



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOVIS INPONETUR VIRILISTOGA. 1948



*Tesis presentada en opción al Título Académico de
Licenciada en Ciencias Farmacéuticas*

*Muestreos Microbiológicos Ambientales
como parte del Aseguramiento de la Calidad
en un laboratorio de Biotecnología Vegetal.*



*Autora: Arianna Valido Díaz
Tutores: MSc. Daymí Carrazanas García
Ing. Arletys Santos Pino*

2006

"Año de la Revolución Energética en Cuba"

Pensamiento

“ Si yo pudiese hacer todo nuevamente, y renovar mi visión frente al siglo veintiuno, sería un ecologista microbiano. Diez billones de bacterias viven en un gramo de tierra ordinaria, no más que lo que se puede ajustar apretando índice con pulgar. Ellas representan miles de especies, la mayoría de las cuales son desconocidas para la ciencia. Me gustaría andar dentro de ese mundo con la ayuda de la microscopía moderna y el análisis molecular. Atravesaría forestas clonares zigzagueando entre granos de arena, viajando en un submarino imaginario atravesando gotas de agua del tamaño de lagos, descubriendo nuevas formas de vida entre víctimas y predadores con sus desconocidas telarañas de alimentación. Todo ésto, con solo aventurarme a salir no más de diez pasos fuera de mi laboratorio.”

Edward O. Wilson. Naturalis (1994). Island press, Washington.

Dedicatoria

Si ustedes a mi sueño han dedicado lo mejor de sus vidas, entonces, todo lo bueno me hará recordarlos.

A mis padres por la comprensión, la confianza y el apoyo en estos años.

Agradecimientos

♠ *Este como todo trabajo que se inicia con seriedad, cariño y profundo respeto ha requerido una gran cantidad de horas de ingentes esfuerzos, parte de ellas robadas al descanso, el éxito del mismo se debe a:*

♠ *A mis tutoras MSc. Daymí Carrazanas y la Ing. Arletys Santos porque con dedicación esmerada y talento han impulsado la idea hasta convertirla en obra.*

♠ *A todos los compañeros del grupo de Biotecnología del INIVIT de los cuales nunca obtuve un no y muy especialmente a la Ing. Milagros Basail y a la tec. Alexis Ortega las cuales fueron mi apoyo principal durante el tiempo que trabajé en esta institución.*

♠ *A todo mi colectivo de curso quienes nos apoyamos mutuamente para salir adelante , principalmente a Gerga, Lilian ,Damarys y Keila*

♠ *A todos los compañeros del Dpto. de Finanzas de la "Empresa Textil Desembarco del Granma", Rolando, Clarita, Hermes, Anita, Estela, Carmen y Víctor por la ayuda en los momentos precisos.*

♠ *A Ernesto por su cooperación en la impresión de dichos resultados.*

A Todos

Muchas Gracias.

Resumen

En el presente Trabajo de Diploma se demostró la ejecutabilidad de la metodología modificada para la realización de los muestreos microbiológicos ambientales. Se establecieron 14 estaciones de muestreo, todas en áreas asépticas, realizándose 25 muestreos microbiológicos ambientales. En cada estación de muestreo se colocaron 4 placas de Petri de las cuales dos contenían un medio de cultivo propicio para hongos (agar Saburaud) y las dos restantes un medio de cultivo propicio para bacterias (agar nutriente, Oxoid). El tiempo de exposición fue de 15 minutos y las placas fueron incubadas a 32°C realizándose un conteo de Unidades Formadoras de Colonias bacterianas y fúngicas a las 48 y 120 horas respectivamente. Se construyeron gráficos de control de Shewart del tipo $\bar{X}_{(media)}$ que permitieron establecer el límite de control para las Unidades Formadoras de Colonias bacterianas y fúngicas en las estaciones de muestreos preestablecidas. Los datos fueron procesados mediante el paquete Statistica versión 6.0. Por último se analizó el comportamiento de la contaminación microbiana en la cabina de flujo laminar y su influencia en los resultados de las operarias y el puesto de trabajo demostrándose en los resultados de los muestreos microbiológicos ambientales que la ubicación de la cabina de flujo laminar y la operaria influye en la contaminación microbiana dependiendo en este último caso, tanto del material vegetal que estas inicien como cuando no se realiza el proceso de iniciación. Los resultados se procesaron mediante el paquete Statistica versión 6.0 aplicándose los test no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-Witney ya que se trabajó con diferentes tamaños de muestra.

Índice	Pág
<i>Introducción</i>	1
<i>Revisión Bibliográfica</i>	3
1.1. Aspectos generales de la contaminación microbiana.....	3
1.2. Microorganismos contaminantes.....	4
1.2.1. Levaduras y hongos filamentosos.....	5
1.2.2. Bacterias.....	6
1.2.3. Organismos fastidiosos.....	8
1.3. Principales fuentes de contaminación.....	8
1.3.1. El explante inicial.....	9
1.3.2. El ambiente.....	10
1.3.3. El hombre.....	12
1.3.4. Los equipos y el instrumental.....	12
1.3.5. Los insectos.....	14
1.4. Control de la Calidad. Generalidades.....	14
1.5. Gráficos de control.....	15
1.5.1. Construcción de un gráfico de control.....	17
1.5.2. Gráfico de control para variables continuas.....	18
1.5.3. Gráfico de control para valores individuales (X) y recorridos móviles (R).....	18
1.5.4. Gráfico de evolución de medias.....	19
1.6. Procedimiento de control e interpretación para gráficos de control por variables.....	20
<i>Materiales y Métodos</i>	23
2.1. Realización de muestreos microbiológicos ambientales aplicando la metodología modificada.....	23
2.2. Construcción de los gráficos de control.....	24
2.3. Análisis de los resultados de los muestreos microbiológicos ambientales en las cabinas de flujo laminar.....	25
<i>Resultados y Discusión</i>	26

3.1. Realización de muestreos microbiológicos ambientales aplicando la metodología modificada.....	26
3.2. Construcción de las gráficos de Control.....	26
3.2.1 Análisis de la contaminación microbiana en los estantes.....	26
3.2.2 Análisis de la contaminación microbiana en los pisos.....	42
3.3. Análisis de los resultados de los muestreos microbiológicos en las cabinas de flujo laminar.....	47
3.3.1 Influencia de las cabinas de flujo laminar en la contaminación microbiana.....	48
3.3.2 Influencia del puesto de trabajo en cada laminar.....	51
3.3.3 Influencia de la Operaria.....	53
<i>Conclusiones.....</i>	57
<i>Recomendaciones.....</i>	58
<i>Bibliografía.....</i>	59
<i>Anexos.....</i>	67

Introducción

La micropropagación es una técnica desarrollada para la producción masiva de las plantas que ha sido utilizada con éxito desde los años sesenta. La principal ventaja de esta técnica estriba en la rápida multiplicación del material clonal libre de enfermedades. Esta característica ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante selección, mutación, programas de mejoras o manipulación genética.

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por Biotecnología depende en gran medida del control y prevención de las contaminaciones microbianas, siendo este uno de los problemas más frecuentes en el cultivo de tejidos. Factores tan disímiles como el diseño arquitectónico de los locales de trabajo, la higiene ambiental o habilidad y preparación técnica de los operarios entre otros pueden favorecer o controlar la incidencia de contaminación microbiana en este tipo de técnica. (10)

Entre los aspectos considerados en el Sistema de Control de la Calidad (SCC) a aplicar en las Biofábricas cubanas, cuya última versión fue editada y distribuida por el Grupo Nacional de Biotecnología de la Empresa de Semillas perteneciente al Ministerio de la Agricultura (MINAG) se encuentran aquellos que pretenden prevenir y controlar la contaminación microbiana en el proceso de micropropagación vegetal.

Una de las tareas del Proyecto de Investigación – Desarrollo e Innovación Tecnológica Ramal titulado “Identificación, Prevención y Control de la Contaminación Microbiana en la Micropropagación de Plátanos, Bananos y Malanga en Cuba”, aprobado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (Enero de 2004 – Diciembre de 2007), es el análisis de la eficiencia del Sistema de Control de la Calidad referido en aquellos puntos enfocados en la prevención y control de la contaminación y, de ser necesario la propuesta de modificaciones con vista a su perfeccionamiento.

En un estudio precedente se visitaron las Biofábricas pertenecientes al MINAG, donde se definieron grupos enfocados, ejecutaron entrevistas semiestructuradas y se revisaron reportes de muestreos microbiológicos ambientales comparándose con la metodología propuesta en el Sistema de Control de la Calidad. Como resultado de ello se produjeron modificaciones en la metodología de realización de muestreos microbiológicos ambientales

En la presente Investigación se definieron Estaciones de Muestreo en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) con vista a poner en práctica la metodología propuesta e interpretar sus resultados por lo que se persiguen los siguientes objetivos:

1. Demostrar la ejecutabilidad de la metodología modificada para la realización de los muestreos microbiológicos ambientales.
2. Construir gráficos de control que permitan establecer el límite de control de Unidades Formadoras de Colonias bacterianas y fúngicas para las estaciones de muestreo preestablecidas.
3. Analizar el comportamiento de la contaminación microbiana en la cabina de flujo laminar y su influencia en los resultados de las operarias y el puesto de trabajo.

Revisión Bibliográfica

1.1 Aspectos generales de la contaminación microbiana.

Los procesos biotecnológicos llevan implícitos altos riesgos de pérdidas por la contaminación microbiana ambiental, lo que representa una elevación de los costos de producción. Hoy día este es uno de los principales y más severos problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo y es un fenómeno multicausal que debe tenerse en cuenta desde la concepción misma de un laboratorio (2,32).

En Cuba la expansión acelerada de una red de Biofábricas para la multiplicación masiva de varias especies de plantas, ha traído como consecuencia que las medidas técnico – organizativas para prevenir y disminuir las pérdidas por contaminación se hayan incrementado, no obstante, nacionalmente aún se registran altas pérdidas por este proceso (15).

Las pérdidas en las Biofábricas debido a la contaminación microbiana y la mortalidad de los explantes continúan siendo factores que han provocado no pocos fracasos. Dado a que en estas instalaciones se desarrollan procesos biológicos, es prácticamente imposible dejar de admitir pérdidas por contaminación y mortalidad en el proceso productivo (11,16,34).

Los valores de contaminación y mortalidad aceptables para producción masiva de vitroplantas en especial en laboratorios con capacidad de 2-5 millones de vitroplantas oscilan entre 4% y 7% en cada subcultivo (7,42). Sin embargo los valores de contaminación reales que alcanzan muchos laboratorios de América Latina superan el 10% de la producción. Muchas de estas pérdidas que ocurren constantemente son causadas por hongos (10-35%), levaduras (10-35%), y por bacterias (20-55%), según datos obtenidos en cinco laboratorios de Inglaterra, Holanda y Alemania (Leifert y colaboradores (43). La mayoría de los microorganismos aislados no son conocidos por provocar daños a las plantas en campo sin embargo se convierten en fuertes patógenos *in vitro*.

Por lo antes referido es necesario reducir al máximo este problema para evitar las pérdidas en la economía al tener que desechar grandes cantidades de material por contaminación

1.2 Microorganismos contaminantes

La presencia de microorganismos en el ambiente puede convertirse en un serio problema cuando se multipliquen en forma masiva especies de plantas que requieren medios de cultivo cuyos componentes permiten el desarrollo y multiplicación de los mismos, sin embargo en las compañías comerciales la severidad e implicaciones del problema no se reconocen o admiten y muchos laboratorios científicos dejan de registrar los índices de contaminación. Los laboratorios para la micropropagación comercial de plantas a menudo solo reconocen las fuentes de introducción de microorganismos después que han ocurrido grandes pérdidas.

Los microorganismos que se introducen en el laboratorio son habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente, saprofitos o patógenos de las plantas (40) así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano que se han relacionado con procedimientos inadecuados, condiciones higiénico sanitarias deficientes o incumplimiento de la disciplina tecnológica (56). En las zonas tropicales, las pérdidas pueden alcanzar proporciones incalculables porque las condiciones climáticas favorecen el desarrollo de estos contaminantes (16,14,34).

El efecto negativo de los contaminantes microbianos sobre las vitroplantas puede ser considerable si tenemos en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio de cultivo. Tanto las bacterias como las levaduras tienen un crecimiento superior con respecto a los tejidos vegetales y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la secreción de metabolitos. De esta forma pueden reducir el coeficiente de multiplicación, inhibir el enraizamiento y provocar la muerte del cultivo en poco tiempo (16,44,34).

1.2.1 Levaduras y hongos filamentosos.

Las levaduras por la similitud de sus caracteres culturales, se confunden con las bacterias y esa es la causa por lo que en la mayoría de los laboratorios la contaminación bacteriana se estima mucho más alto de lo que en realidad es (42).

La mayoría de los hongos y levaduras aisladas del cultivo de tejidos de plantas pertenecen a los géneros que están ampliamente distribuidos y pueden encontrarse en edificaciones, ambientes externos, en el aire de los laboratorios y como saprofitos o patógenos en la superficie aérea de las plantas en el campo (54,12).

Las especies y géneros de hongos y levaduras encontrados en el aire del laboratorio, los medios vertidos sin plantas y los cultivos viejos, indican que la fuente de mayor contaminación fúngica es el aire del laboratorio, pero además los hongos y levaduras pueden ser introducidos por manipulación después del autoclaveo. Estos microorganismos provocan la más alta contaminación durante meses de altos contenidos de esporas en el aire externo en el laboratorio (25, 24).

Los géneros fúngicos encontrados con mayor frecuencia han sido *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Microsporum*, *Phialophora*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Chryptococcus* entre otros (34,25,28,6).

Algunos hongos patógenos como *Botrytis sp.*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* han sido capaces de crecer inicialmente en el medio sin plantas, y logran su establecimiento posterior en el tejido de estas, después que el metabolismo y crecimiento de las mismas disminuyó (25). Los contaminantes fungosos no deben encontrarse latentes en los medios de cultivo *in vitro* así como tampoco ciertos patógenos obligados (2).

En muestreos realizados en tres países Europeos se han encontrado con frecuencia lavaduras como *Candida guilliermondii* o *Candida parapsilosis* y otras *Candida spp.*, así como *Rhodotorula spp.* (24)

1.2.2 Bacterias.

La contaminación bacteriana es considerada la más común y una de las principales causas de pérdidas en los cultivos de tejidos vegetales (34,43). La misma es la que ocasiona los daños mas serios, después de los virus, porque las bacterias pueden ser sistémicas y su detección es más difícil (6) pues la mayoría normalmente crece muy poco en los medios de cultivo o lo hacen solo después de largos periodos de incubación (39).

Las bacterias encontradas como contaminantes en el cultivo *in vitro* de plantas pertenecen a varios grupos ecológicos. Ellos incluyen a patógenos de plantas, epifitos, endofitos y contaminantes accidentales del aire o del hombre (55). De este modo algunas bacterias entran al cultivo de tejidos con los explantes pero otras son introducidas durante el procedimiento de trabajo en el laboratorio (34,43).

Se han aislado especies de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, entre otros (34,8,42,50,57).

Las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* han sido reportadas como los contaminantes principales de la fase de establecimiento *in vitro* ya que a menudo predominan en la naturaleza asociada a la superficie aérea de la planta (42).

Gran parte de las bacterias aisladas de la superficie de las plantas son saprofitas, pero muchas poblaciones de ciertas bacterias fitopatógenas pueden estar como epifitas sobre plantas aparentemente sanas (38).

Las observaciones microscópicas de la superficie aérea de la planta revelan que las bacterias en este lugar no son necesariamente ni espacial, ni uniformemente distribuidas y mucho menos pueden formar agregados alrededor de ciertas características morfológicas sobre la superficie. Pocos estudios están disponibles sobre la demostración de poblaciones de bacterias internas no patogénicas que están en los tejidos que son tomados como explantes (43).

Las altas presiones osmóticas, el pH, y determinadas hormonas pueden inhibir el crecimiento de las bacterias (42). Se ha comprobado que las citoquinas ejercen un efecto bacteriostático sobre ellas (11,26).

Las bacterias pueden escapar al efecto de los desinfectantes y se introducen en el cultivo *in vitro* con el explante inicial (3). Según plantean Leifert y colaboradores, (52) las bacterias pueden estar protegidas del desinfectante por la existencia de irregularidades en la superficie (cavidades estomáticas, protuberancias, ceras y tricomas). Algunas especies tienen la capacidad de expresarse en el medio de cultivo de las plantas pero otras permanecen latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores de plantas aparentemente sanas y de esta forma también quedan protegidas de los agentes químicos. Al tomar un explante de estas plantas se introduce la contaminación al cultivo *in vitro* y por el mecanismo anterior se propagan con el material vegetal, sin observarse crecimiento bacteriano sobre el medio de cultivo por largos períodos de tiempo, debido a la inhibición ocasionada por las altas concentraciones de sales, la sacarosa o el pH y solo se manifiesta en condiciones de estrés (16,34).

Leifert y otros investigadores (44) estudiaron la composición de las comunidades bacterianas que crecían sobre plantas *in vitro* de *Delphinium sp.* y *Hemerocallis sp.* y llegaron a la conclusión que pueden diferir considerablemente entre diferentes especies de plantas. Esto casualmente se atribuye a que especies de bacterias específicas de plantas han sido introducidas al cultivo *in vitro* con el material vegetal (35,17,21,31).

