

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas
Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica y Agrícola



**DISEÑO, CONSTRUCCION, INSTALACION Y FUNCIONAMIENTO DE UNA
CAMARA DE FLUJO LAMINAR PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS
EN EL FUNDO “LA BANDA” HUASACACHE DE LA UNIVERSIDAD CATOLICA
DE SANTA MARIA. 2018**

Tesis presentada por las Bachilleres:

Zúñiga Díaz, Alejandra

Delgado Salinas, Alejandra

Para optar el Título Profesional de

Ingeniera Agrónoma

Asesor: Mg. Torres Lizárraga, José

AREQUIPA – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
URB. SAN JOSE S/N - UMACOLLO

DICTAMEN DE PROYECTO DE TESIS
(Jurado)

Señor
Ing. JORGE ZEGARRA FLORES
Director del P.P. de Ingeniería Agronómica
Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted., que se ha procedido a revisar el BORRADOR de Tesis titulado:

“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN E INSTALACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE UNA CAMARA DE FLUJO LAMINAR PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS EN EL FUNDO LA BANDA- HUASACACHE DE LA UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA 2018”

Presentado por las alumnas: **ALEJANDRA DELGADO SALINAS**
ALEJANDRA ZUÑIGA DIAZ

Asesor: **Ing. JOSE TORRES LIZARRAGA**

El jurado Dictaminador presidido por **Ing. Jorge Zegarra Flores; Ing. Humberto Stretz Chavez, Ing. Froy Coloma Dongo.**

DICTAMINAN


Procede su sustentación.

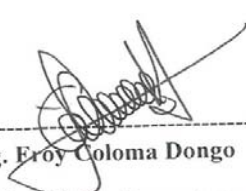
OBSERVACIONES

Sim observaciones

Arequipa, 12 de Noviembre de 2018


Ing. Jorge Zegarra Flores


Ing. Humberto Stretz Chavez


Ing. Froy Coloma Dongo

 (5154) 382038

 (5154) 252542

 ucsm@ucsm.edu.pe

 <http://www.ucsm.edu.pe>

0004830

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi familia que indirectamente se tuvo que dividir en este largo periodo universitario, con el fin de cumplir esta meta.

A mis padres Sandro y Mely quienes me forjaron como la persona que soy en la actualidad, por su apoyo, comprensión y motivación, pues sin escatimar esfuerzo alguno dieron todo de si para ayudarme a lograr hoy en día estas dos metas: una por obtener mi carrera profesional y otra el hacerlos sentir orgullosos de esta persona que tanto los ama. A mi padre por esos consejos tan precisos, únicos, alentándome siempre a ser mejor persona, cumpliendo mis sueños y metas, sobre todo siempre observando mis pasos a pesar de la distancia. A mi madre por sacrificarse muchas veces en distintas circunstancias, protegerme sin importar cuantos años pasen, amarme y siempre queriendo lo mejor para mí.

Gracias papitos por ayudarme a cruzar con firmeza el camino de la superación, haciendo este título más suyo que mío, para ustedes esta dedicatoria, con amor y respeto infinito.

A mi hermana María Belén que con su fuerza, carácter, coraje y motivación me sirvió de sostén cuando el miedo me superaba.

Gracias.

Alejandra D.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome, fortaleciendo mi corazón y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía.

A mis padres, Lizandro y Cesilia por estar siempre a mi lado cuando más los necesito, por formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, por mostrarme en cada momento su apoyo incondicional y el interés para que me desarrolle completamente en todos los aspectos de mi vida, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Esto es por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí Depositando su entera confianza en cada reto que se me presenta. Es por ello que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

A mi hermano Mathías por estar siempre a mi lado dándome tu apoyo y tu cariño.

Te amo

Para ustedes.

Alejandra Z.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por permitirnos poder disfrutar de este momento, habernos acompañado y guiado a lo largo de nuestra carrera, por ser nuestra fortaleza en nuestros momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Son muchas personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. Queremos agradecer a nuestros padres por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido un orgullo y privilegio de ser sus hijas, los amamos.

A nuestros hermanos por estar siempre presentes acompañándonos y apoyándonos a lo largo de esta etapa de nuestras vidas, los queremos.

A nuestra familia, por su cariño y apoyo incondicional, son los mejores.

A nuestros amigos, por todos esos momentos que pasamos juntos, por haber hecho de nuestra etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaremos.

Agradecer a nuestros docentes por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión y por su amistad.

Al asesor de nuestro proyecto de investigación Ingeniero José Torres Lizárraga, gracias por su apoyo y paciencia incondicional.

