual forma, los cuartos de transferencia y de crecimiento, tuvieron recuentos menores a los cuartos anteriores debido a que en ellos el tránsito de empleados era menor (2). Sin embargo existió una excepción, el cuarto de transferencia #3 que presentó un mayor recuento debido a un mayor tránsito de empleados (8).

Los recuentos para cada cuarto no indicaron la contaminación total ya que existieron muchas partículas ligeras que no pudieron sedimentarse en la placa. No obstante, éste sistema permitió detectar donde existió un mayor movimiento de aire o bien donde existió un mayor número de partículas pesadas flotando en el aire. Ambos fenómenos fueron fomentados por el tránsito de empleados. La forma para detectar la contaminación total es utilizando el muestreador por ranura (Chan et al; 1982).

3. Análisis de las U.F.C. en los cuartos de alto tráfico de personal y en las cámaras

El pasillo principal es mas transitado por empleados con relación al baño/vestidor de mujeres y al cuarto de transferencia, por ello es de esperar que sea el cuarto con el mayor recuento. A su vez el cuarto de transferencia tuvo un sistema de filtración del aire mientras que el baño/vestidor de mujeres y el pasillo no tuvieron dicho sistema. Por ello, fue de esperar que el cuarto de transferencia tuviera el menor recuento. Sin embargo, es importante el hecho de que ciertos microorganismos, como hongos filamentosos, se observaron en los cuartos y en las cámaras. Esto sugiere la idea de que los microorganismos pueden ser arrastrados de los cuartos a las cámaras y por ende a los cultivos asépticos. Ahora bien, éstos microorganismos pudieron ser introducidos en el baño/vestidor de mujeres o bien ser contaminantes comunes del laboratorio.

El comportamiento del número de microorganismos de los cuartos por día fue muy variable, lo que sugiere que los desinfectantes aplicados en el piso de los cuartos no tuvieron un efecto capaz de controlar el crecimiento microbiano. La aspersión de fungicidas en el aire de los cuartos no controló el número de U.F.C. Esto sugiere la idea de que la población de microorganismos aumenta considerablemente después de la aplicación. Puede ser que los fungicidas aplicados no tuvieron un efecto fungiestático, ni menos fungicida sobre la microflora del aire de los cuartos.

Se observó una disminución en el número de U.F.C. de las cámaras de lunes a jueves. Esto pudo deberse a que los días lunes se realizan cambios de filtro en las cámaras. Esto puede producir una inestabilidad ya que el filtro es nuevo y puede contener partículas que ocasionan contaminación. Además, el día que se presenta mas contaminación en los cultivos es el lunes al igual que en el recuento de las cámaras.

Se observó un aumento en el número de microorganismos en los cuartos y en las cámaras de la primera a la segunda semana de monitoreo. Esto se debió a que a partir de la segunda semana se incorporan cinco empleados mas al personal del laboratorio. Al haber mas empleados se liberaron en los cuartos mas microorganismos ya que se ha observado que cuando hay mas personas en un cuarto aumenta el recuento de microorganismos (Pelczar et al. 1980). Ésta incorporación de empleados provocó inestabilidad en el número de microorganismos, evidencia de ello son las diferencias entre los recuentos de las primeras semanas. En las semanas siguientes el número de microorganismos pareció estabilizarse, sin embargo el recuento no llegó a ser igual que al inicio. Esto se debió a que habían mas empleados en el laboratorio al final que al inicio.

VII. CONCLUSIONES

Las fuentes de contaminación acarrearon microorganismos específicos (hongos y bacterias) donde, las bacterias fueron contaminantes comunes del medio de cultivo de plantas (no esterilizado), papel, operarios, instrumentos, aire y explantes.

Por otro lado, los hongos filamentosos fueron contaminantes comunes de las ligas, medio de cultivo de plantas (esterilizado) y el aire.

La especificidad de éstos contaminantes se debe al tipo de material con que está constituido la fuente, es decir si esta formado de moléculas orgánicas o inorgánicas. También depende de fuentes secundarias como el agua, polvo o bien de su procedencia.