1.2.3 Organismos fastidiosos.

Cuando se reporta contaminación endógena se hace referencia a organismos fastidiosos, así como a las bacterias ya sean patógenas o no (34,43,3).

Algunos organismos fastidiosos como los virus, viroides, micoplasmas y rickettsias así como bacterias fitopatógenas se refieren a menudo como patógenos obligados de las plantas y solo pueden persistir fuera de sus plantas huéspedes y animales vectores por periodos limitados de tiempo (2).

No todos los virus producen síntomas definidos en sus hospedantes, por lo cual, en muchas circunstancias las enfermedades pasan inadvertidas o son difíciles de evidenciar, en consecuencia, es posible que el daño económico o las pérdidas originadas por la enfermedad no sean percibidas (52).

No se han publicado reportes de la introducción de estos microorganismos por operadores o vectores en el laboratorio, según se plantea los mismos son introducidos con el explante inicial (45).

1.3 Principales fuentes de contaminación.

La mayoría de los autores plantea que la población fúngica detectada en cultivos de tejidos vegetales coincide fundamentalmente con la encontrada en el aire del laboratorio, medio ambiente externo y en algunos casos como saprofiticos o patógenos sobre la superficie aérea de plantas que crecen en el campo ya que existen especies que en el campo no constituyen contaminantes sin embargo debido a las condiciones nutritivas favorables de los explantes vegetales en el laboratorio llegan a convertirse en un peligro para los mismos. (24,27,53,54,10,45,12).

En una investigación realizada en Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro Universitario de las Tunas, en el periodo de Mayo de 2001 a Junio de 2002 al evaluar la contaminación microbiana, se logró un bajo porcentaje de contaminación

por hongos, sin embargo la contaminación por bacterias, mostró diferencias estadísticas significativas en todos los tratamientos evaluados a los 7,14 y 21 días. Los mayores porcentajes de contaminación aparecieron en los tratamientos donde se aplicó hipoclorito de calcio, entre un 30 y un 40% a los 21 días; los restantes tratamientos se mostraron por debajo, sin diferencias estadísticas entre ellos (47).

Como se observa todos los tratamientos mostraron presencia de contaminación bacteriana, siendo una de las principales causas de pérdidas en el cultivo de tejido vegetal compartiendo los criterios de Leifert y colaboradores (4).

Esto pudo estar dado por diferentes causas, tales como: el explante, el ambiente, el hombre, los equipos y el instrumental; los operadores y técnicos deficientes de esterilización. Además los microorganismos pueden diseminarse por ácaros, trips y hormigas (52,42,50,49).

1.3.1 El explante inicial

Hace mucho tiempo que se ha reconocido que las bacterias son residentes comunes de las plantas y pueden ejercer influencia sobre su sanidad en determinadas condiciones o tener una reacción estrictamente comensal con su planta hospedera. Debido a la importancia económica de la sanidad de las plantas, numerosas investigaciones sobre las bacterias se han centrado en los patógenos y se ha prestado poca atención a los comensales estrictos (9).

En dependencia del tipo de explante utilizado los microorganismos epifíticos o endofíticos de las plantas pueden ser introducidos al cultivo *in vitro*. Con el cultivo de meristemas, según el tamaño que se establezca, pueden ser eliminados muchos de ellos, pero en explantes de hojas, pecíolos o tallos en su mayoría, no es posible (16).

Para determinar si el explante inicial fue la fuente de contaminación se requiere conocer los microorganismos que se encuentran asociados a la planta *in vivo* y relacionarla con los que aparecen *in vitro* (2).

1.3.2 El ambiente

Se ha comprobado que en los ambientes húmedos la contaminación fungosa y bacteriana es muy alta en comparación con los resultados de las observaciones en climas templados (28).

Los resultados obtenidos en investigaciones corroboran el criterio anterior. El 90% de los géneros fúngicos aislados del ambiente de los locales del área aséptica de la Biofábrica de Villa Clara se han reportado como habitantes del suelo y muchas especies de los géneros bacterianos de mayor frecuencia de aparición (*Micrococcus* y *Bacillus*) tienen también como hábitat natural este sustrato (6).

La microbiota del aire no es permanente. Este no es un medio en el que puedan desarrollarse los microorganismos, los cuales llegan a él de forma accidental, transportados por las partículas de polvo, hollín o góticas de sudor.

A través de las corrientes de aire, las partículas de suelo cargadas de esporas y células de microorganismos son arrastradas y penetran en los locales de trabajo por los acondicionadores de aire, son transportadas o introducidas por el hombre y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas (2).

Aunque no existen microorganismos específicos del aire en el ambiente que nos rodea se encuentra siempre un número determinado de estos, por tanto, si las condiciones imperantes son favorables para su desarrollo pueden permanecer en él.

El empleo de ventanas de cristal y claraboyas para permitir la incidencia de la luz sobre las cámaras de crecimiento puede convertirse en una fuente que aumente el contenido microbiano del aire si presentan fisuras o insuficiente impermeabilización.

Las vitroplantas pueden contaminarse en las habitaciones destinadas a su crecimiento; donde ocurre intercambio entre el interior del frasco de cultivo y el ambiente exterior.

La organización del proceso productivo juega un papel muy importante. Cuando en una misma área se entrecruza la entrada de material limpio (frascos con medios de cultivo, vitroplantas para subcultivar, instrumentos y materiales estériles) con la salida del material sucio (deshechos de plantas, frascos contaminados, etc.), las condiciones son propicias para que se desarrollen focos de contaminación que se extienden rápidamente (2).

Uno de los factores que influyen en el contenido microbiano del aire es el diseño arquitectónico de las instalaciones, por lo que al diseñar una instalación se debe tener muy en cuenta el problema de la contaminación (48).

Como primer aspecto de diseño para separar las áreas asépticas de las no asépticas se debe construir dos pisos colocando en el piso superior todas las áreas asépticas. (1).

Para realizar el cultivo de tejidos se requiere del mantenimiento de las condiciones asépticas. Las habitaciones que se construyen más cercanas al suelo, tienen más posibilidades de que los microorganismos arrastrados por las corrientes aéreas penetren en las mismas. Si a esto se le une el uso de acondicionadores de aire domésticos para regular la temperatura de incubación de las plantas, los cuales intercambian constantemente aire con el ambiente externo, las posibilidades de entrada de microorganismos se elevan. Esta es una de las razones por las que en Cuba los diseños de Biofábricas comprenden el área aséptica en la planta alta de las instalaciones (2)

Otro problema constructivo relacionado con la contaminación es el de las altas oscilaciones de temperatura dentro de las cámaras de cultivo; en las Biofábricas

cubanas con un diseño adecuado no se presenta, a pesar que se utilizan varios sistemas de climatización (48).

1.3.3 El hombre

El hombre interviene directamente en todas las operaciones que se realizan en el cultivo *in vitro* de plantas y es una fuente de primaria de contaminantes (20) a través del estornudo, la tos, la conversación etc. Si a esto se une el incumplimiento de la disciplina tecnológica y especialmente el desconocimiento o violación de las técnicas de asepsia y para la manipulación del material vegetal, se puede aseverar que el factor humano juega un importante papel en la contaminación de las vitroplantas (2).

La presencia de microorganismos contaminantes que son habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano como por ejemplo: *Staphylococcus epidermidis* o *Candida albicans*, generalmente indican ineficientes técnicas de asepsia por parte de los operarios.

Los microorganismos contaminantes que el hombre puede introducir, se multiplican rápidamente en los medios de cultivo, ocasionando pérdidas muy costosas. Las bacterias en estos casos son los contaminantes más frecuentes. Por ejemplo, en suspensiones contaminadas de caña de azúcar se han identificado bacterias de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* que demuestran la intervención del hombre (2).

1.3.4 Los equipos y el instrumental.

Los microorganismos pueden introducirse en el proceso de micropropagación por deficiente funcionamiento de los equipos tales como las cabinas de flujo laminar o autoclaves y por deficiente esterilización de los instrumentos de trabajo (2).

La esterilización por calor húmedo en autoclave se emplea comúnmente para eliminar microorganismos de los medios de cultivo. De la calidad de este proceso depende en gran medida la continuidad del proceso. Se debe tener en cuenta que

los instrumentos, inicialmente estériles, pueden contaminarse con microorganismos del aire, de superficies vegetales mal desinfectadas, de las manos o de la exhalación del personal (2).

Determinados microorganismos son introducidos por problemas en la esterilización. Ejemplo de ellos lo constituye el género *Bacillus* que puede contaminar los medios de cultivo por ineficiente esterilización o mal funcionamiento de las autoclaves y puede ser diseminado durante las operaciones con el material vegetal (42), sus células producen endosporas resistentes al calor capaces de sobrevivir temperaturas de 100 grados o más (41).

Otros equipos capaces introducir contaminación son los destinados al tratamiento del agua. Por fallos en el mantenimiento o procedimientos inadecuados, en sus resinas pueden abrirse oquedades donde los microorganismos, principalmente las bacterias, se sitúan y multiplican (2).

En los laboratorios con clima centralizado, estos equipos pueden introducir y diseminar contaminación cuando se combina la limpieza ineficiente de los cuartos de las consolas con la existencia de focos de contaminación y se producen fluctuaciones de temperatura; en los conductos de aire, hongos filamentosos como *Cladosporium spp.* pueden multiplicarse y sus esporas se esparcen por todas las áreas (2).

Por otra parte los instrumentos utilizados se esterilizan comúnmente con calor seco o se flamean en alcohol (2). Las esporas de *Bacillus spp.* se han encontrado sobreviviendo en el alcohol utilizado para la desinfección de los instrumentos; si estos no se esterilizan o se flamean suficiente tiempo, las esporas de *Bacillus spp.* pueden sobrevivir y diseminarse a cultivos limpios (41).

El uso de hipoclorito de sodio en sustitución de flameo garantiza una alta efectividad e incrementa la productividad, pero el desinfectante debe estar correctamente

valorado para que la concentración utilizada sea la adecuada (2). Se plantea que las esporas de *Bacillus* spp. son resistentes a muchos biocidas tales como alcohol, hipoclorito, cloruro de mercurio (41).

1.3.5 Los insectos.

La rápida aparición de contaminantes fúngicos en muchos frascos a la vez dentro de una cámara de cultivo puede ser evidencia de la presencia de ácaros, trips u hormigas, los cuales sirven de vectores para esparcir la contaminación aunque no provocan grandes daños a la planta (34,42).

Las contaminaciones producidas por ácaros y trips han causado la pérdida total del material vegetal en varios laboratorios de cultivos de tejidos (44), ya que por su pequeño tamaño pueden penetrar en los recipientes de cultivo rápidamente antes de que puedan ser detectados, lo cual ocurre cuando se observa crecimiento fungoso sobre el medio de cultivo de las plantas a partir de esporas que cargan en su migración por el laboratorio (2).

Aunque los ácaros no causan serios daños a las plantas *in vitro*, los cultivos se pierden por la diseminación de los contaminantes fungosos. Se plantea que las esporas de hongos diseminadas por estos microorganismos, pueden llevar sobre su superficie bacterias tales como *Erwinia* spp. (49).

Al igual que los ácaros, los trips tienen una corta vida y muchas especies completan su ciclo en tres semanas. Se han encontrado *in vitro* trips de los géneros: *Thrips*, *Allelotrips* y *Frankliniella* (34) y ácaros de los géneros: *Tyrophagus*, *Siteroptes* y *Pyemotus* (49).

1.4 Control de la Calidad. Generalidades.

La calidad ha experimentado a través de los años una sostenida evolución, paralela a la de la producción industrial, hasta alcanzar hoy en día un significativo protagonismo en numerosas esferas económicas y sociales del que hacer humano,

acentuándose mas este protagonismo en función del grado de desarrollo técnico económico alcanzado en los diferentes países.(30)

Tradicionalmente, en las Industrias se contaba con una división responsable de efectuar el Control de la Calidad de los productos elaborados. Es decir, se producía ejerciendo un tenue control sobre lo que se estaba fabricando, ya que se confiaba en el verdadero control posterior de la calidad, hoy debemos estudiar los principios de la estadística aplicada al control de la calidad pues la calidad se controla preventivamente en cada puesto de trabajo, y en cada etapa del proceso (20).

La Calidad Total es el estadio más evolucionado dentro de las sucesivas transformaciones que ha sufrido el término Calidad a lo largo del tiempo. En un primer momento se habla de Control de Calidad, primera etapa en la gestión de la Calidad que se basa en técnicas de inspección. Posteriormente nace el Aseguramiento de la Calidad, fase que persigue garantizar un nivel continuo de la calidad del producto o servicio proporcionado. Finalmente se llega a lo que hoy en día se conoce como Calidad Total, un sistema de gestión íntimamente relacionado con el concepto de Mejora Continua y que incluye las dos fases anteriores (18).

Fue Japón el primero en llevar el Control de la Calidad a todas las etapas del ciclo del producto, estableciendo relaciones confiables con los proveedores, involucrando al personal en el logro de la calidad, introduciendo sistemas de inspección automáticos con alta fiabilidad y bajos costos. Estos logros se han estado generalizando en el resto de los países desarrollados. Sin embargo en Cuba debido a que en la mayoría de las empresas no se cuenta con una tecnología de avanzada sino más bien obsoleta, se cuenta con proveedores únicos lo que nos coloca en una situación de dependencia, los sistemas de estimulación en muchos casos no son los óptimos, originando que no se logre por parte de los obreros el grado de involucramiento necesario para obtener una alta calidad; debe establecerse un sistema de inspección del proceso como vía fundamental de control de la calidad lo que no excluye sino por el contrario motiva a que estos sistemas de inspección sean lo más efectivos y eficientes posibles. (51)

Los elementos que deben integrar un Sistema de la Calidad y como deben funcionar para asegurar la calidad de los bienes y servicios que produce la empresa se especifican en las normas ISO 9000, las cuales no definen como debe ser el sistema de calidad si no que fijan requisitos mínimos que deben cumplir estos sistemas (43).

El sistema de control de calidad para la micropropagación tiene como objetivo esencial verificar el cumplimiento de los parámetros de calidad establecidos para el proceso y el producto terminado y a partir de ellos determinar las causas de las desviaciones presentes, con vista a la toma de decisiones. Es evidente que el cumplimiento de este objetivo redundará en un incremento de los niveles de eficiencia (36).

1.5 Gráficos de control.

Los gráficos de control fueron propuestos originalmente por W. Shewart en 1920, y desde entonces esta aplicación de técnicas estadísticas ha tenido gran difusión y al mismo tiempo un enorme éxito en el control de calidad de la producción. Así pues el control estadístico de calidad tiene como objetivo monitorizar de forma continua, mediante técnicas estadísticas, la estabilidad del proceso, y mediante los gráficos de control este análisis se efectúa de forma visual, representando la variabilidad de las mediciones para detectar la presencia de un exceso de variabilidad no esperable por puro azar, y probablemente atribuible a alguna causa específica que se podrá investigar y corregir (19,46).

En ellos se representan a lo largo del tiempo el estado del proceso que estamos monitorizando. En el eje horizontal (X) se indica el tiempo, mientras que en el eje vertical (Y) se representa algún indicador de la variable cuya calidad se mide. Además se incluyen otras dos líneas horizontales: los límites superior e inferior de control, escogidos éstos de tal forma que la probabilidad de que una observación esté fuera de esos límites sea muy baja si el proceso está en *estado de control*, habitualmente inferior a 0.01(19,46).

En cualquier proceso se produce variabilidad. En cada caso el origen de esa variabilidad puede ser muy diverso, por un lado tenemos causas impredecibles, de origen desconocido, y por tanto en principio inevitables, y por otro lado, causas previsibles debidas a factores humanos, a los instrumentos o a la organización. Estudiando meticulosamente cualquier proceso es posible eliminar las causas asignables, de tal forma que la variabilidad todavía presente en los resultados sea debida únicamente a causas no asignables; momento éste en el que diremos que el proceso se encuentra en *estado de control* (19,46).

El interés de los gráficos de control radica en que son fáciles de usar e interpretar, tanto por el personal encargado de los procesos como por la dirección de éstos, y lo que es más importante: la utilización de criterios estadísticos permite que las decisiones se basen en hechos y no en intuiciones o en apreciaciones subjetivas que tantas veces resultan desgraciadamente falsas (19,46).

1.5.1 Construcción de un gráfico de control.

Los gráficos de control de Shewart son básicamente de dos tipos; gráficos de control por variables y gráficos de control por atributos. Para cada uno de los gráficos de control, existen dos situaciones diferentes (19,46).

- a) Cuando no existen valores especificados.
- b) Cuando existen valores especificados.

Se denominan “por variables” cuando las medidas pueden adoptar un intervalo continuo de valores; por ejemplo, la longitud, el peso, la concentración, etc. Se denomina “por atributos” cuando las medidas adoptadas no son continuas; ejemplo, tres tornillos defectuosos cada cien, 3 paradas en un mes en la fábrica, seis personas cada 300, etc.

Antes de utilizar los Gráficos de Control por variables, debe tenerse en consideración lo siguiente:

- a.- El proceso debe ser estable.
- b.- Los datos del proceso deben obedecer a una distribución normal, binominal, Poisson, u otra.

- c.- El número de datos a considerar debe ser de aproximadamente 20 a 25 subgrupos con un tamaño de muestras igual o superior a dos, para que las muestras consideradas sean representativas de la población.
- d.- Los datos deben ser clasificados teniendo en cuenta que la dispersión debe ser mínima dentro de cada subgrupo y máxima entre subgrupos.
- e.- Se deben disponer de tablas estadísticas.