Alejandra´s

INTRODUCCION

La microbiología, se define como la ciencia que estudia los seres microscópicos (celulares y sub celulares), principalmente aquellos que se encuentran por debajo del poder de resolución del ojo humano. La microbiología a finales del siglo XIV progresa, cuando se da un desarrollo mediante las técnicas básicas para la obtención, manipulación y reconocimiento de microorganismos, que se aplica, ya sea en su concepción original o con modificaciones. Estos avances, estuvieron dirigidos por algunos científicos que trataban entender la teoría de la generación espontánea y a la resolución de las causas de las enfermedades contagiosas, (Rojas, 2011).

En los 150 años siguientes, el progreso de la microbiología se limitó casi exclusivamente a la descripción morfológica y taxonómica de los microorganismos, así como, al establecimiento de sus relaciones con los reinos animal y vegetal. Posteriormente, con el mejoramiento de las técnicas de microscopia, esterilización, purificación, cultivos *in vitro* y al reconocimiento del origen microbiano de las fermentaciones, se abre paso a los grandes avances de la microbiología como ciencia. Aquí juega un papel importante el empleo de las cámaras o cabinas de flujo laminar, (Rojas, 2011).

Las cámaras o cabinas de seguridad biológica, son equipos que proporcionan una barrera de contención para trabajar de forma segura y en condiciones de esterilidad. Son equipos diseñados para mantener un área libre de partículas o de probables contaminantes denominada zona de trabajo. La protección se logra mediante la combinación de elementos electromecánicos/electrónicos (motor, ventilador, filtro, conductos, iluminación, etc.) y procesos físicos (flujo laminar, diferencias de presiones, etc), que impulsan el aire a través de unos filtros especiales de gran superficie (filtros HEPA) estratégicamente situados que poseen una eficiencia mínima de retención de partículas del 99.99%. (Rojas, 2011).

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo bajo condiciones del Laboratorio de Semillas de la Escuela de Ingeniería Agronómica y Agrícola de la Universidad Católica de Santa María en el fundo La Banda Huasacache, Distrito Hunter, Provincia y Región Arequipa. El laboratorio actualmente se encuentra en proceso de implementación. El objetivo del presente estudio fue Diseñar, construir, instalar y poner en funcionamiento una cámara de flujo laminar con el aislamiento de hongos *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Hemileia vastatrix* y *Puccinia allii*, Establecer costo/beneficio de la construcción de una cámara de flujo laminar horizontal en comparación de una cámara de flujo laminar horizontal (comercial) y comprobar el funcionamiento de la Cámara de Flujo, con el aislamiento de los hongos *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Beauveria bassiana*, *Hemilea vastatrix* y *Puccinia allí*. El costo de la Cámara ascendió a la suma de **S/. 5961.00**, la Cámara de Flujo Laminar Horizontal Hera Scientific de la Serie Helios C72 cuesta S/. 22 775.60 y el modelo de la Cámara de Flujo laminar Horizontal; ESCO, AHC-4D_ cuesta S/.28,147.80. El monto a que asciende, la compra de materiales de Laboratorio para comprobar el funcionamiento de la Cabina es de S/. **1,272.00**. La Relación Costo/Beneficio (C/B) para la Cámara de flujo laminar fue de **1.83**, comparando con la Cámara de flujo laminar horizontal para el Modelo Helios C72 que tiene una Relación C/B de **0.48** y para el Modelo ESCO, AHC-4D_ de **0.39**.

Finalmente, para comprobar el funcionamiento de la Cámara de Flujo laminar, se realizó el aislamiento de los hongos *Bauveria bassiana*, *Hemilea vastatrix*, *Phytophthora cinnamomi*, *Puccinia allí* y *Trichoderma spp*. Se logró aislar y purificar eficientemente cinco especies de hongos. En cada uno de los aislamientos, se realizó un diagrama conceptual para explicar cómo se hicieron las siembras, cuántas muestras se tomaron y así poder ver los resultados. Para la siembra se utilizó el PDA como medio de cultivo *ya que* es muy usado para aislar todo tipo de hongos como *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium (Verticillium)* y *Metarhizium*.

Palabras clave: Cámara de flujo laminar, In vitro, Costo, Hongo, Aislamiento.

SUMMARY

The present work of investigation was carried out under conditions of the Laboratory of Seeds of the School of Agronomic and Agricultural Engineering of Santa Maria in the Banda Huasacache farm,, Hunter District, province of Arequipa. The laboratory is implemented adequately and in conditions for the installation of the Laminar flow cabinet. The aim of the present study was To design, to construct, to install and to put in functioning a Laminar flow cabinet for growing mushrooms. *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Hemileia vastatrix* and *Puccinia allii*,. To establish cost / benefit of the construction of a Laminar flow cabinet in comparison of a Laminar flow cabinet comercial and to verify the functioning.