El laboratorio de cultivo de tejidos es un sistema abierto, donde las fuentes de contaminación estaban relacionadas unas con otras en las distintas etapas del proceso de multiplicación:

En la etapa de preparación de medios las fuentes relacionadas fueron el agua y el aire.

En los subcultivos, etapa más sensible, las fuentes que intervienen fueron los operarios, las ligas, los instrumentos, el papel y el aire del laboratorio.

En la etapa de almacenamiento del medio de cultivo la fuente relacionada fue el aire del laboratorio así como los operarios.

En el cultivo de plantas en el cuarto de crecimiento las fuentes relacionadas fueron el explante y el aire.

Todas las fuentes analizadas constituyen un riesgo para el laboratorio, un mal manejo conlleva pérdidas económicas al laboratorio. Los elementos de trabajo que se introducen dentro de la cámara son importantes fuentes de contaminantes ya que es ahí donde ingresan más contaminantes a los cultivos.

Existieron medidas de control que lograron desinfectar cada fuente de contaminación. Éstos fueron físicos o químicos y su utilización dependió de las propiedades del material de la fuente. Los controles efectivos fueron:

- La esterilización en la autoclave para el medio de cultivo y para el papel.
- El incinerado para los instrumentos (pinzas y bisturí).
- La aspersión de desinfectantes basados en cloro, sales de amonio cuaternario y glutaraldehído para el aire de los cuartos.
- Aspersión de etanol de 70° C para las manos de los operarios.
- La inmersión en desinfectantes basados en cloro, sales de amonio cuaternario y glutaraldehído para las ligas.

Los parámetros de los controles que lograron desinfectar o esterilizar las fuentes de contaminación fueron:

- Esterilización en la autoclave del medio de cultivo de 10 minutos en adelante.
- Incinerado de instrumentos de cuatro minutos a 200° C y un minuto en 300°C
- La aspersion de desinfectantes basados en cloro, sales de amonio cuaternario y glutaraldehído cada semana en los cuartos del laboratorio.
- La inmersión de ligas en desinfectantes, basados en cloro, sales de amonio cuaternario y glutaraldehído, a partir de 30 segundos.
- La esterilización del papel a partir de 5 minutos en la autoclave y la esterilización del papel mas medio a partir de 20 minutos en la autoclave.

La contaminación de un laboratorio de cultivo de tejidos se debe de prevenir detectando las fuentes de contaminación en las distintas etapas del proceso. Así pues es necesario tener un control preventivo y no correctivo. Los medios de cultivo utilizados permitirán identificar los contaminantes, a la vez se podrá aplicar un control para evitar su diseminación.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda analizar los hongos del agua utilizando un filtro de membrana utilizando muestras de 100 ml ya que podrían existir mas hongos de lo reportado.

En la detección de contaminantes en los instrumentos se recomienda utilizar agua peptona 0.1% estéril para remover los contaminantes y después cuantificarlos mediante la técnica de diluciones al vaciado.

En la desinfección de las ligas se recomienda neutralizar el efecto del desinfectante agregando las ligas a un medio Leethen, de ésta forma se disminuye el error experimental.

1. Pruebas preventivas

Se recomienda realizar evaluaciones de la esterilidad del medio MS cada trimestre, esterilizando 30 frascos con medio MS+TSB con 500 frascos con medio MS en la autoclave bajo 20 minutos.

Para evaluar el buen funcionamiento de la autoclave se recomienda realizar pruebas de esterilidad con endosporas de *Bacillus stercorarius*.

Se recomienda aplicar pruebas de detección de contaminantes para los instrumentos utilizados en la cámara a manera de monitoreo cuando se considere necesario.

Se recomienda aplicar pruebas de detección de bacterias endógenas para los explantes en la fase de montaje y separar los explantes que dieron la prueba positiva.

Se recomienda realizar pruebas de detección de contaminantes en el papel nuevo (esterilizado y no esterilizado) o bien cuando cambien el proveedor.

Se recomienda realizar pruebas de detección de contaminantes en las ligas nuevas (desinfectadas y no desinfectadas) o bien cuando cambien el proveedor.