1.5.2 Gráfico de control para variables continuas.

Debido a la diversidad de métodos y de procesos tecnológicos han aparecido diferentes tipos de gráficos para características cuantitativas denominados gráficos de control para variables continuas (22).

Los más conocidos entre este tipo de gráficos son los siguientes:

- 1) Gráfico de promedios (X), y gráfico de recorridos (R) o de desviaciones típicas (S).
- 2) Gráficos de valores individuales (X) y recorridos móviles (R).
- 3) Gráfico de medianas (Me) y gráfico de recorridos (R).

1.5.3 Gráfico de control para valores individuales (X) y recorridos móviles (R).

En algunas situaciones del control del proceso, es imposible o poco práctico tomar subgrupos racionales. El tiempo o el costo requerido para medir una única observación son tan grandes que no se puede considerar la repetición de observaciones. Esto ocurriría típicamente cuando las mediciones son costosas (p.e., en un ensayo destructivo) o cuando el resultado en un momento dado cualquiera es relativamente homogéneo. En otras situaciones hay sólo un valor posible, (p.e., la lectura de un instrumento o una propiedad de un lote de insumos). En estos casos, es necesario que el control del proceso se base en lecturas individuales (22).

En el caso de gráficos para valores individuales, debido a que no hay subgrupos racionales que ofrezcan un estimado de variabilidad dentro del lote, los límites de control se basan en una medida de la variación obtenida frecuentemente de

recorridos móviles de dos observaciones. El recorrido móvil es la diferencia absoluta entre pares sucesivos de mediciones en una serie, o sea, la diferencia entre la primera y segunda mediciones, luego entre la segunda y la tercera, y así sucesivamente. A partir de los recorridos móviles se calcula el recorrido móvil promedio R y se utiliza para elaborar gráficos de control. Además, a partir de todos los datos se calcula el promedio general X (22).

Se debe tener cuidado con respecto a los gráficos de control para valores individuales.

- a) Los gráficos para valores individuales no son tan sensibles a los cambios del proceso como los gráficos X y R .
- b) Se deben tomar precauciones en la interpretación de los gráficos para valores individuales si la distribución del proceso no es normal.
- c) Los gráficos para valores individuales no aíslan la repetibilidad de elemento a elemento en el proceso y, por tanto, puede ser mejor utilizar en algunas aplicaciones un gráfico X y R convencional con pequeños tamaños de muestras de subgrupo (de 2 a 4) incluso si esto requiere un mayor período entre subgrupos.

El Anexo 1 nos muestra las fórmulas de límites para gráficos de control por valores individuales (49).

1.5.4 Gráfico de evolución de medias.

Para elaborar el gráfico de evolución de medias, en primer lugar se calcula la media de cada muestra y luego la media global de las medias. Seguidamente se calcula los rangos para cada muestra (valor máximo - valor mínimo), así como la media de los rangos (19.46).

Para el cálculo de los límites de control se utiliza la teoría de probabilidades, suponiendo que los datos siguen una determinada distribución de probabilidad, ya sea ésta normal, binomial, Poisson o cualquiera otra, dependiendo del tipo de datos analizado. De esta forma se determinará un factor que al multiplicarlo por un

parámetro de variabilidad (sea éste el rango o la desviación típica) nos permite calcular los límites del gráfico de control de calidad, límites que nos garantizan una probabilidad del 99 % de que las observaciones se encuentren dentro de esos márgenes si el proceso está en estado de control. Es un concepto totalmente análogo al de intervalo de confianza para una estimación, al que estamos habituados en la inferencia estadística.

En general no será necesario realizar los cálculos concretos, ya que si no se dispone de un programa al efecto se puede acudir a cualquier libro de control de calidad, donde encontraremos tabulados los valores a aplicar ([Anexo 2](#)).

Los límites de calidad superior e inferior para un gráfico de medias se calculan de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$LCS_m = M + A_2 R$$

$$LCI_m = M - A_2 R$$

Donde M es la media global (media de todas las medias) y R es la media de todos los rangos ([19,46](#)).

Triana([56](#)) Utilizó este tipo de gráfico para detectar los límites de control para los locales de elaboración y dosificación de los medios de cultivos en Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP)

1.6 Procedimiento de control e interpretación para gráficos de control por variables.

El sistema Shewhart de gráficos estipula que si la variabilidad elemento a elemento del proceso y el promedio del proceso permanecieran constantes en sus niveles actuales (según los estimados con R y X respectivamente), los recorridos (R) y los promedios (X) individuales del subgrupo variarían sólo aleatoriamente y rara vez irían más allá de los límites de control. De igual modo, no habría tendencias o patrones evidentes en los datos, más allá de lo que ocurriría probablemente de modo aleatorio. El gráfico X muestra dónde la media del proceso está centrada e

indica la estabilidad del mismo. El gráfico X revela variaciones indeseables entre subgrupos en lo que se refiere a sus promedios.

El gráfico R revela cualquier variación indeseable dentro de los subgrupos y es un indicador de la magnitud de la variabilidad de los procesos estudiados. Es una medida de la consistencia o la uniformidad del proceso. El gráfico R se mantiene en control si las variaciones dentro del subgrupo son esencialmente las mismas. Esto ocurre sólo si todas las muestras reciben el mismo tratamiento.

Si el gráfico R no se mantiene en control o si su nivel aumenta, puede ser una indicación de que, o bien hay diferentes subgrupos sometidos a diferentes tratamientos, o hay varios sistemas causa-efecto diferentes operando en el proceso (22).

Los gráficos X pueden también afectarse por las condiciones de falta de control del gráfico R. Debido a que la capacidad de interpretar los recorridos del subgrupo o los promedios del subgrupo dependen del estimado de la variabilidad elemento a elemento, se analiza primero el gráfico R. Se debe aplicar el siguiente procedimiento de control (22).

- 3 Recopilar y analizar los datos, calculando los promedios y los recorridos.
- 3 Plotear primero el gráfico R. Comprobar los puntos de los datos con respecto a los límites de control para puntos fuera de control o para patrones o tendencias inusuales. Para cada indicación de una causa asignable en los datos del recorrido, realizar un análisis de la operación del proceso para determinar la causa, corregir esa condición y evitar que se repita.
- 3 Excluir todos los subgrupos afectados por una causa asignable identificada; luego recalcular y Plotear el nuevo recorrido promedio (R) y los límites de control. Confirmar que todos los puntos del recorrido muestren control estadístico cuando se comparan con los nuevos límites repitiendo si es preciso la secuencia identificación / corrección / recálculo.

- 3 Si se quita algún subgrupo del gráfico R debido a causas asignables identificadas, se excluirá también del gráfico X. Los valores R y X revisados se utilizarán para recalcular los límites de control del experimento para promedios, $\bar{X} \pm A_2\bar{R}$.

La exclusión de subgrupos que representan condiciones fuera de control no es sólo “botar los datos malos”. Es más bien una posibilidad, al excluir los puntos afectados por causas asignables conocidas, de tener un mejor estimado del nivel de fondo de la variación debida a causas aleatorias. Esto a su vez constituye la base más apropiada para que los límites de control utilizados puedan detectar con más eficiencia las ocurrencias futuras de causas asignables de variación (49).

- 3 Cuando los recorridos están en control estadístico, se considera estable la dispersión del proceso (la variación dentro del subgrupo). Así se pueden analizar los promedios para comprobar si la ubicación del proceso está cambiando con el tiempo.
- 3 Ahora plotear el gráfico X y chequear los puntos de datos con respecto a los límites de control para ver si alguno está fuera de los límites de control o detectar patrones o tendencias inusuales.

Como en el gráfico R, analizar toda condición fuera de control y tomar acciones correctivas y preventivas. Excluir todo punto fuera de control para el que se hayan detectado causas asignables; recalcular y plotear el nuevo promedio del proceso ($\bar{X}$) y los límites de control. Confirmar que todos los puntos de datos están en control estadístico cuando se comparan con los nuevos límites, repitiendo si es preciso la secuencia identificación / corrección / recálculo.

- 3 Si los datos iniciales para establecer valores de referencia de los límites de control están y se mantienen consistentemente contenido dentro de los límites del experimento, extender los límites para cubrir los períodos futuros. Estos límites se utilizarán para el control permanente del proceso, y los individuos responsables (operador y/o supervisor) responderán con acciones rápidas a las señales de condiciones fuera de control en el gráfico X o R (22).

Materiales y Métodos

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) en el período comprendido de Febrero a Junio de 2006.

2.1 Realización de muestreos microbiológicos ambientales aplicando la metodología modificada (14).

Se definieron 14 estaciones de muestreo (EM) en el Laboratorio de Investigaciones de Biotecnología del INIVIT. Todas en áreas asépticas. Las Estaciones de Muestreo son las siguientes (ver Anexo 3)

Estaciones de Muestreo (EM)

✓ *Planta Alta*

1. Estante de inmersión temporal, en el centro (cuarto de cultivo N^o1)
2. Estante centro, tercer piso, medio (cuarto de cultivo N^o1)
3. Piso de adelante, frente la puerta (cuarto de cultivo N^o1)
4. Cabina de Flujo Laminar N^o1 puesto izquierdo (cuarto de siembra N^o1)
5. Cabina de Flujo Laminar N^o1 puesto derecho (cuarto de siembra N^o.1)
6. Estante izquierdo, tercer piso, pasillo (cuarto de siembra N^o1)
7. Estante frente, penúltimo piso (cuarto de siembra N^o1).
8. Piso de entrada (cuarto de siembra N^o1) .

✓ *Planta baja*

9. Cabina de Flujo Laminar N^o2, puesto izquierdo (cuarto de siembra N^o3 frente a la puerta)
10. Cabina de Flujo Laminar N^o2, puesto derecho (cuarto de siembra N^o3 frente a la puerta)
11. Cabina de Flujo Laminar N^o3, puesto izquierdo (cuarto de siembra N^o3)

12. Cabina de Flujo Laminar N°3 puesto derecho (cuarto de cultivo N°3)
13. Estante izquierdo, tercer piso, frente a la entrada (cuarto de cultivo grande)
14. Estante fondo, segundo piso (cuarto zaranda)

Se realizaron 25 muestreos ambientales mediante el procedimiento de placa expuesta, empleando 50 placas de Petri de 7.5 cm de diámetro. En cada estación de muestreo se colocaron cuatro placas, de las cuales dos contenían un medio de cultivo propicio para bacterias (agar nutriente, Oxoid) y dos un medio de cultivo propicio para hongos (agar Saburaud). El tiempo de exposición fue de 15 minutos y cada una se identificó rotulándole el número de la estación de muestreo correspondiente. Se especificaron las condiciones bajo las cuales se realizó el muestreo en cuanto a:

- Limpieza el fin de semana precedente.
- Presencia de insectos o animales pequeños que puedan contaminar las áreas.
- Condiciones anormales de la climatización.
- Estado de los aires acondicionados
- En el caso de las operarias especificar el puesto de trabajo y su nombre (se les asignó un número a cada operaria)

Las placas fueron incubadas a 32°C realizándose un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) bacterianas y colonias fúngicas a las 48 y 120 horas respectivamente.

Los resultados se ubicaron en una tabla de recogida de datos para su posterior análisis. ([Ver Anexo 4](#))

2.2 Construcción de los gráficos de control.

Se calculó la media de los dos valores de número de Unidades Formadoras de Colonias bacterianas y fúngicas obtenidas en cada muestreo microbiológicos en cada estación de muestreo (excluyendo las cabinas de flujo laminar ya que la

contaminación en estas debe ser cero). Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba χ^2 . Y se construyeron gráficos de control de Shewhart de valores medios ($\bar{X}_{media}$) resultando de interés obviamente el límite de control superior. En aquellos casos en que uno o más puntos resultaron fuera de control se determinó si existían causas asignables que justificaran su exclusión, reconstruyendo posteriormente el gráfico de control. Para llevar a cabo lo antes descrito se empleó el paquete estadístico Statistica versión 6.0.

2.3 Análisis de los resultados de los muestreos microbiológicos ambientales en las cabinas de flujo laminar.

Los datos fueron analizados con vistas a determinar:

1. Influencia de las cabinas de flujo laminar.
2. Influencia entre los puestos de cada cabina de flujo laminar
3. Influencia de la operaria.

✓ Influencia de las cabinas de flujo laminar y las operarias.

A los datos obtenidos en las tres cabinas de flujo laminar se les aplicó el test de análisis de varianza por rango (no paramétrico, ya que se trabajó con tamaños de muestras diferentes) según Kruskal-Wallis (K.W) y se le aplicó posteriormente una comparación de medias de rangos mediante prueba múltiple de distribución libre. Teniendo en cuenta la iniciación del material vegetal y excluyéndola. Con vistas a determinar si existían diferencias significativas entre cada cabina de flujo laminar y entre las operarias. Para estos procesamientos se utilizó el paquete Statistica 6.0.

✓ Influencia entre los puestos de cada cabina de flujo laminar

A los datos obtenidos en los dos puestos de las tres cabinas de flujo laminar se les aplicó la Prueba no Paramétrica de Comparación de muestras independientes según Mann-Witney (U), dos veces incluyendo y excluyendo la iniciación del material vegetal. Con vistas a determinar si existían diferencias significativas entre los puestos de cada laminar..

Resultados y Discusión

3.1 Realización de muestreos microbiológicos ambientales aplicando la metodología modificada.

Los 25 muestreos planificados fueron realizados exitosamente en los estantes y pisos.

El número de muestreos microbiológicos ambientales para cada cabina de flujo laminar fue:

- ✓ Cabina de Flujo Laminar 1 : 24 muestreos ambientales.
- ✓ Cabina de Flujo Laminar 2 : 21 muestreos ambientales.
- ✓ Cabina de Flujo Laminar 3 : 22 muestreos ambientales.

Esto se debió a factores como la falta de fluido eléctrico ya que en algunos casos no se encontraban funcionando.

Estos muestreos microbiológicos ambientales se realizaron de forma dinámica ya que se contó con dos juegos de placas de Petri (de 50 cada uno) para poder utilizar el primero en una semana y que a la vez mientras se estuviera evaluando las UFC bacterianas o fúngicas poder preparar el medio de cultivo en las 50 placas restantes, y así no se perdería tiempo de trabajo por la limpieza y esterilización de la cristalería.

3.2 Construcción de los gráficos de control.

3.2.1 Análisis de la contaminación microbiana en los estantes.

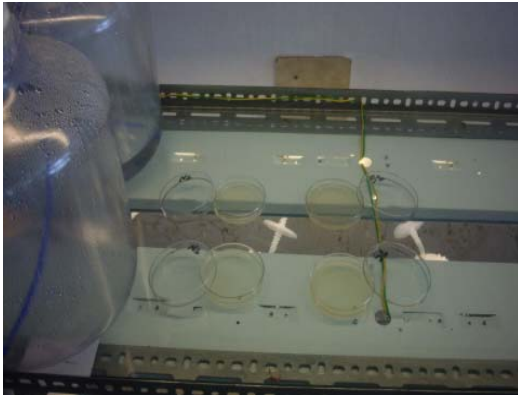
✓ Estantes de la planta alta

En la figura 1 se muestran los estantes pertenecientes a la planta alta.

Figura 1
Estantes de la Planta Alta

A

**Estación de Muestreo 1
(Cuarto de Cultivo N°1)**



B

**Estación de Muestreo 2
(Cuarto de Cultivo N°1)**



C

**Estación de Muestreo 6
(Cuarto de Siembra N°1)**



D

**Estación de Muestreo 7
(Cuarto de Siembra N°1)**



✓ Estación de muestreo N °1 (Figura A)

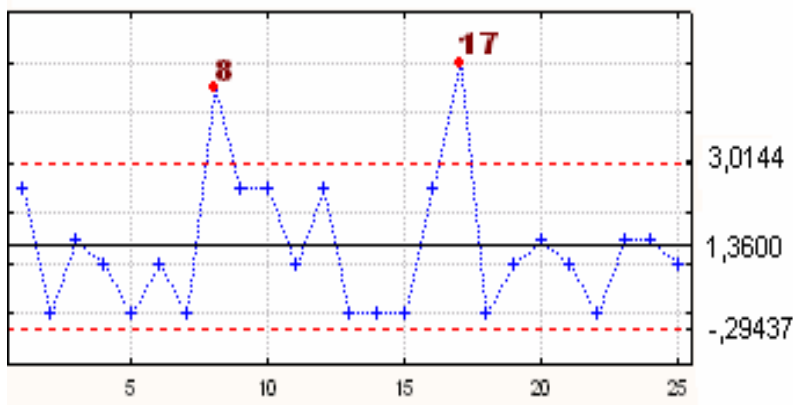


Gráfico 1

X(media) UFC bacterianas
(1- α) = 99.7% P=0.05762

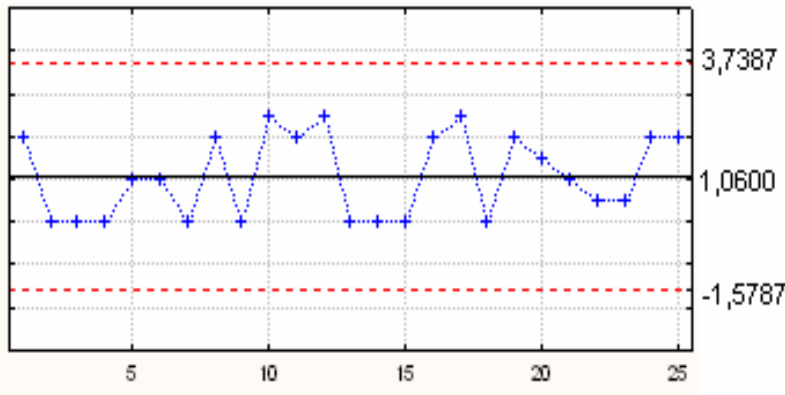


Gráfico 2

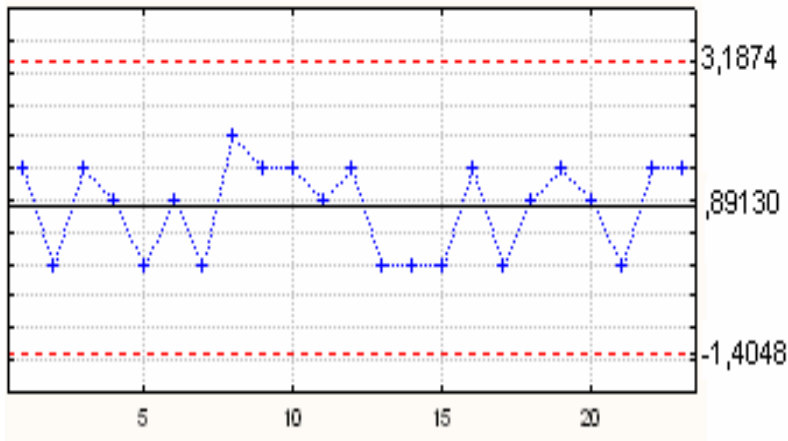
X(media) UFC fúngicas
(1- α) = 99.7% P=0.0509

En el gráfico 2 no se muestran valores por encima del Límite de control superior por lo que la contaminación para las UFC fúngicas se encuentra bajo control estadístico, al contrario del gráfico 1 donde se reflejan dos valores por encima de dicho límite, por lo que estos pasan a analizarse:

UFC bacterianas

- ✓ Punto 8: Se detectaron insectos en descomposición.
- ✓ Punto 17: Se encontraron hormigas presentes en el estante.