The cost of the Laminar flow cabinet was of s/. 5961.00, the laminar flow cabinet Hera Scientific Helios C72 cost S/. 22775.60 and laminar flow cabinet ESCO, AHC-4D cost S/ 2814780. The Cost Of The Purchase of Materials of laboratory to verify the functioning of the lainar flow cabinet was of S/. 1,272.00.

The Relation Cost / benefit for the Laminar Flow Cabinet was of 1.83.

Finally, to verify the laminar flow cabinet, the isolation of the mushroom was realized *Bauveria bassiana*, *Hemilea vastatrix*, *Phytophthora cinnamomi*, *Puccinia allí* y *Trichoderma spp*. It was achieved to isolate and to purify four species of mushroom in each of the fungi, a conceptual graph was realized to explain how there were made the sowings, how many samples took and this way be able to see the results. For the sowing the PDA was in use as way since it is a very secondhand way that serves to isolate all kinds of fungi. *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) y *Metarhizium*.

Keywords: Chamber of laminar flow, *In vitro*, Cost, Fungus, Isolation.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| INTRODUCCION | v |
| RESUMEN | vi |
| SUMMARY | vii |
| CAPITULO I | 1 |
| 1. PLANTEAMIENTO TEORICO | 1 |
| 1.1. JUSTIFICACION..... | 1 |
| 1.2. HIPOTESIS..... | 2 |
| 1.3. OBJETIVOS | 2 |
| 1.3.1. OBJETIVO GENERAL..... | 2 |
| 1.3.2. OBJETIVO ESPECIFICOS..... | 2 |
| CAPITULO II | 3 |
| 1. REVISION DE LITERATURA | 3 |
| 1.1. DEFINICION DE FLUJO LAMINAR | 3 |
| 1.1.1. CÁLCULO DEL NÚMERO DE REYNOLDS | 3 |
| 1.2. CAMARA DE FLUJO LAMINAR..... | 4 |
| 1.2.1. HISTORIA DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR | 5 |
| 1.2.2. TIPOS DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR | 6 |
| 1.2.2.1. Cámaras de Flujo Horizontal | 6 |
| 1.2.2.2. Cámaras de Flujo Horizontal | 7 |
| 1.2.2.2.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE UNA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL | 7 |
| 1.2.2.2.2. DISEÑO DEL FUNCIONAMIENTO DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL | 8 |
| 1.2.2.2.3. PERFIL DEL FLUJO DE LA CFLH..... | 8 |
| 1.2.2.3. Cámara de Flujo Vertical | 9 |
| 1.2.3. APLICACIONES DE LAS CÁMARAS DE FLUJO LAMINAR | 10 |
| 1.2.4. COMPONENTES PRINCIPALES DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR | 10 |
| 1.2.4.1. Ventilador Axial | 10 |
| 1.2.4.2. Filtros de aire..... | 11 |
| 1.2.4.3. Filtros de alta eficiencia..... | 11 |
| 1.2.4.4. Acero inoxidable..... | 12 |
| 1.2.5. PREVIA UTILIZACIÓN DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR | 14 |