Se recomienda realizar pruebas de detección de contaminantes en el plástico utilizado para sellar los frascos cada trimestre.

Se recomienda exponer placas petri (duplicados) con medio TSA+V o PDA (pH 7) en las cámaras de transferencia durante los últimos treinta minutos antes del cierre de la jornada. También se recomienda exponer placas con los mismos medios en el baño de mujeres y en el cuarto de transferencia durante los primeros treinta minutos de la jornada.

Se recomienda monitorear el aire de los cuartos del laboratorio mediante un muestreador de ranura con el fin de obtener el número de U.F.C. total del cuarto.

2. Recomendaciones para el proceso productivo

Para el medio de cultivo MS se recomienda usarlo antes de quince días después de esterilizado con el fin de evitar contaminación en los estantes.

Se recomienda incinerar los instrumentos (pinzas y bisturíes) a 300° C durante un minuto con el fin de aumentar su vida útil.

Sería útil instalar un sistema de cortina de aire en las entradas, a su vez instalar un sistema de filtración en baño de mujeres especialmente.

Se recomienda la instalación de sistemas de filtración del aire cerrados y no abiertos a fin de evitar la entrada de partículas del exterior.

No se recomienda la aplicación de un mismo tipo fungicidas en los cuartos con el fin de no crear una presión de selección. Se recomienda fumigar con varios productos (rotación de fungicidas).

Para los operarios se recomienda utilizar etanol de 70° para la limpieza de manos, además lavarse las manos con cepillo, agua y jabón. Sería recomendable utilizar guantes, mascarillas, gorros, zapatos y gabachas limpias cada día.

Para la cepa de banano es recomendable su cultivo a una temperatura entre 20 y 23° C con intervalos de subcultivos de un mes par evitar la expresión de la bacteria.

Se recomienda lavar las ligas con agua y jabón, y después sumergirlas en desinfectantes basados en cloro, glutaraldehído o sales cuaternarias por mas de un minuto.

Se recomienda esterilizar el papel junto al los frascos con el medio de cultivo (carga normal) en la autoclave durante 20 minutos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. 1975. Handbook of microbiology.

Merck & Co., Inc. Darmstadt, Alemania.

Anónimo. 1989. The Merck Index.

11^{va} edición. Merck & Co., Inc. New York, USA.

Anónimo. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater.

15^{va} edición. American public health association, Inc. Washington, D.C.

Barrett, C. Cassells, A. C. 1994. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii* (Brown) form *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 169-175.

Hedrick, Th. 1975. Engineering and science of aeromicrobiological contamination control in dairy plants. *Chemistry and Industry*. 4: 868-872.

Herman, E. B. 1990. Bacterial Contamination in micropropagation.

Agricell Reporter. 14: 41-43.

Hurtado, D. Merino, M. 1987. Cultivo de tejidos.

1^{era} edición. Editorial Trillas S.A. México D.F. México. 233p.

Kubota, Ch. Tadokoro, N. 1999. Workshop on bioreactor technology: control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cell. Dev Biol.-Plant*. 35: 296-298.

Leggatt, I. Waites, W. Leifert, C. Nicholas, R. 1988. Characterization of microorganisms isolated from plants during micropropagation. *Acta Horticulturae*. 225: 93-103.

Leifert, C. Waites, M. Camotta, H. Nicholas, R. 1989. *Lactobacillus plantarum*; a deleterious contaminant of plant tissue culture. *Journal of applied bacteriology*. 67: 363-370.

Leifert, C. Waites, W. 1990. Contaminants of plants tissue culture. *International Association for plant tissue culture*. 60: 2-12.

Leifert, C. Ritchie, J. Y. 1991. Contaminants of plants-tissue and cell culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7: 452-469.

Leifert, C. Waites, W. 1992. Bacterial Grow in plant tissue culture media. *Journal of Applied Bacteriology*. 72: 460-466.

Leifert, C. Morris, C. Waites, W. 1994a. Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown plants: Reasons for contamination problems in vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 13(2): 139-183.

Leifert, C. Waites, B. Keetley, J. Wright, S. Nicholas, R. Waites, W. 1994b. Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. *Plant cell, tissue and organ culture*. 36: 149-155.