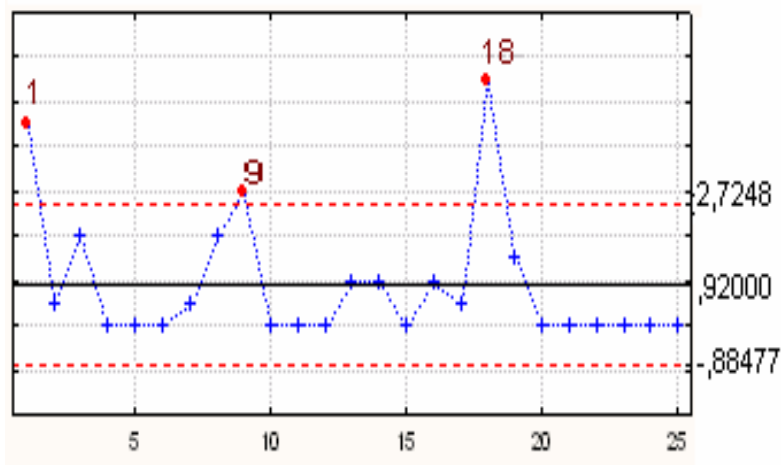
Se propone la reconstrucción del gráfico X (media) para las UFC bacterianas ya que las causas anteriormente expuestas se consideran asignables de error.

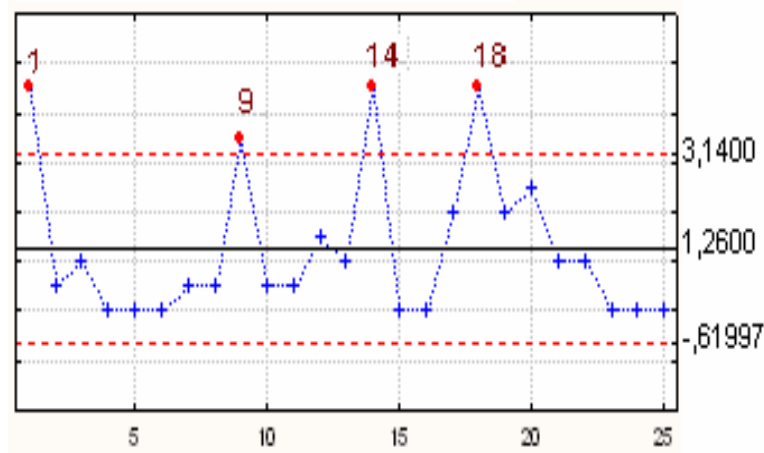
**Gráfico 3****X(media) recalculada****UFC bacterianas****(1- α)= 99.7% P=0.0520**

El límite de control para esta estación de muestreo es de 4 UFC bacterianas y 4 UFC fúngicas.

✓ Estación de muestreo N °2 (Figura B)

A continuación se muestran los gráficos de control (4 y 5) para valores medios contruidos para UFC bacterianas y fúngicas respectivamente.

**Gráfico 4****(Xmedia) UFC bacterianas****(1- α)=99.7% P=0.06454**

**Gráfico 5**

(Xmedia) UFC Fúngicas

(1- α)= 99.7% P=0.05875

En los gráficos 4 y 5 hay varios puntos que sobrepasan el límite de control superior (1,9,18 UFC bacterianas) y (1,9,14,18 UFC fúngicas) los cuales pasan a ser evaluados:

UFC bacterianas

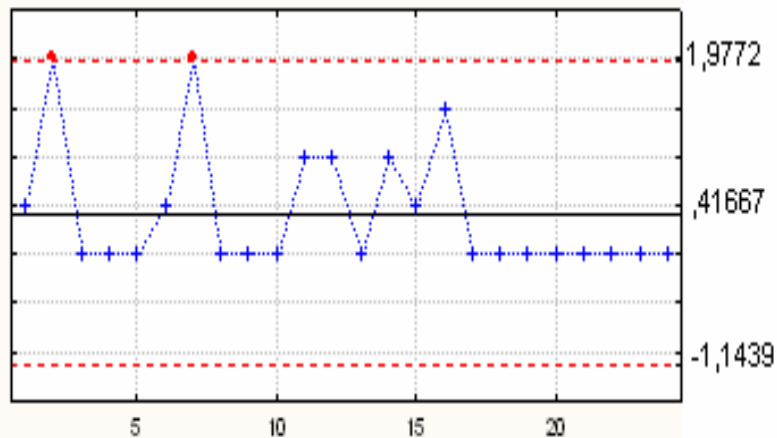
- ✓ Punto 1 y 9: No se realizó limpieza exhaustiva el fin de semana precedente.
- ✓ Punto 18: Estante muy sucio.

La temperatura se encontraba por encima de los 29°C (la temperatura normada para un cuarto de siembra es de $27 \pm 2^\circ\text{C}$).

UFC fúngicas

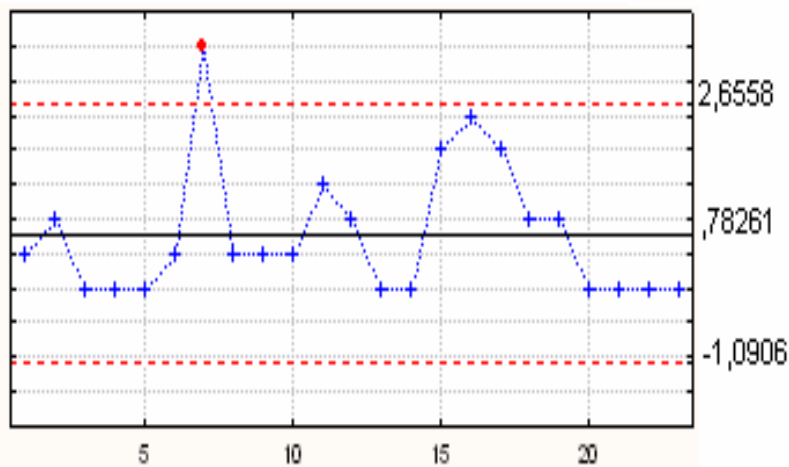
- ✓ Punto 1,9,18: Se refieren las mismas causas anteriores
- ✓ Punto 14: Cortinas que quedan cerca de esta estación muy sucias.

Las causas referidas anteriormente se consideran asignables de error, lo que explica que estos puntos queden fuera del control estadístico. Por lo que se recomienda la reconstrucción de los gráficos tanto para UFC bacterianas como para UFC fúngicas.

**Gráfico 6**

X(media) recalculada

UFC bacterianas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.08002$ **Gráfico 7**

X(media) recalculada UFC

Fúngicas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.06932$

Como se puede observar en los gráficos 6 y 7 el límite de control para esta estación de muestreo es de 2 UFC bacterianas y 3 UFC fúngicas.

Tabla N°1 Límites de control estadístico para UFC bacterianas y fúngicas

Estación de Muestreo	Límites de Control	
	UFC bacterianas	UFC fúngicas
1	4	4
2	2	3

En la Tabla N°1 se muestra que el límite de control tanto para UFC bacterianas como fúngicas resultaron ser mayores en la EM1 que en la EM2 lo cual puede deberse a:

1. Su cercanía a las puertas, principalmente la que conlleva al área de la meseta (área no aséptica) donde se dosifican los medios de cultivo.
2. Se encuentra muy cerca del aire acondicionado doméstico, el cual se considera una fuente de entrada de microorganismos.
3. Hay presencia de luminarias en el estante lo que provoca que algunos insectos sean atraídos por la luz y queden expuestos a la descomposición dentro del mismo estante. Estas son imprescindibles porque gracias a ellas, el material vegetal que se encuentra en crecimiento puede realizar el proceso de la fotosíntesis.
4. Dentro de este mismo cuarto de cultivo hay puesta una cortina más cerca de la EM2 que de la EM1 pero que repercute en la contaminación de estas, ya que se convierten en una fuente de acumulación de microorganismos y más si no se limpian con frecuencia. Esta está colocada con el objetivo de disminuir la intensidad luminosa ya que el material vegetal tiene un régimen de fotoperíodo que tiene su límite en (3500 lux).

✓ **Estación de muestreo N°6 (Figura C)**

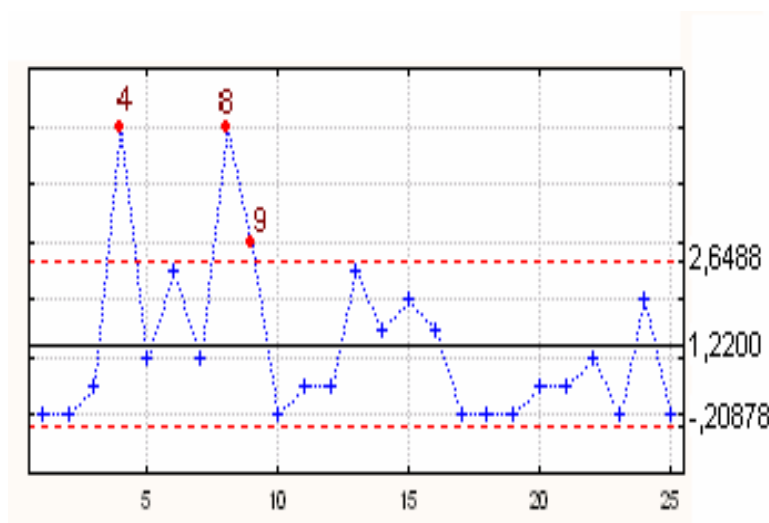
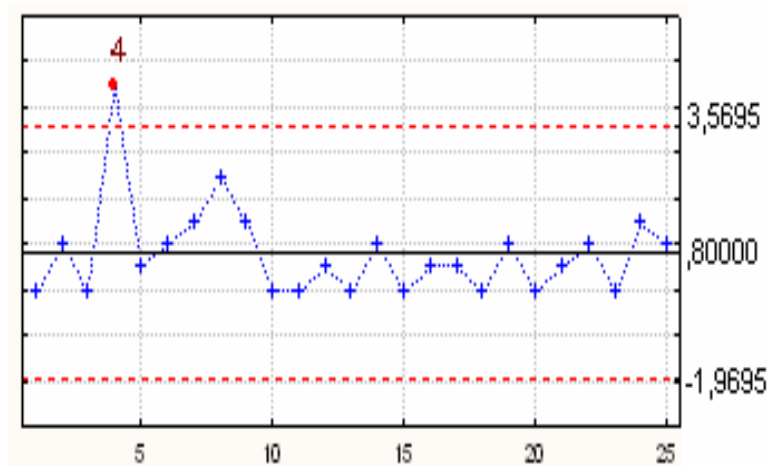


Gráfico 8

X(media) UFC bacterianas
(1- α)= 99.7% P=0.05165

**Gráfico 9**

X(media) UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.05773

El gráfico 8 muestra tres valores fuera de control estadístico (4,8,9 UFC bacterianas) mientras que el gráfico 9 solo muestra un punto fuera de control estadístico (4 UFC fúngicas) por lo que estos valores pasan a ser analizados:

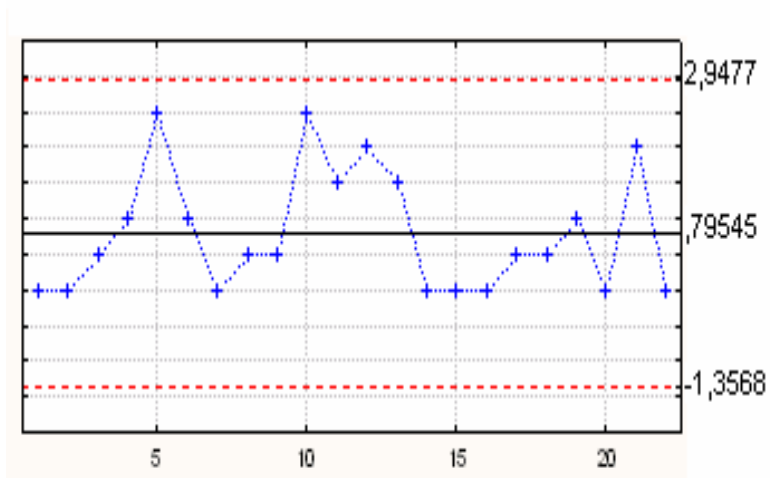
UFC bacterianas

- ✓ Punto 4: Se encontraban reparando luces y aires acondicionados.
- ✓ Punto 8: Se encontraban hormigas presentes en los estantes
- ✓ Punto 9: No se realizó la limpieza exhaustiva el fin de semana precedente.

UFC fúngicas

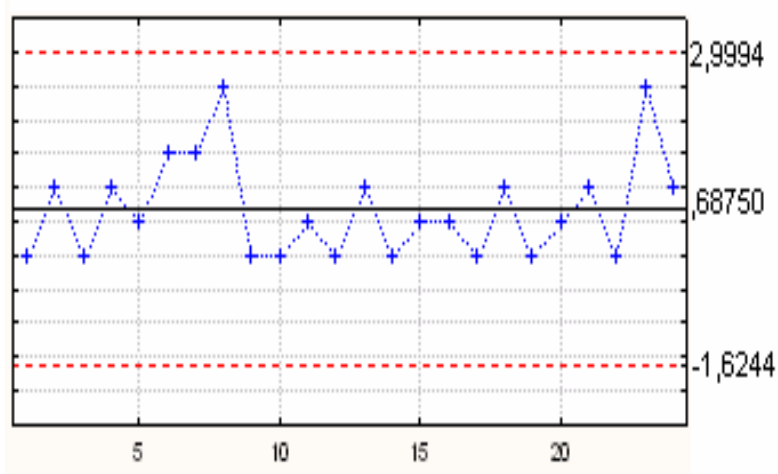
- ✓ Punto 4: La misma causa referida anteriormente.

Las causas referidas anteriormente se consideran asignables de error, lo que explica que estos puntos queden fuera del control estadístico. Por lo que se recomienda la reconstrucción de los gráficos tanto para UFC bacterianas como para fúngicas

**Gráfico 10**

X(media) recalculada

UFC bacterianas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.7231$ **Gráfico 11**

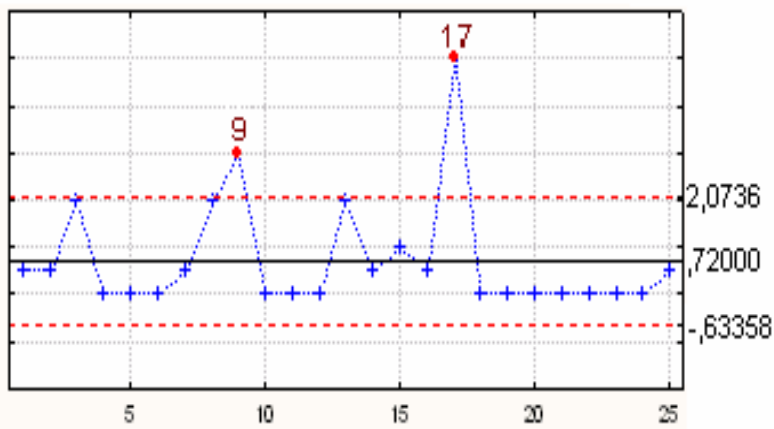
X(media) recalculada

UFC fúngicas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.06000$

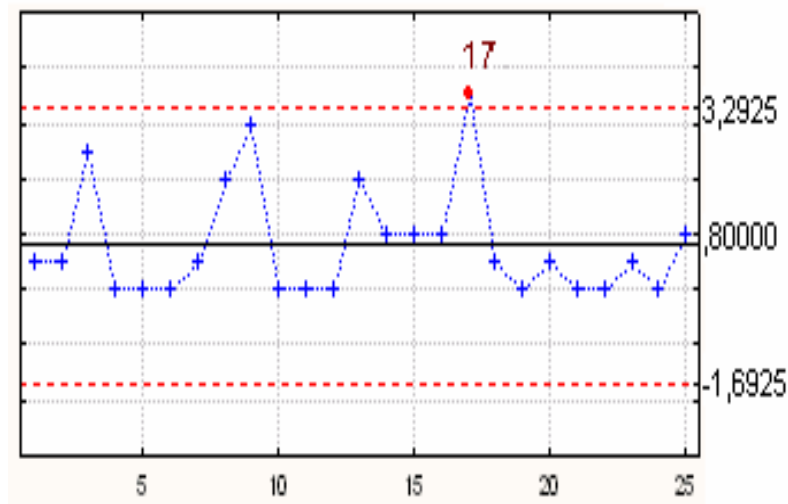
El límite de control para esta estación de muestreo es de 3 UFC bacterianas y 3 UFC fúngicas.