Mac Faddin, J, F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2^{da} Ed. Williams y Wilkins. Baltimore, Inglaterra. 483 p.

Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. 1997. Brock Biología de los Microorganismos. Trad: Fernández, M. Prentice Hall Iberia, Madrid, España. 1064 p.

McGarrity, G. Coriell, L. 1971. Procedures to reduce contamination of cell cultures. In Vitro. 4(4): 257-265.

"P100 MicroPortable Air Sampler" AIR-CARE SYSTEMS & PRODUCTS. 2000
<<http://www.totalaircare.co.nz/p100.htm>> (10/10/2000)

Pelczar, M. Reid, R. Chan, E. 1982. Microbiología. Trad. Capella, A. Tay, J. 2^{da} Edición. México D.F. México. 826 p.

Pierik, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Trad. Ayerbe, L. 3^{era} Edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España 325 p.

Shields, R. Robinson, S. Ansolw, P. 1984. Use of fungicides in plant tissue culture. Plant cell reporter. 3: 33-36.

Skirvin, R. Motoike, S. Norton, M. Ozgur, M. Al-Juboory, K. McMeans, O. 1999. Workshop on micropropagation, establishment of contaminant-free perennial plants in vitro. In Vitro Cell. Dev Biol.-Plant. 35: 296-298.

Toledo, J. Espinoza, N. Golmirzaie, A. 1998. Cultivo de tejidos: manejo de plántulas in vitro en la producción de semilla de papa. Centro internacional de la papa (CIP). Manual de capacitación. Lima, Perú. 46 p.

ANEXO I

Composición de los Medios de Cultivo utilizados en las pruebas

Agar Papa Dextrosa (PDA)		Agar Sabouraud Dextrosa (SDA)	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Triptona	5.0 g	Neopetona	10 g
Extracto de Levadura	2.5 g	Glucosa	40 g
Glucosa	1.0 g	Agar	15 g
Agar	15.0 g	Agua destilada	1 l
Agua destilada	1 l	pH	5.6
pH	5.6		

Caldo Trypticase y Soya (TSB)		Agar Trypticase y Soya (TSA)	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Digestivo pancreático		Digestivo pancreático	
de caseína	17 g	de caseína	15 g
Digerido papínico		Digerido papínico	
de grano de soya	3 g	de grano de soya	5 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g	K ₂ HPO ₄	2.5 g
Glucosa	2.5 g	Glucosa	2.5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
pH 7.3		Agar	10 g
pH	7.3		

Agar Recuento Estándar (APHA)

Componente	Cantidad
Papas	250 g
Agar	20 g
Dextrosa	10 g
Extracto de levadura	2 g
Agua destilada	1 l
pH	7.3

Medio Murashige and Skoog (1962) Composición de las vitaminas (MS) utilizado.

Componente	Cantidad /l	Vitamina	Cantidad (mg/l)
Macroelementos	100 ml	Myo-Inositol	100
Microelementos	5 ml	Glicina	2
Vitaminas	5 ml	Ácido Nicotínico	0.5
Fe-EDTA	5 ml	Piridoxina	0.5
Sacarosa	30 g	Tiamina	0.1
BAP	3 mg/l		
Phytigel	2.2 g		

ANEXO II

Microorganismos detectados en las distintas fuentes de contaminación



**Bacterias gram (-) detectadas en el medio de cultivo MS
no esterilizado en la autoclave.**



Bacterias gram (+) detectados en el papel



Hongos filamentosos detectados en las ligas



Bacterias gram (+) detectados en las manos de los operadores



Bacterias gram (-) detectados en los instrumentos (pinzas y bisturí)



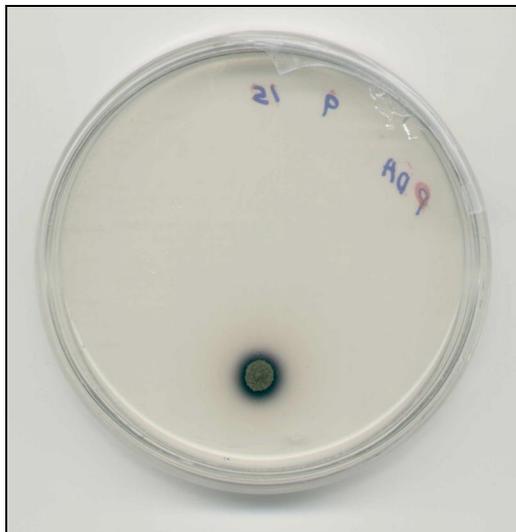
Bacteria endógena detectadas en los explantes de banano (*Musa* spp).

ANEXO III

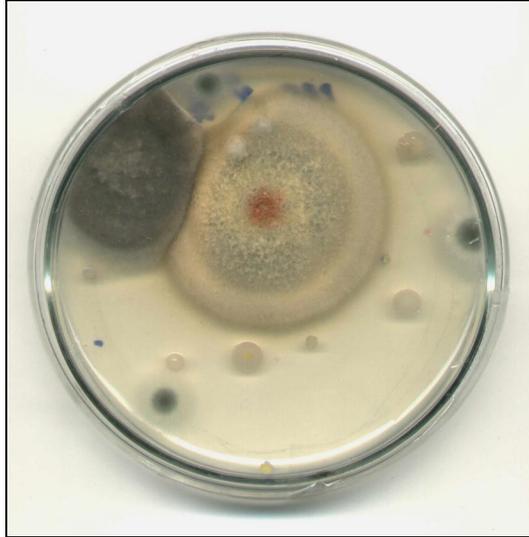
Microorganismos detectados en el cuarto de transferencia utilizando el medio PDA



Pasillo (15' de exposición)



Encima cámara (15' de exposición)



Pasillo (30' de exposición)

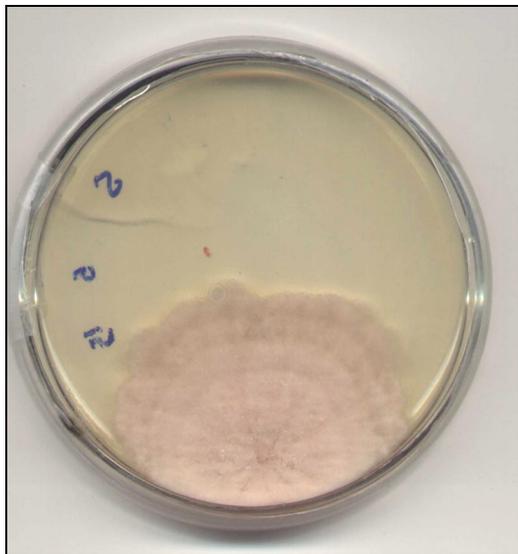


Pasillo (30' de exposición)

Microorganismos detectados en el cuarto de transferencia utilizando el medio SDA



Encima cámara (15' de exposición)



Interior del Cuarto (15' de exposición)

Microorganismos detectados en el cuarto de transferencia utilizando el medio TSA



Pasillo (30' de exposición)



Pasillo (15' de exposición)