✓ Estación de muestreo N°7 (Figura D)

**Gráfico 12**

X(media) UFC bacterianas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.61564$

**Gráfico 13**

X(media) UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.13795

En el gráfico 12 podemos apreciar que hay dos puntos que sobrepasan el LCS (9 y 17 para UFC bacterianas), y solo un valor sobrepasa este límite en el gráfico 13 (17 para UFC fúngicas) por lo que se pasan a analizar:

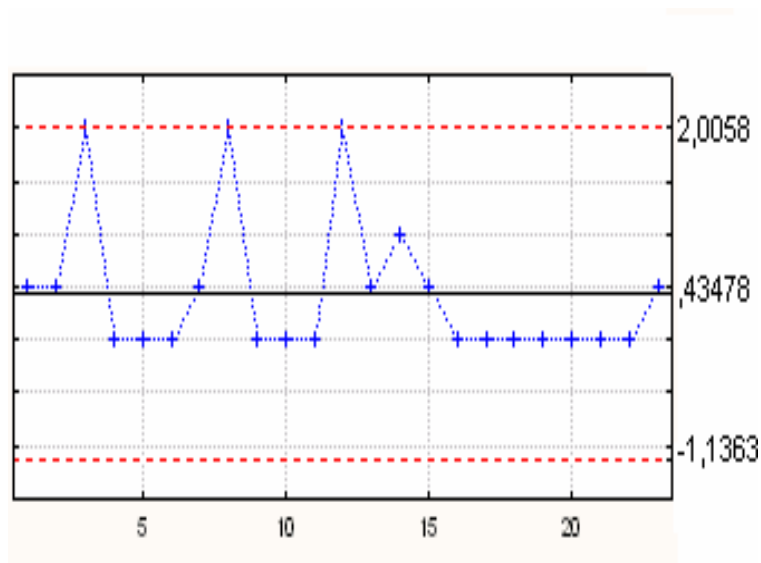
UFC bacterianas

- ✓ Punto 9: No se realizó una limpieza exhaustiva para el fin de semana precedente
- ✓ Punto 17: Se encontraron hormigas presentes en el estante.

UFC fúngicas

- ✓ Punto 17: Se encontraron hormigas presentes en el estante.

Las causas referidas anteriormente se consideran asignables de error, lo que explica que estos puntos queden fuera del control estadístico. Por lo que se recomienda la reconstrucción de los gráficos tanto para UFC bacterianas como para fúngicas.

**Gráfico 14**

X(media) recalculada

UFC bacterianas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.09932$ **Gráfico 15**

X(media) recalculada

UFC fúngicas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.22124$

Los límites de control para esta estación de muestreo son 2UFC bacterias 3 UFC para hongos.

Tabla N°2 Límites de control estadístico para las estaciones de muestreo 6 y 7.

Estación de Muestreo	Límites de Control	
	UFC bacterianas	UFC fúngicas
6	3	3
7	2	3

La Tabla N° 2 muestra los límites de control estadístico de la EM6 y EM7. En esta se manifiesta que la EM6 es superior en 1 UFC bacteriana .

Lo que puede deberse a:

1. Este es un estante muy bajo, al contrario de la EM9 la cual es de mayor altura. Al estar más cercano al piso, mayor posibilidad tiene atraer contaminantes.
2. Se encuentra muy cerca del aire acondicionado, (debajo de este) por lo que puede atraer microorganismos contaminantes por el flujo de aire de este.

✓ Estantes de la planta baja

A continuación mostramos en la figura 2 los estantes pertenecientes a la planta baja.

Figura 2

Estantes de la Planta Baja

E

Cuarto de Cultivo Grande



F

Cuarto zaranda



✓ Estación de muestreo N° 13 (Figura E)

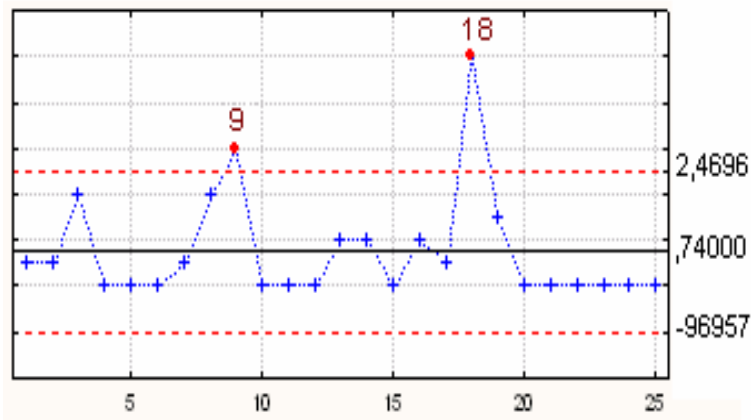


Gráfico 16

X(media) UFC bacterianas
(1- α)= 99.7% P=0.15285

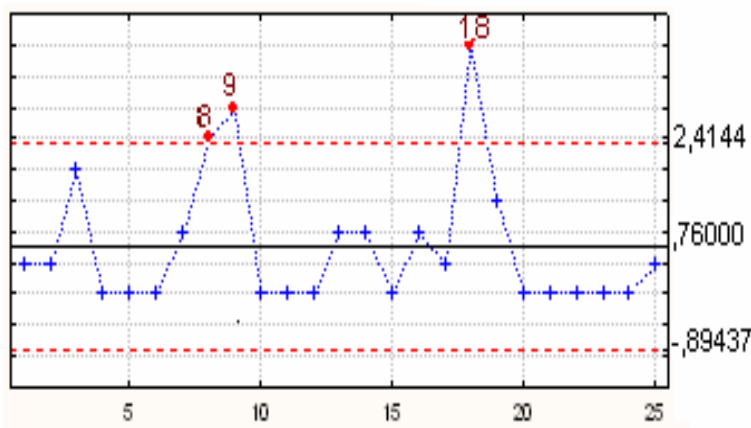


Gráfico 17

X(media) UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.06904

El gráfico 16 presenta dos valores fuera del límite de control (9,18 para UFC bacterianas) mientras que el gráfico 17 muestra 3 valores fuera de este (8,9 y 18 para UFC fúngicas).A continuación su análisis:

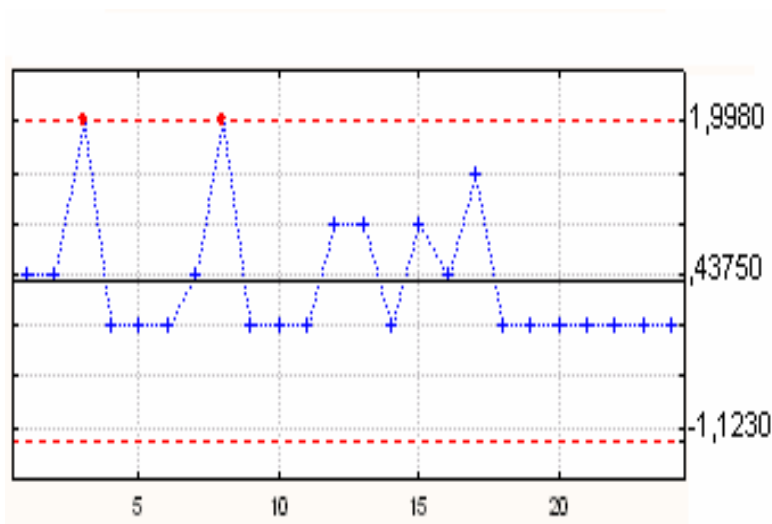
UFC bacterianas

- ✓ Punto9: Estante sin limpiar
- ✓ Punto18: Se estaba cambiando la luminaria de los estantes.
Cajas y utensilios presentes, con este fin.

UFC fúngicas

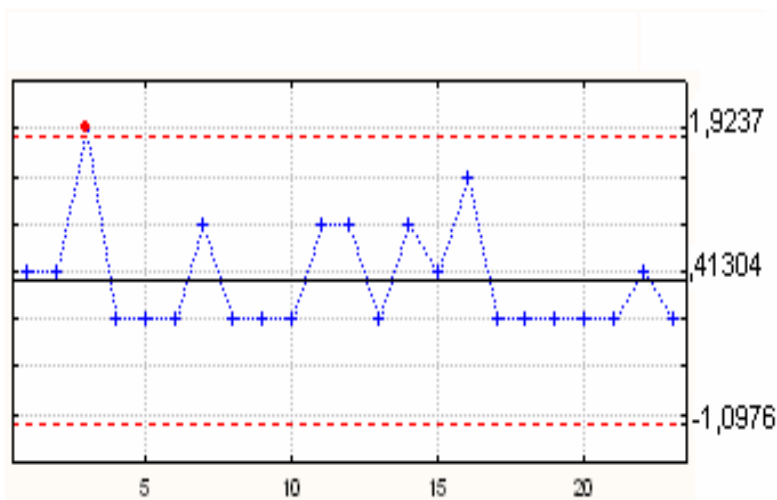
- ✓ Punto 8: Estante sin limpiar
- ✓ Punto 9: La misma causa anteriormente expuesta
- ✓ Punto18: La misma causa anteriormente expuesta

Las causas referidas anteriormente se consideran asignables de error, lo que explica que estos puntos queden fuera del control estadístico. Por lo que se recomienda la reconstrucción de los gráficos tanto para UFC bacterianas como para fúngicas

**Gráfico 18**

X(media) recalculada

UFC bacterianas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.17443$ **Gráfico 19**

X(media) recalculada

UFC fúngicas

 $(1 - \alpha) = 99.7\%$ $P = 0.8501$

Los límites de control para esta estación de muestreo son 2 UFC bacterianas y 2 UFC fúngicas.

✓ Estación de muestreo N°14 (Figura F)

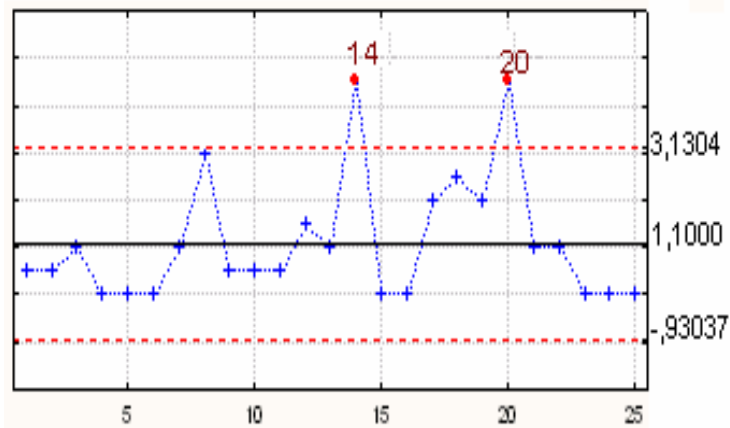


Gráfico 20

X(media) UFC bacterianas
(1- α)= 99.7% P=0.05518

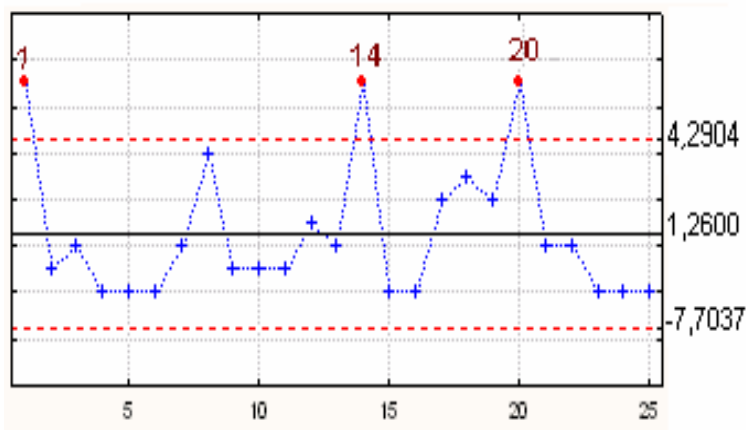


Gráfico 21

X(media) UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.46884

Los gráficos 20 y 21 muestran los mismos valores fuera del límite de control (14 y 20 para UFC bacterianas y fúngicas) a excepción del punto 1 en el gráfico 21. Los mismos fueron analizados:

UFC bacterianas

- ✓ Punto14 : Presencia de una rana en el estante. Se busco posible entrada de este animal suponiéndose que fuera por el aire acondicionado.
- ✓ Punto20: Se observaron heces fecales de lagartija.

UFC fúngicas

- ✓ Punto1: Estante sin limpiar
- ✓ Punto14: Las mismas causas referidas anteriormente.
- ✓ Punto20: Las mismas causas referidas anteriormente.

Las causas referidas anteriormente se consideran asignables de error, lo que explica que estos puntos queden fuera del control estadístico. Por lo que se recomienda la reconstrucción de los gráficos tanto para UFC bacterianas como para fúngicas.

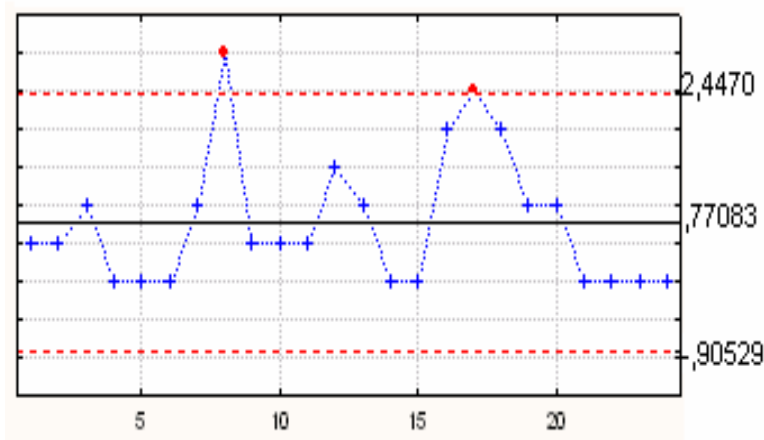


Gráfico 22

X(media) recalculada
UFC bacterianas
(1- α)= 99.7% P=0.06540

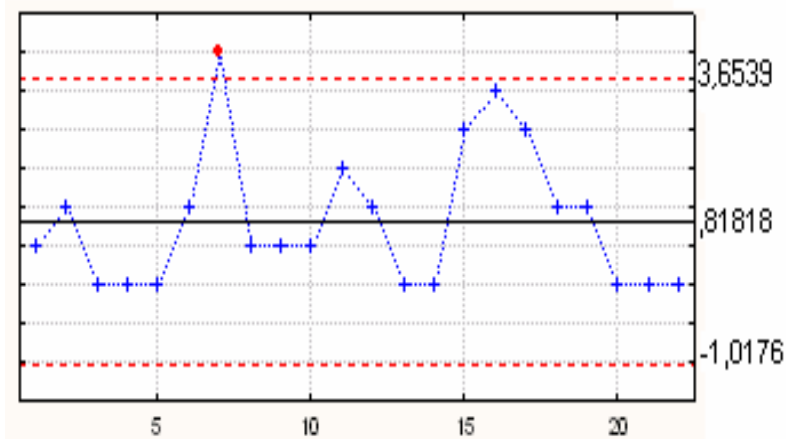


Gráfico 23

X(media) recalculada
UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.50000

El límite de control para esta estación de muestreo son 3 UFC bacterianas y 4UFC fúngicas.

Tabla N°3 Límites de control estadístico para las estaciones de muestreo 13 y 14.

Estación de Muestreo	Límites de Control	
	UFC bacterianas	UFC fúngicas
13	2	2
14	3	4

La Tabla N° 3 muestra los límites de control para las EM 13 y 14 la misma refleja la superioridad de UFC tanto bacterianas como fúngicas de la EM14

Lo que puede deberse a:

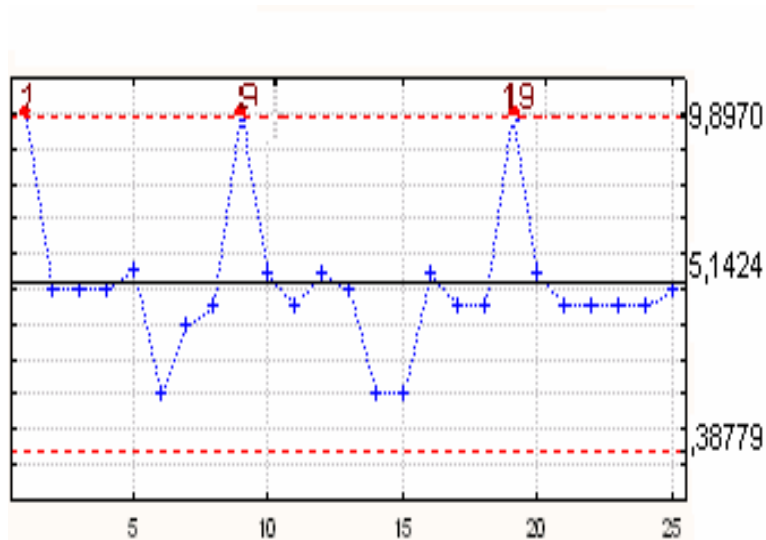
1. Esta da directamente a la meseta (área no aséptica) donde se realiza el lavado de manos y el personal se prepara para la entrada a otras áreas al contrario de la EM 13 que esta antecedida por un área aséptica lo cual lo hace menos susceptible a la entrada de microorganismos.
2. Se encuentra muy cerca del aire acondicionado y este da al exterior de la edificación por lo que pueden entrar insectos o animales pequeños que puedan influir en la contaminación.
3. En este cuarto de cultivo se encuentra una zaranda la cual esta en constante movimiento y puede remover esporas que se encontraban en reposo.

En el [Anexo 5 y 6](#) se muestran los valores medios para las UFC obtenidas en cada uno de los estantes.

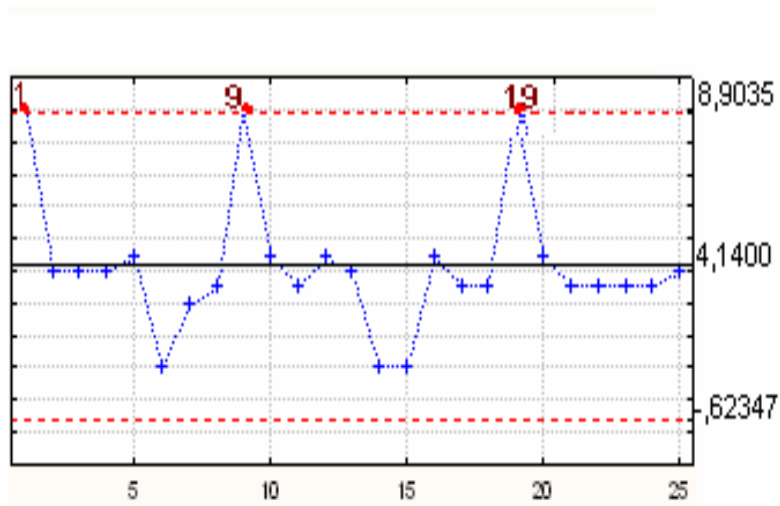
3.2.2 Análisis de la contaminación microbiana en los pisos.

En el [Anexo 7](#) se muestran los valores medios para las UFC obtenidas en cada uno de los pisos.

✓ Estación de muestreo N° 4

**Gráfico 24**

X(media) UFC bacterianas
(1- α)= 99.7% P=0.57012

**Gráfico 25**

X(media) UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.22716

En los gráficos 24 y 25 hay valores que salen fuera del control estadístico estos son(1,9,19 UFC bacterianas) y (1,9,19 UFC fúngicas) los cuales se analizan

UFC bacterianas

- ✓ Punto1: no limpieza exhaustiva para el fin de semana precedente
- ✓ Punto9: no limpieza exhaustiva para el fin de semana precedente
- ✓ Punto19: polvo para hormigas

UFC fúngicas

- ✓ Punto1no limpieza exhaustiva para el fin de semana precedente
- ✓ Punto9: no limpieza exhaustiva para el fin de semana precedente
- ✓ Punto19 polvo para hormigas

Las causas referidas anteriormente se consideran asignables de error, lo que explica que estos puntos queden fuera del control estadístico. Por lo que se recomienda la reconstrucción de los gráficos tanto para UFC bacterianas como para fúngicas

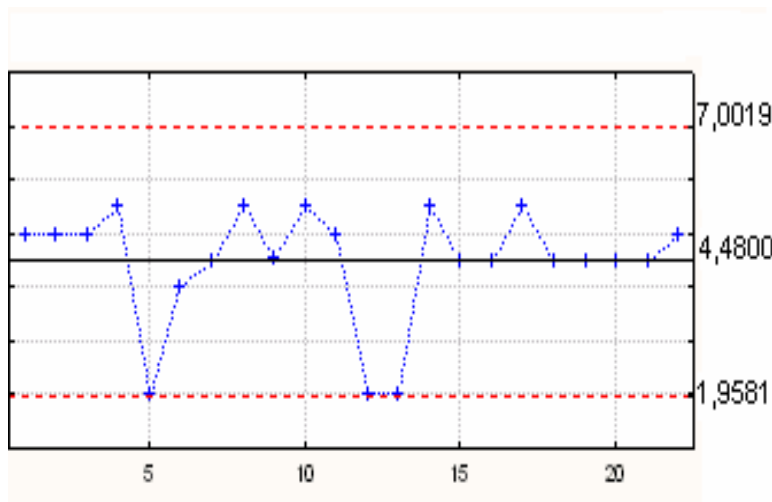


Gráfico 26

X(media) recalculada
UFC bacterianas
(1- α)= 99.7% P=0.69001

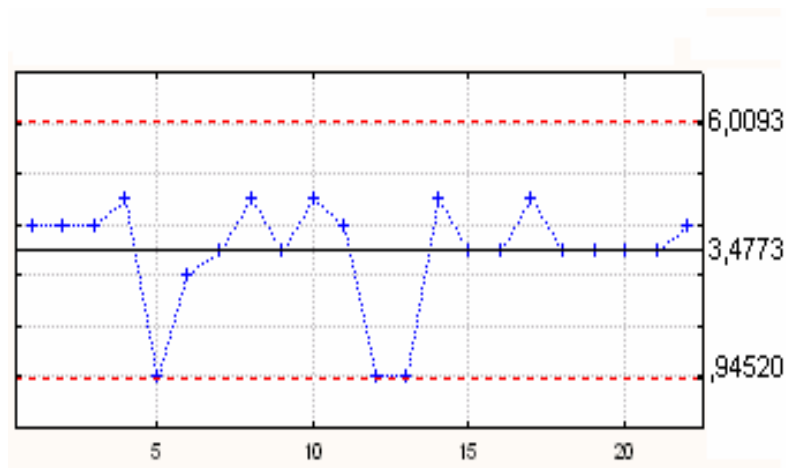
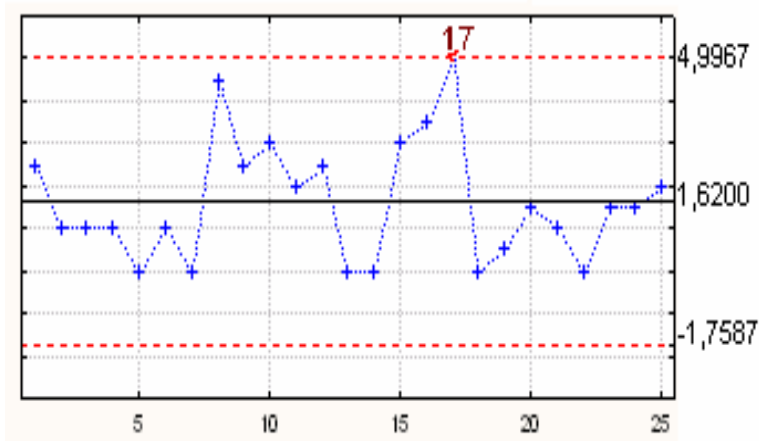


Gráfico 27

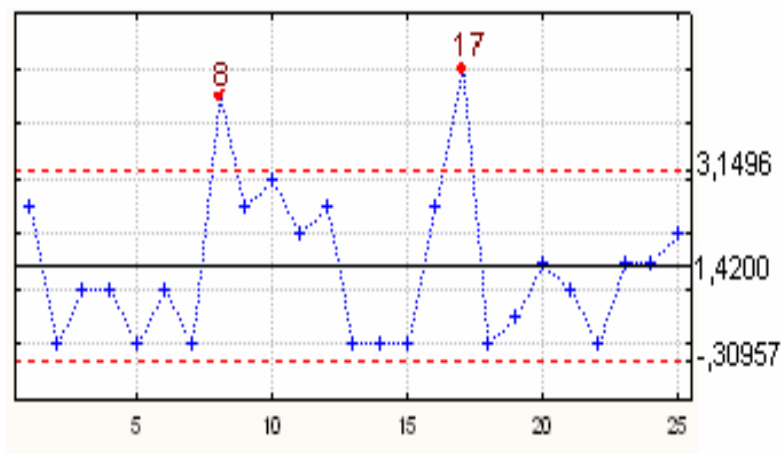
X(media) recalculada
UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.09412

El límite de control para esta estación de muestreo es 7 UFC bacterianas y 6 UFC fúngicas.

✓ Estación de muestreo N° 8

**Gráfico 28**

X(media) UFC bacterianas
(1- α)= 99.7% P=0.06939

**Gráfico 29**

X(media) UFC fúngicas
(1- α)= 99.7% P=0.05088

Los valores fuera de el límite de control superior fueron analizados.

UFC bacterianas

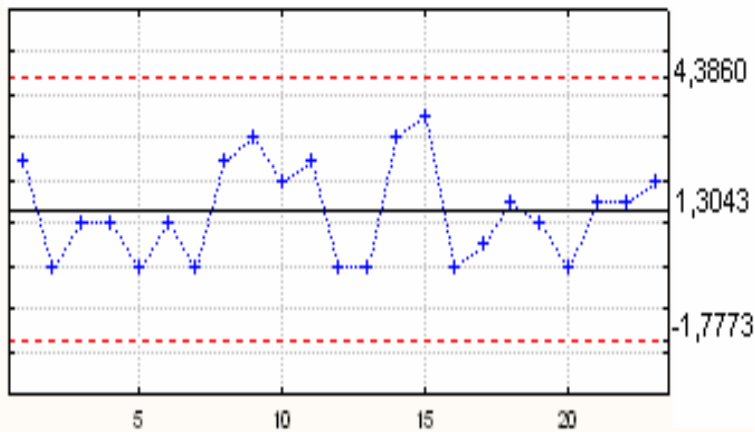
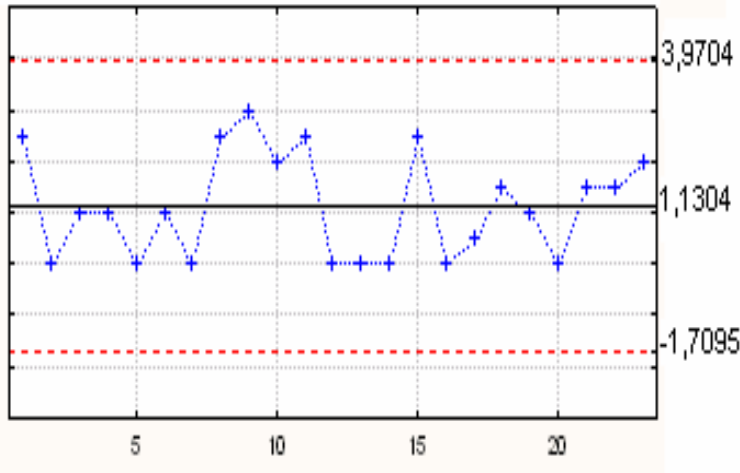
✓ Punto 17: polvo para hormigas

UFC fúngicas

✓ Punto 8: Hormigas presentes

✓ Punto 16: polvo para hormigas

Las causas referidas anteriormente se consideran asignables de error, lo que explica que estos puntos queden fuera del control estadístico. Por lo que se recomienda la reconstrucción de los gráficos tanto para UFC bacterianas como para fúngicas

**Gráfico 30****X(media) recalculada****UFC bacterianas****(1- α)= 99.7% P=0.05932****Gráfico 31****X(media) recalculada****UFC fúngicas****(1- α)= 99.7% P=0.55431**

Los límites de control para esta estación de muestreo son 5 UFC para bacterianas y 4 UFC fúngicas.

Tabla N°4 Límites de control estadístico para las estaciones de muestreo 3 y 8.

Estación de Muestreo	Límites de Control	
	UFC bacterianas	UFC fúngicas
3	7	6
8	5	4

La Tabla N° 4 muestra los límites de control estadístico de la EM3 y EM4. En esta se manifiesta que la EM3 es superior en 2UFC bacterianas y en 2UFC fúngicas a la EM8.

Existe una causa que explica que en la EM3 den mayores los límites de control.

1. Esta da directamente al área de la meseta (área no aséptica) donde se preparan y sirven los medios de cultivo, al contrario de la EM8 que es antecedida por un área aséptica.

3.3 Análisis de los resultados de los muestreos microbiológicos en las cabinas de flujo laminar.

A continuación se muestra la figura 3 perteneciente a una de las cabinas de flujo laminar.



Figura 3

Cabina de flujo laminar

De un total de 66 muestreos microbiológicos realizados en presencia de la operaria un 53 % resultó igual a cero y un 47% resultó ser diferente de este valor.

Mientras que de 62 muestreos realizados sin la presencia de esta un 75 % resultó ser igual a cero para las UFC bacterianas ([Anexo 8](#)).

Se refirieron valores de 52,2 % igual cero y 47,8% diferentes de este valor para las UFC fúngicas cuando existió operaria en 66 muestreos realizados mientras que para los restantes 62 muestreos realizados sin operaria un 82% resultó ser igual a cero ([Anexo 9](#))

Los resultados tanto para UFC bacterianas como para UFC fúngicas fueron homogéneos pero cabría preguntar:

¿ Por que se dieron casos de muestreos en que sin operaria dieron UFC bacterianas y fúngicas?.

¿ Por que varían los porcentos en ambos casos si se supone que cuando se trabaja en cabinas de flujo laminar el número de UFC debería ser cero?

Situaciones como estas podrían estar dadas por el funcionamiento interno de estas, así como por sus puestos de trabajo y la manipulación de las operarias.

3.3.1 Influencia de las cabinas de flujo laminar en la contaminación microbiana.

El cálculo de varianza por rango según Kruskal-Wallis , para las tres cabinas de flujo laminar arrojaron que para las UFC bacterianas analizadas con operaria la cabina de flujo laminar 3 resultó ser significativamente diferente de las cabinas de flujo laminar 2 y 1, siendo estas últimas significativamente iguales, resultados similares se obtuvieron sin la presencia de las operaria. Al analizar las UFC fúngicas en presencia de operaria, entre las cabina de flujo laminar 3 no hubo diferencias significativas en comparación con la cabina de flujo laminar 1, mientras que estas si diferían significativamente de la cabina de flujo laminar 2 (Tabla N° 5)

Tabla N°5 Análisis de varianza por rango según Kruskal-Wallis (K.W) incluyendo la fase de iniciación.

Cabinas de flujo laminar	UFT bacterianas				UFC fúngicas			
	Con operaria		Sin operaria		Con operaria		Sin operaria	
	$\bar{X}$	Xr	$\bar{X}$	Xr	$\bar{X}$	Xr	$\bar{X}$	Xr
1	1,01	8,25 b	0,35	8,87 b	1,33	4,5 a	0,10	5,5 a
2	1,05	8,75 b	0,34	8,12 b	1,62	10,5 b	0,22	19,5 b
3	0,50	2,50 a	0,07	2,50 a	0,89	2,5 a	0,05	1,9 a
K.W		7.44		7,49		9,84		9,91

$\bar{X}$: x media

Xr : x rango

(a,b) Medias de rango con letras no comunes difieren a $p < 0,05$.

(a) menor contaminación .

De lo que se puede deducir que la influencia en las cabinas de flujo laminar fue la siguiente (en orden decreciente de contaminación microbiológica) $CFL_2 > CFL_1 > CFL_3$. Factores como la ubicación y funcionamiento de las cabinas de flujo laminar pueden explicar el orden referido, el cual se inclina hacia la cabina de flujo laminar 3 como la de menos contaminación.

Las cabinas de flujo laminar 3 y 2 fueron adquiridas en el año 1990 (modelo VECO, Mexicano) y seguidamente en el año 1996 fue adquirida la cabina de flujo laminar 1 (modelo VECO, Francés) por lo que se pudiera pensar que la influencia de éstas podrían estar dadas por su funcionamiento, lo desecha el hecho de que en los cálculos de varianza anteriormente realizados, la cabina de flujo laminar 1 (referida como la mas nueva) no difirió significativamente de la cabina de flujo laminar 2 para UFC bacterianas y tampoco lo hizo con respecto a la cabina de flujo laminar 3 (referida como una de las de mayor tiempo adquiridas) para UFC fúngicas .

Por lo que la ubicación de la cabina de flujo laminar puede ser el factor que explique tales resultados.

Las cabinas de flujo laminar 2 y 3 se encuentran en el mismo cuarto de siembra pero difieren en cuanto a su ubicación en este. La cabina de flujo laminar 2 está ubicada frente a la puerta de entrada de este cuarto, además se encuentra más cercana al aire acondicionado (doméstico) repercutiendo directamente en los resultados a la hora de contabilizar las UFC tanto bacterianas como fúngicas en este laminar.