ANEXO IV

Microorganismos detectados en los distintos cuartos del laboratorio



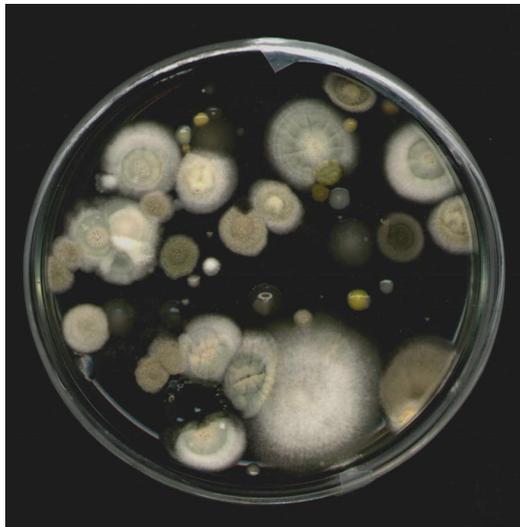
Entrada



Oficina



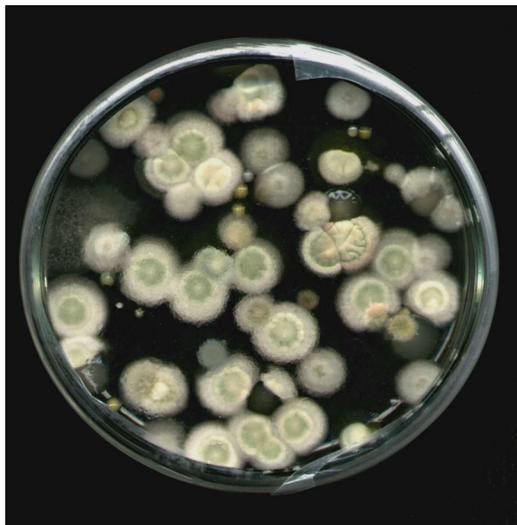
Bodega



Pasillo



Baño/vestidor de hombres



Baño/vestidor de mujeres



Cuarto de lavado



Comedor



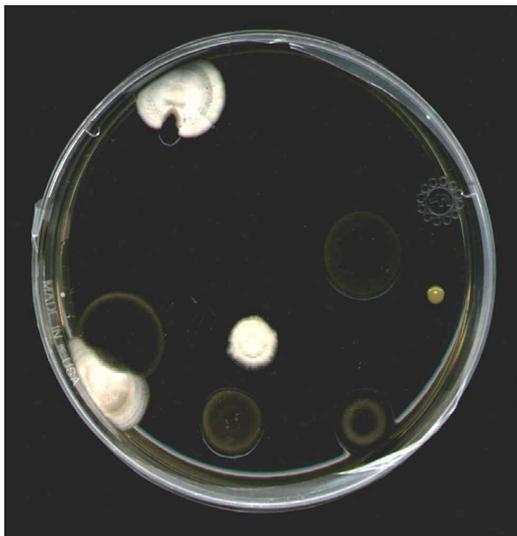
Cuarto de medios



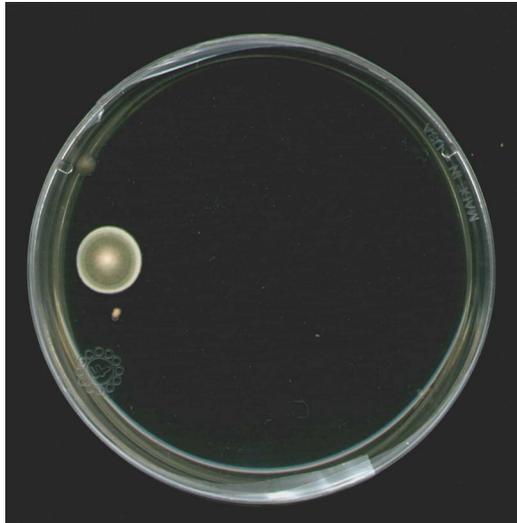
Autoclave



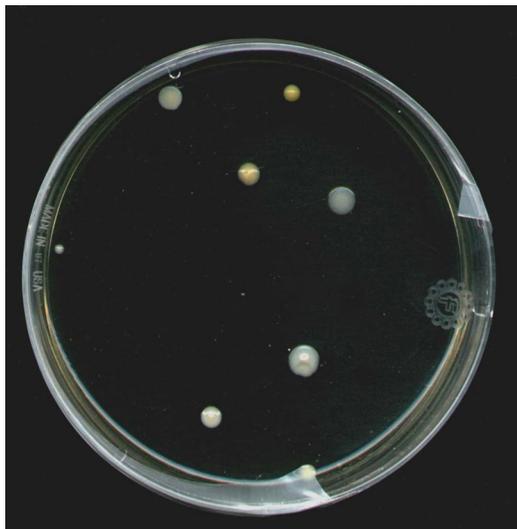
Cuarto de transferencia #3 (horas de trabajo, 11:00 a.m.)



**Cuarto de transferencia #3
(hora de descanso, 12:20 p.m.)**



Cuarto de transferencia #1



Cuarto de crecimiento #1



Cuarto de crecimiento #3



Cuarto de transferencia #2