Con respecto a la Cabina de Flujo Laminar 1, no es menos cierto, que hay menos tránsito de personal, (planta alta) pero el hecho es, que en el mismo cuarto de siembra donde se encuentra ésta, están también ubicadas algunos estantes, mesas, una centrifuga, además de un compresor de presión de aire acoplado al sistema de Inmersión Temporal, para que circule el medio de cultivo de un frasco a otro. Por lo que el área no queda restringida solo a las operarias que laboran en esta cabina de flujo laminar algo que si sucede con las cabinas de flujo laminar 2 y 3 donde hay un área específica para esto (cuarto de siembra N^o.2)

Tabla N^o6 Análisis de varianza por rango según Kruskal-Wallis (K.W) excluyendo la fase de iniciación.

Cabinas de flujo laminar	UFT bacterianas		UFC fúngicas	
	Con operaria			
	$\bar{X}$	Xr	$\bar{X}$	Xr
1	0,50	3,5 a	0,36	5,12 b
2	0,65	10,5 b	0,34	8,87 b
3	0,28	2,5 a	0,09	2,52 a
K.W		9,84		9,10

$\bar{X}$: x media Xr : x rango

(a,b,) Medias de rango con letras no comunes difieren a $p < 0,05$.

(a) menor contaminación .

En la Tabla N^o 6 se muestra el análisis de varianza según Kruskal-Wallis excluyendo el proceso de iniciación.

Donde se evidencia la diferencia significativa de las cabina de flujo laminar 2 con respecto a las cabinas de flujo laminar 1 y 3, resultados que difieren a los referidos en la Tabla N° 5 (en la cual se incluyo la iniciación).

Como se refirió en la Revisión Bibliográfica en el acápite 1.3.1 (pág.9), el tipo de explante influye en los microorganismos que pueden ser introducidos en el cultivo *in vitro*.

Carrazana (15) refiere que suele existir menos contaminación microbiana cuando se realiza la fase de iniciación en el cultivo del plátano, que cuando se realiza esta en los cultivos de Ñame y Malanga, Folgueras (32), siendo de vital importancia dado el hecho de que en la cabina de flujo laminar 1 se inicia con más frecuencia los cultivos de Malanga y Ñame mientras que en las cabinas de flujo laminar 2 y 3 es el plátano el que tiene prioridad para su iniciación.

El hecho de que en la Tabla N° 5 las cabinas de flujo laminar 1 y 2 difieran significativamente de la cabina de flujo laminar 3 y en la Tabla 6 la cabina de flujo de laminar 2 sea la que difiere de la 1 y 3 demuestra que:

- ✓ La cabina de flujo laminar 2 incluyendo o excluyendo el proceso de iniciación se comporta como la de mayor contaminación, aún cuando el cultivo que con más frecuencia inicia es el plátano.
- ✓ Para las cabinas de flujo laminar 1 y 3 la contaminación suele ser dependiente del proceso de iniciación, lo cuál es lógico, debido a las peculiaridades de iniciación de cada cabina, anteriormente expuestas.

3.3.2 Influencia del puesto de trabajo en cada laminar

En la Tabla N° 7 se muestra que para UFC bacterianas los únicos puestos que difieren significativamente tanto con operaria como sin operaria son las que pertenecen a las cabinas de flujo laminar 2.

Tabla N°7 Prueba no paramétrica de comparación de muestras independiente según Mann-Witney (U), incluyendo la fase de iniciación.

Cabina de Flujo Laminar	Estación de Muestreos	UFC Bacterianas					
		Con operaria			Sin operaria		
		$\bar{X}$	Xr	U	$\bar{X}$	Xr	U
1	4	0,89	12,10 ab	86,50	0,36	12,24 ab	82,5
	5	0,72	10,94 a		0,33	12,01 a	
2	9	0,27	14,56 a	91,00	0,53	24,24 b	95,00
	10	0,72	10,44 b		0,2	17,00 a	
3	11	1	12,24 a	88,5	0,05	10,24 ab	75,00
	12	1,07	13,33 ab		0,10	9,32 a	

$\bar{X}$: x media

Xr : x rango

(a,b,) Medias de rango con letras no comunes difieren a $p < 0,05$.

(a) menor contaminación .

Resultado similar se obtuvo en la Tabla N° 10 para las UFC fúngicas sin excluir el proceso de iniciación.

Tabla N°8 Prueba no paramétrica de comparación de muestras independientes según Mann-Witney (U), incluyendo iniciación

Cabina de Flujo Laminar	Estación de Muestreos	UFC Fúngicas					
		Con operaria			Sin operaria		
		$\bar{X}$	Xr	U	$\bar{X}$	Xr	U
1	4	0,59	4,8 a	73,00	0,62	4,83 a	74,00
	5	1,20	6,20 ab		1,10	5,30 ab	
2	9	0,27	3,60 a	92,00	0,50	6,52 a	76,00
	10	3,24	16,20 b		3,79	3,84 b	
3	11	0,10	1,2 a	76,00	0,25	1,2 a	68,00
	12	0,22	2,62 ab		0,50	2,90 ab	

$\bar{X}$: x media

Xr : x rango

(a,b,) Medias de rango con letras no comunes difieren a $p < 0,05$.

(a) menor contaminación .

De igual manera sucede cuando se excluye la iniciación, los resultados siguen dando significativamente diferentes en la cabina de flujo laminar 2 (Tabla N° 9).

Tabla N°9 Prueba no paramétrica de Comparación de muestras independiente según Mann-Witney (U), excluyendo iniciación.

Cabina de Flujo Laminar	Estación de Muestreo	UFC Bacterianas			UFC Fúngicas		
		$\bar{X}$	Xr	U	$\bar{X}$	Xr	U
1	4	0,45	3,01 a	78,00	0,46	3,10 ab	76,00
	5	0,54	3,92 ab		0,39	2,82 a	
2	9	0,10	10,24 a	91,00	0,38	14,0 a	93,5
	10	1,50	12,72 b		1,36	18,52 b	
3	11	0,20	1,01 a	86,50	0,06	6,24 a	82,5
	12	0,90	2,24 ab		0,12	6,70 b	

$\bar{X}$: x media

Xr : x rango

(a,b,) Medias de rango con letras no comunes difieren a $p < 0,05$.

(a) menor contaminación .

Resultando la estación de muestreo 9 (puesto izquierdo de la cabina de flujo laminar 2 el de más contaminación lo que puede estar debido a su cercanía a la puerta de entrada del área .

Los resultados obtenidos en las tablas anteriores excluyendo e incluyendo la iniciación no muestra indicios de que la contaminación pueda ser dependiente de esta , ya que en todos los casos dieron valores similares.

3.3.3 Influencia de la Operaria

La Tabla N° 10 refleja que de las operarias 5 y 8 (a las que se le adjudica la menor contaminación) no difieren las operarias 2 y 3 mientras que si difieren significativamente de ellas (5 y 8), las operarias 1, 4, 6 y la 7 para las unidades

formadores de colonias bacterianas y fúngicas. Refiriéndose además a la operaria 4 como la que mayor contaminación introduce.

Tabla N°10 Análisis de varianza por rango según Kruskal-Wallis (K.W) incluyendo la fase de iniciación.

Operaria	UFC Bacterias		UFC Fúngicas	
	$\bar{X}$	Xr	$\bar{X}$	Xr
1	2,6	7,14 dc	2,3	7,03 ab
2	1,27	3,86 cba	0,95	2,95 cba
3	1,08	3,42 ba	2,80	2,86 ba
4	3,18	8,41 d	3,22	8,50 d
5	0,08	1,26 a	0,27	1,30 a
6	2,46	6,76 dcb	2,02	5,22 dcb
7	2,60	6,82 dcb	2,12	5,64 dcb
8	0,02	1,10 a	0,95	1,14 a
KW		8,20		7,32

$\bar{X}$: x media

Xr : x rango

(a,b,c,d) Medias de rango con letras no comunes difieren a $p < 0,05$.

(a) menor contaminación .

(d) mayor contaminación.

La Tabla N° 11 arrojó que de las operarias 5 y 8 (a las que se le adjudicó nuevamente la menor contaminación microbiana) no difieren de ellas las operarias 6 y 7, mientras que las operarias 1, 2 , 3 y 4 difieren significativamente de estas. Volviendo a incidir la operaria 4 como la de mayor contaminación.

Tabla N°11 Análisis de varianza por rango según Kruskal-Wallis (K.W) excluyendo Iniciación

Operaria	UFC Bacterias		UFC Fúngicas	
	$\bar{X}$	Xr	$\bar{X}$	Xr
1	1,33	6,5 b	0,56	4,8 b
2	3,10	8,5 bc	1,20	6,20 bc
3	3,08	8,02 bc	1,12	6,06 bc
4	4,20	10,50 c	3,24	8,60 c
5	0,27	2,5 a	0,10	1,2 a
6	0,62	4,5 ab	0,27	3,6 ab
7	0,62	4,62 ab	0,32	4,20 b
8	0,35	3,5 a	0,22	2,62 a
KW		9,71		6,20

$\bar{X}$: x media

Xr : x rango

(a,b,c) Medias de rango con letras no comunes difieren a $p < 0,05$.

(a) menor contaminación .

(b) mayor contaminación.

Resulta curioso el hecho de que en la Tabla N° 10 las operarias 1 y 2 (las cuales realizan el proceso de iniciación en el mismo cultivo), difieran significativamente siendo la operaria 2 la que no refiere diferencia significativas con respecto a la 5 y 8 (operarias de menor contaminación) y sin embargo en la Tabla N° 11 no difieren significativamente de lo que se puede interpretar que la operaria 2 realiza mas eficientemente el proceso de iniciación que la operaria 1, mientras que multiplicando no difieren significativamente por lo que la contaminación en este caso suele ser dependiente de la operaria para el proceso de la iniciación.

Leifert y colaboradores (6), plantean que la presencia de contaminantes bacterianos, particularmente cuando no están asociados uniformemente a una línea de planta *in vitro* original a partir del mismo explante y cuando los coeficientes de contaminación durante el subcultivo difieren marcadamente, puede deberse a fallas de las técnicas

asépticas. Se ha determinado que varias especies son habitantes normales de la piel y otros tejidos humanos, de hecho el entrenamiento riguroso de las operarias en métodos microbiológicos ha logrado reducir la contaminación a niveles menores del 1 %.

Ante la interrogante de cómo los contaminantes fúngicos del aire pueden penetrar en los frascos de cultivo durante la preparación del medio de cultivo o el subcultivo de explantes *in vitro*, encontrándose en cabinas de flujo laminar donde el aire exterior es excluido y se asume que proveen un ambiente de trabajo estéril, Danby *et al* (13) sugieren tres posibilidades:

1. Los contaminantes pueden ser introducidos si las operarias trabajan demasiado cerca del borde de la cabina del flujo laminar.
2. En la mayoría de los laboratorios los frascos de cultivo tienen depósitos visibles de polvo sobre las tapas y en su superficie, habiéndose aislado de los mismos poblaciones de hongos y levaduras similares a los encontrados en el aire del laboratorio.
3. Las esporas de hongos que permanecen en la superficie de los frascos de cultivo pueden germinar en la película de agua de condensación y crecer activamente dentro del frasco de cultivo.

Aparte de estos mecanismos otros autores refieren que el uso de cabinas de flujo laminar defectuosas debe adicionarse a la fuente de entrada de hongos a los cultivos de tejido vegetales proveniente del medio ambiente (9,17).

Conclusiones

1. La Metodología Modificada para la realización de muestreos microbiológicos ambientales es ejecutable obteniéndose resultados confiables y fáciles de contabilizar.
2. Las gráficas de Control permiten determinar los límites de Control de UFC bacterianas y fúngicas para las estaciones de muestreos preestablecidas.
3. Existe influencia en los resultados de los muestreos microbiológicos ambientales de la ubicación de las cabinas de flujo laminar, así como de las operarias, en este último caso depende tanto del material vegetal que estas inicien como cuando no se realiza el proceso de iniciación.

Recomendaciones Generales

- ✓ Proponer la metodología modificada para la realización de muestreos microbiológicos ambientales en un Laboratorio de Biotecnología Vegetal al Grupo Nacional de Biotecnología para su valoración, con el objetivo de incluirla en la próxima edición del Sistema de Control de la Calidad.
- ✓ Aumentar el número de muestreos microbiológicos ambientales en las estaciones de muestreo preestablecidas durante un año, de modo que puedan incluirse datos correspondientes a las épocas de sequía y lluvia.

Recomendaciones Específicas

- ✓ Eliminar la cortina en el cuarto de cultivo N°1 si se desea disminuir la incidencia de luz solar, se sugiere pintar el vidrio por el área externa.
- ✓ Confeccionar fundas de gasa para los aires acondicionados domésticos, las cuales deben ser lavadas y esterilizadas sistemáticamente.
- ✓ Colocar juntas de goma en la parte inferior de las puertas de acceso a áreas asépticas.
- ✓ Valorar la realización de modificaciones arquitectónicas en la planta alta, de modo tal que se independicen 2 cámaras de crecimiento un cuarto de siembra y un área intermedia entre la no aséptica y aséptica.
- ✓ Trasladar el compresor acoplado al equipo de Inmersión Temporal, ubicado en el cuarto de Siembra N°1 a la habitación C, lo cual implicaría realizar la dosificación de medio de cultivo en un área aséptica.

Bibliografía

1. Alvarado Y., 1997. Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. Conf. Curso Cubano Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Santa Clara, Cuba.
2. Alvarado Y., 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En : Programación y mejora genética de las plantas por Biotecnología (IBP). Vol 1.—p.81-96
3. Alvarado Y., N. Portal, L. García, Y. Martínez, M. Freire, E. Quiala, T. Pichardo, I. Herrera, 2001. Control de la contaminación bacteriana en la semilla artificial de la caña de azúcar a través de detección temprana. Ed: Instituto de Biotecnología de las plantas Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Vol 1,nº1, enero – abril –pp.57-59.
4. Alvarado Y., Acosta M., y A. Flores, 1999. Contaminantes fungosos en la micropropagación de las plantas con el uso de esterilización química de los medios de cultivo. Libro de Reportes Cortos 5^{to} Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las plantas (IBP).Santa Clara, Villa Clara. —pp. 239-240.
5. Alvarado Y., 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En Programación genética de las plantas por Biotecnología (IBP).Vol 1. — pp. 81-96.
6. Alvarado Y., L. Herrera y L. García., 1993. “Estudio preliminar sobre la contaminación microbiana en la biofábrica de Villa Clara”. En: Resúmenes Tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las plantas, 20-22 de Junio. Santa Clara, Cuba,

7. Anderson W. C., 1996. Cost of broccoli plants propagation by *in vitro* culture. Hort Science, 14: 23-25.
8. Barret C. y A. Cassells, 1994. An evaluation of antibiotics for elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *Pelagonii* (Brown) from *Pelargonium x domestic* av. <<Gram Slam>> explants *in vitro*. Plant. Cell Tissue and Organ Culture 36: 169-179.
9. Beattie G.A. y S.E.Lindow, 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 145-172.
10. Boxus P.H, and Terzi, J.M., 1987. Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation Schemes. Acta hort.212: 91-93.
11. Boxus P.H. y J.M. Terzi., 1988. "Control of accidental contamination during mass propagation." Acta Horticulturae 255: 189 -191.
12. Burge H.A.; Muilenberg, M.L. and Chapman, J.A., 1991. Crop plants as source of fungus spores of medical importance in: Microbial Ecology of leaves. Pp. 222 – 236. Andrews, J.H. and Mirano, S.S., Eds., Springer-Verlag, Berlin.
13. Carrazana D.2006 VII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Santa Clara. Cuba. Control de la calidad empleando muestreos microbiológicos en las Biofábricas de Cuba.
14. Carrazana D.2006. D.2006 VII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Santa Clara. Cuba . *Bacillus Suptlys la contaminación bacteriana en la micropropagacion de Mussa spp.*
15. Calidad total <<http://www.gestiopolis.com/index.htm>

16. Cassells A.C., 1991. "Problems in Tissue culture: Culture contamination." En: Debergh P. Zimmerman RH (Eds) Micropropagation: Technology and application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. --pp. 31-44.
17. Cassells A.C., y V. Tahmatsidou, 1986. The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hidrangea* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47:15-26.
18. Conceptos generales de calidad total <http://www.monografias.com/cgi-bin/search.cgi>
19. Control de la calidad Luis M. Molinero (Alce Ingeniería) nov 2003 <http://www.seh-lelha.org/calidad.htm>.
20. Control estadístico de la Calidad, Medicina del Trabajo, Higiene y Seguridad Industrial.
<http://www.google.com/search?q=cache:rs5ysC91bhUJ:server2.southlink.com.ar/vap/control%2520estadistico.htm+%22control+de+la+calidad%22&hl=es>
21. Cornu D. y M.F. Michel, 1987. Bacteria contaminants in shoot cultures of *Prunus avium* L. Choice and phytotoxicity of antibiotic. *Acta Horticulturae* 212: 413-486.
22. Cubana ISO 8258: 2002 (Publicada por la ISO, 1991).
23. Cubana ISO 7870: 2002 (Publicada por la ISO, 1993).
24. Danby S., Epton, H.A.S.; Sigee, D. and Leifert, C., 1994a. Fungal contaminants of primula, Coffea, Musa and iris tissue cultures. In: Physiology. Growth and Development of plants in culture. pp. 379-385. Lumsdem, P.J.; Nicholas, J.R.; and Davies, B.J, Eds.; Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, Holland.

-
25. Danby S., S.P. Hampson, S.E Joshi, D.C. Sigee, H.A.S. Epton y C. Leifert, 1994 a .Activity of antibiotic produced by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* against common fungal contaminants of plants tissue culture. En: Physiology Growth and development of plant in culture... Holland: Kluwer Academic Publishers.—pp.404-408.
26. Deum K.N., Le Mercier y P.H. Boxus, 1988. Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* culture of fiel collected coffee and cacao germplasm. Acta Horticulturae 225: 57-65.
27. Dickinson C.H., and Prece, T.F 1976. Microbiology of aerial plant surfaces Academic Press. London, U.K.
28. Enjalric Y., M.P. Carron y L. Lardet. 1988 "Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*." Acta Horticulturae. 255: 57-65.
29. FAO. 1993 "Herramientas para la comunidad ". Manual de campo N° 2. Roma.
30. Fernández E. 2004. La calidad y la cultura de la calidad. Desarrollo y evolución histórica En: Normalización No. 1 :3 -6
31. Fisse J., A. Batlle, y J. Pera., 1987 "Endogenous bacteria elimination in ornamental explants." Acta Horticulturae 212: 87-90.
32. Folgueras M. 2000. La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales. Tesis presentada en opción al Titulo académico de Magister Scientie..
33. Geilfus, Frans "80 herramientas para el desarrollo participativo" IICA-PROCHALTE. San Salvador, 1997.

-
34. George E.F., 1993. "Controlling persistent contaminant in Plants." En: Plant. Propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1, 2nd Ed. Exergetics Ltd. --pp. 130-143.
35. George E.F., y P.D. Sherrington, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exergetics Ltd., Eversley, Basingstoke.
36. Grupo Nacional de Biotecnología de la Empresa de Semillas perteneciente al Ministerio de la Agricultura 2004. Sistema de Control de Calidad para la Micropropagación *in vitro* de plátanos y bananos. No. 3 julio- Septiembre .
37. Herrera I. 2001. Los hongos contaminantes en la micropropagación de raíces y tubérculos tropicales en Cuba. Centro Agrícola No. 3 julio- Septiembre .
38. Hirano S.S. y C.D. Upper, 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 21: 243-269.
39. Kneifel W. y W. Leonhardt, 1992. Testing of different antibiotic against Gram negative bacteria isolated from plant tissue culture. 29:139-144.
40. Leifert C. y S. Woodward, 1998. Laboratory contamination management: The requirement for microbiological quality assurance. Plant Cell Tissue and Organ culture. 52: 83-88.
41. Leifert C. y W.M. Waites., 1993. "Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points". En: Physiology, Growth and Development of Plant in culture. --- Dordrecht, Holland: Kluwer Academic Publishers. --pp. 278-283.
42. Leifert C., B. Waites, J.W. Keetley, S.M. Wright, J.R. Nicholas y W.M. Waites, 1994.. "Effect of medium modification on filamentous fungi, yeasts and bacterial

- contaminants in Delphinium tissue cultures. Plant Cell. Tissue and Organ Culture.” 36: 149-155.
43. Leifert C., C.E. Morris y W.M. Waites., 1994 a.”| Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences”.13: 139 – 183.
44. Leifert C., Ritchie, W.M. Waites., 1991. “Contaminants of plants in tissue and cell culture”. Word Journal of Microbiology and Biotechnology. 7: 452-469.
45. Leifert C., Waites, W.M.; Nicholas, I.R. and Keetley, J.W., 1990. Yeast contaminants of micropropagated plant culture. J. Appl. Bacteriol. 69: 471–476.
46. Los Gráficos de Control de Shewart Salamanca España 2002
<http://apuntes.rincondelvago.com/graficos-de-control-de-shewart.html>
47. Peña Pablo L.; Acosta, Edgar, Barranco, Luis A, 2002.”Establecimiento y multiplicación *in vitro* en la micropropagación de la Guana (Hildegardia CubensisURB)
<http://www.bioplantascu/bioinformatica/Proceedings/INCA%20XIII/ponencias/talleres/taller04/resumen4c/BV-E.7.pdf>
48. Pérez Ponce, J.N., 2000. Revista del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. Ed: Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, nº1. —pp. 5-9.
49. Pye J., K. Euercert y P. Devergh, 1996. Contamination by micro-arthropods in tissue culture. En: Cassells, A.C. y B. Hayes (Eds), Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria Contaminants of Plants Tissue Culture. University College, Cork.—pp.21.

-
50. Reed B.M. y P. Tanprasert, 1995. Detection and control of bacteria contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature .Plant Tissue Cultures and Biotechnology, 137-142.
51. Reyner Pérez Campdesuñer y Otros Autores Holguín Cuba 2003 : Metodología para el diseño de un sistema de inspección <http://www.ilustrados.com/ilustrados.html>
52. Roca W. y L.A. Mogrinski, 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Coli. Colombia: Ed: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
53. Skinner F.S., Passmaore, S.M. and Davenport, R.R., 1980, Biology and activities of yeasts. Academic Press. London , U.K
54. Smith J.M; Duness, J.; R.A.; Phillips, D.M. and Archer, S.A; 1986. European Handbook of plant diseases. ALCKWELL Scientific publications, oxford, U.K
55. Stead D.E., J. Hennessy, J. Wilson., 1998. "Modern methods for identifying bacteria" Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 17-25.
56. Triana R., 2000. Introducción de una nueva metodología para la esterilización de los medios de cultivo. Tesis presentada en opción al Título académico de Magister Scientie en Biotecnología Vegetal.
57. Weller R., 1997. Microbial communities on human tissues; an important source of contaminant in plant tissues cultures. En: Cassells A.C. (Eds). Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Kluwer Academic Publishers Dordrecht.—pp. 245-257

58. Wildholm J.M., 1996. The rare occurrence of plant tissue culture contamination by *Methylobacterium mesophilicum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 45: 201-205.

Anexos

Anexo 1

Tabla de fórmulas de los límites de control para gráficos de control por variables de Shewhart.

Estadístico	No se dan valores estándares		Se dan valores estándares	
	Línea central	LIC y LSC	Línea central	LIC y LSC
$\bar{X}$	$\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{X}} \pm A_2 \bar{R} \text{ o } \bar{\bar{X}} \pm A_2 \bar{s}$	$X_0 \text{ ó } \mu$	$X_0 \pm A\sigma_0$
R	$\bar{R}$	$D_3 \bar{R}, D_4 \bar{R}$	$R_0 \text{ ó } d_2\sigma_0$	$D_1\sigma_0, D_2\sigma_0$
s	$\bar{s}$	$B_3 \bar{s}, B_4 \bar{s}$	$s_0 \text{ ó } c_4\sigma_0$	$B_5\sigma_0, B_6\sigma_0$

NOTA: X_0, R_0, s_0, μ y σ_0 son valores estándares dados.

Anexo 2

Tabla de factores para límites de control en gráficos de medias y rangos

	Gráfico de medias	Gráfico de Rangos	
Tamaño de muestra n	Factor A_2	Factor D_3	Factor D_4
2	1.88	0	3.27
3	1.02	0	2.57
4	0.73	0	2.28
5	0.58	0	2.11
6	0.48	0	2.00
7	0.42	0.08	1.92
8	0.37	0.14	1.86
9	0.34	0.18	1.82
10	0.31	0.22	1.78



Leyenda:

- | | |
|---|---|
| A: Recibidor. | K: Baño de mujeres. |
| B: Cuarto de preparación de las operarias. | L: Área de preparación de medios |
| C: Cuarto de dosificación. | M: Cuarto zaranda. |
| D: Cuarto de cultivo 1. | N: Área de lavado de manos. |
| E: Cuarto de siembra 1. | Ñ: Cuarto de siembra 2. |
| F: Cuarto de material sin uso. | O: Cuarto de siembra 3. |
| G: Lobby del laboratorio. | P: Pasillo. |
| H: Área de esterilización. | Q: Cuarto de cultivo grande. |
| J: Baño de hombres. | R: Área de fregado. |
| I: Cuarto de paso entre cuarto de cultivo. | |

— Paredes

 Aires acondicionados

⊥ ⊥ Puertas

 Ubicación del material contaminado

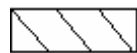
 Ventanas

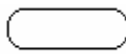
 Ubicación del material limpio

 Laminares

 Estufas

 Zaranda

 Mesetas

 Mesetas fregaderos

|| Refrigerador

 Mesas

 Mesa de colocar medio elaborado

 Autoclaves

 Estantes

 Cámara donde se guardan uniformes.

 Escalera

 Cámara de artículos personales de las operarias.

Anexo 4

Muestreo #				Fecha:			
Pto	Condiciones	Hongos (UCF)		$\bar{X}$	Bacterias (UFC)		$\bar{X}$
		Rep1	Rep2		Rep1	Rep2	
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
7.							
8.							
9.							
10.							
11.							
12.							
13.							
14.							
15.							
16.							
17.							
18.							
19.							
20.							
21.							
22.							
23.							
24.							
25.							
26.							
27.							
28.							
29.							
30.							

*Anexo 5***Número de UFC bacterianas obtenidas en los estantes**

Muestreos	Valores medios					
	Planta alta				Planta baja	
	EM1	EM2	EM6	EM7	EM13	EM14
1	2,5	4,5	0	0,5	0,5	0,5
2	0	0,5	0	0,5	0,5	0,5
3	1,5	2	0,5	2,5	2	1
4	1	0	5	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6	1	0	2,5	0	0	0
7	0	0,5	1	0,5	0,5	1
8	4,5	2	5	2	2	3
9	2,5	3	3	3	3	0,5
10	2,5	0	0	0	0	0,5
11	2	0	0,5	0	0	0,5
12	2,5	0	0,5	0	0	1,5
13	0	1	2,5	2	1	1
14	0	1	1,5	1	1	4,5
15	0	0	2	2,5	0	0
16	2,5	1	1,5	1	1	0
17	5	0,5	0	3,5	0,5	2
18	0	5,5	0	0,5	5	2,5
19	2	1,5	0	0	1,5	2
20	1,5	0	0,5	0,5	0	4,5
21	1	0	0,5	0	0	1
22	0	0	1	0	0	1
23	1,5	0	0	0,5	0	0
24	1,5	0	2	0	0	0
25	2	0	0	1	0	0

Anexo 6

Número de UFC fúngicas obtenidas en los estantes

Muestreos	Valores medios					
	Planta alta				Planta baja	
	EM1	EM2	EM6	EM7	EM13	EM14
1	3,5	4,5	0	0,5	0,5	4,5
2	0	0,5	1	0,5	0,5	0,5
3	0	1	0	2,5	2	1
4	0	0	4,5	0	0	0
5	1	0	0,5	0	0	0
6	1	0	1	0	0	0
7	0	0,5	1,5	0,5	1	1
8	3	0,5	1,5	2	2,5	3
9	0	3,5	2,5	3	3	0,5
10	2,5	0,5	0	0	0	0,5
11	3	0,5	0	0	0	0,5
12	2,5	1,5	0,5	0	0	1,5
13	0	1	0	2	1	1
14	0	4,5	1	1	1	4,5
15	0	0	0	2,5	0	0
16	2	0	0,5	1	1	0
17	2,5	2	0,5	3,5	0,5	2
18	0	4,5	0	0,5	4	2,5
19	2	2	1	0	1,5	2
20	1,5	2,5	0	0,5	0	4,5
21	1	1	0,5	0	0	1
22	0,5	1	1	0	0	1
23	0,5	0	0	0,5	0	0
24	2	0	2,5	0	0	0
25	2	0	1	1	0,5	0

Anexo 7

Número de UFC bacterianas y fúngicas obtenidas en los pisos.

Muestreos	Valores Medios			
	EM3		EM8	
	UFC Bacterianas	UFC Fúngicas	UFC Bacterianas	UFC Fúngicas.
1	5.5	5.5	2,5	2,5
2	5.5	5.5	0	0
3	6.5	5.5	1	1
4	6.5	7	1	1
5	6	5.5	0	0
6	2	3	1	1
7	3.5	4	0	0
8	4.5	4.5	4,5	4,5
9	5.5	5.5	2,5	2,5
10	5.5	5.5	3	3
11	4.5	4.5	2	2
12	5	5	2,5	2,5
13	5.5	5.5	0	0
14	5	5.5	0	0
15	2	3	3	0
16	15	16	3,5	2,5
17	5.5	5.5	5	5
18	4.5	4.5	0	0
19	16	17	0,5	0,5
20	4.5	4.5	1,5	1,5
21	5	5	1	1
22	4.5	4.5	0	0
23	4.5	4.5	1,5	1,5
24	4.5	4.5	1,5	1,5
25	5.5	5	2	2

Anexo 8

Número de UFC bacterianas obtenidas en las cabinas de flujo laminar.

Muestreo	Valores Medios					
	Laminar N ^o . 1		Laminar N ^o . 2		Laminar N ^o . 3	
	EM ₅	EM ₆	EM ₁₀	EM ₁₁	EM ₁₂	EM ₁₃
1	0,5(c.o)	0,5(c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
2	0 (c.o)	0 (c.o)	1,5 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0,5 (c.o)
3	0,5(c.o)	0,5(c.o)	0 (s.o)	2 (c.o)	0 (c.o)	1 (c.o)
4	0 (s.o)	0 (s.o)	No funcionando		0 (c.o)	0 (s.o)
5	0 (c.o)	1,5 (s.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)
6	0 (s.o)	0 (s.o)	0,5(s.o)	0 (c.o)	No funcionando	
7	0,5(c.o)	0 (c.o)	Falta de Fluido Eléctrico			
8	3 (c.o)	1 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (s.o)
9	0 (c.o)	1 (c.o)	2 (s.o)	0 (s.o)	0 (c.o)	0 (s.o)
10	0,5 (s.o)	6 (c.o)	0,5(c.o)	0 (s.o)	No funcionando	
11	0 (s.o)	0 (s.o)	Falta de Fluido Eléctrico			
12	0,5(c.o)	0,5(c.o)	0,5(s.o)	0 (s.o)	0,5(s.o)	0 (s.o)
13	1 (c.o)	1,5 (c.o)	1 (s.o)	1,5 (c.o)	0,5(s.o)	1 (c.o)
14	0 (s.o)	0 (s.o)	3,5 (c.o)	2,5 (c.o)	0 (s.o)	0,5(c.o)
15	2 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
16	1,5 (s.o)	1,5 (s.o)	3 (c.o)	1,5 (c.o)	2,5 (c.o)	2 (c.o)
17	4 (c.o)	3 (c.o)	0 (s.o)	3,5 (c.o)	0,5(s.o)	0 (s.o)
18	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	1 (c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
19	0,5(c.o)	0,5(c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
20	0 (c.o)	0 (c.o)	1,5 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0,5 (c.o)
21	0,5 (c.o)	0,5(c.o)	0 (s.o)	2 (c.o)	0 (c.o)	1 (c.o)
22	0 (s.o)	0 (s.o)	Falta de Fluido Eléctrico			
23	No funcionando		0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)
24	0 (s.o)	0 (s.o)	0,5(s.o)	0 (c.o)	No funcionando	
25	1,5 (c.o)	1 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (s.o)
c.o- Con Operaria			s.o- Sin Operaria			

Anexo 9

Número de UFC fúngicas obtenidas en las cabinas de flujo laminar.

Muestreo	Valores Medios					
	Laminar N ^o . 1		Laminar N ^o . 2		Laminar N ^o . 3	
	EM ₅	EM ₆	EM ₁₀	EM ₁₁	EM ₁₂	EM ₁₃
1	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
2	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (s.o)	0,5 (s.o)	0,5 (s.o)	0 (c.o)
3	0 (c.o)	0 (c.o)	0,5 (s.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0,5 (c.o)
4	0 (s.o)	0 (s.o)	No funcionando		0 (c.o)	0 (s.o)
5	0 (c.o)	0 (s.o)	0,5 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)
6	0,5 (s.o)	1,5 (s.o)	0 (s.o)	0,5 (c.o)	No funcionando	
7	0,5 (c.o)	0 (c.o)	Falta de Fluido Eléctrico			
8	3 (c.o)	5 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (s.o)
9	0 (c.o)	0 (c.o)	0,5 (s.o)	0 (s.o)	0 (c.o)	0 (s.o)
10	0 (s.o)	4 (c.o)	0,5 (c.o)	1,5 (s.o)	No funcionando	
11	0 (s.o)	0 (s.o)	Falta de Fluido Eléctrico			
12	1,5 (c.o)	1,5 (c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
13	0,5 (c.o)	0 (c.o)	0 (s.o)	0,5 (c.o)	0 (s.o)	0 (c.o)
14	0 (s.o)	0 (s.o)	5 (c.o)	1 (c.o)	0 (s.o)	0 (c.o)
15	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0,5 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
16	0 (s.o)	0 (s.o)	9,5 (c.o)	11 (c.o)	7 (c.o)	15,5 (c.o)
17	0,5 (c.o)	3 (c.o)	0 (s.o)	1,5 (c.o)	0 (s.o)	0,5 (s.o)
18	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	1 (c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
19	1 (c.o)	0,5(c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
20	0,5 (c.o)	0,5 (c.o)	0 (s.o)	0,5 (s.o)	0,5 (c.o)	0 (c.o)
21	0,5 (c.o)	1 (c.o)	0,5 (s.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0,5 (c.o)
22	0 (s.o)	0 (s.o)	Falta de Fluido Eléctrico			
23	No funcionando		0,5 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)
24	0 (s.o)	0 (s.o)	0,5(s.o)	1 (c.o)	No funcionando	
25	1,5 (c.o)	1,5 (c.o)	0 (c.o)	0 (c.o)	0 (s.o)	0 (s.o)
c.o- Con Operaria			s.o- Sin Operaria			