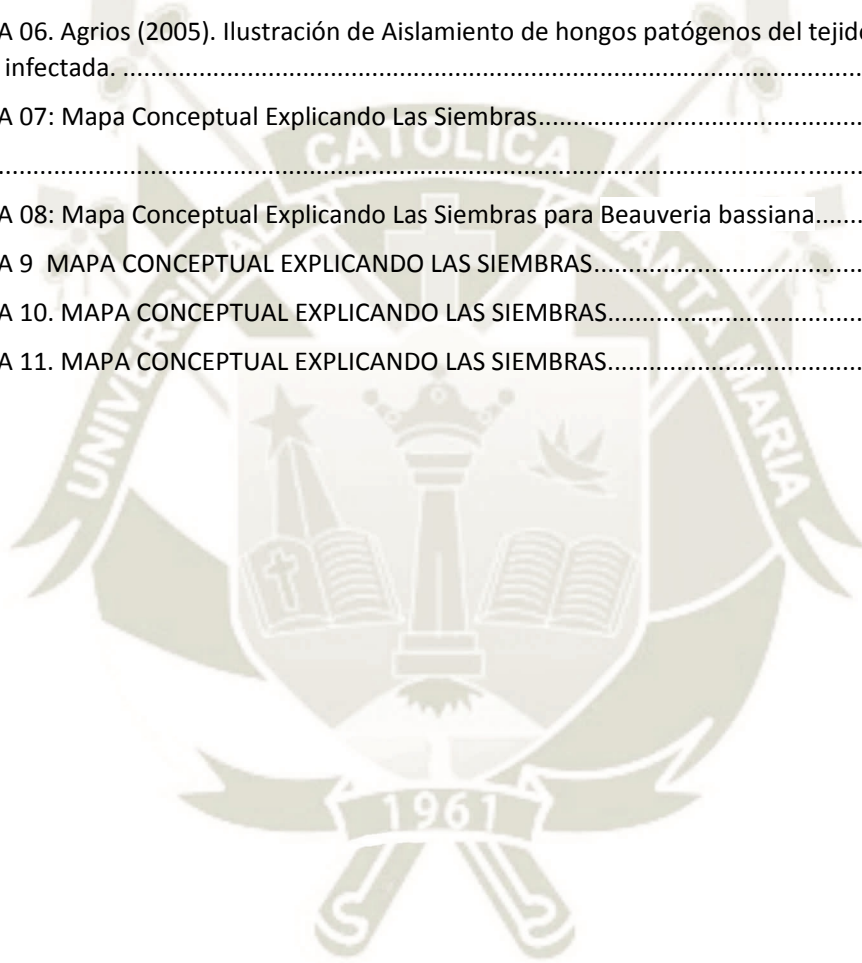
| | | |
|----------|---|----|
| 1.2.6. | UTILIZACION DE LA CAMARA DE FLUJO LAMINAR | 14 |
| 1.2.7. | RECOMENDACIONES PARA EL USO DE CABINAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA | 15 |
| 1.2.7.1. | Materiales y equipos | 15 |
| 1.2.7.2. | Procedimiento de trabajo | 16 |
| 1.2.7.3. | Ubicación de las cabinas..... | 17 |
| 1.2.7.4. | Mantenimiento de las cabinas | 18 |
| 1.2.7.5. | Limpieza y desinfección de las cabinas | 19 |
| 1.2.7.6. | Sistema de extracción de las cabinas | 20 |
| 1.2.7.7. | Equipos de protección personal..... | 20 |
| 1.3. | MICROORGANISMOS..... | 20 |
| 1.3.1. | HONGOS | 21 |
| 1.3.1.1. | Características generales de los hongos | 22 |
| 1.3.1.2. | Morfología de los hongos..... | 23 |
| 1.3.1.3. | Reproducción de los hongos | 24 |
| 1.3.1.4. | Aislamiento de hongos Fito patógenos..... | 25 |
| 1.3.1.5. | Principales hongos estudiados | 26 |
| 1.3.2. | BACTERIAS | 32 |
| 1.3.2.1. | Características generales de las bacterias..... | 33 |
| 1.3.2.2. | Morfología de las bacterias | 34 |
| 1.3.3. | METODOS DE SIEMBRA AGENTES FITO PATOGENOS | 35 |
| 1.3.3.1. | Siembra por estrías | 35 |
| 1.3.3.2. | Siembra por punción | 35 |
| 1.3.3.3. | Siembra volumétrica | 35 |
| 1.3.3.4. | Siembra masiva | 36 |
| 1.3.4. | MEDIOS DE CULTIVO PARA LABORATORIO | 36 |
| 1.3.4.1. | Agar agua..... | 37 |
| 1.3.4.2. | Papa dextrosa agar (PDA)..... | 37 |
| 1.3.4.3. | Fito levadura..... | 38 |
| 1.3.5. | MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO DE AGENTES FITOPATÓGENOS A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL | 38 |
| 1.3.5.1. | PREPARATIVOS PARA EL AISLAMIENTO | 39 |
| 1.3.5.2. | Aislamiento de hojas | 39 |
| 1.3.5.3. | Aislamiento a partir de tallos, frutos, y otros órganos aéreos de la planta. | 40 |
| 1.3.5.4. | Aislamiento a partir de raíces, tubérculos, raíces carnosas y frutos de hortalizas que se encuentran en contacto con el suelo..... | 40 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| 1.3.6. | SIEMBRA DE AGENTES FITO PATOGENOS | 41 |
| 1.3.6.1. | Siembra de hongos..... | 41 |
| 1.3.6.2. | Siembra de bacterias..... | 42 |
| 1.4. | TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS | 42 |
| CAPITULO III | | 48 |
| 1. | MATERIALES Y METODOS | 48 |
| 1.1. | UBICACIÓN DEL AREA EXPERIMENTAL..... | 48 |
| 1.2. | FECHA DE INICIO Y TÉRMINO | 49 |
| 1.3. | COMPONENTES EN ESTUDIO | 49 |
| 1.4. | MATERIALES EMPLEADOS Y METODOLOGIA SEGUIDA..... | 49 |
| 1.4.1. | MATERIALES EMPLEADOS | 49 |
| 1.4.2. | METODOLOGIA DE CONSTRUCCION | 51 |
| 1.4.2.1. | Diseño y construcción de la cámara de flujo laminar | 51 |
| 1.4.2.2. | Aislamiento de microorganismos..... | 57 |
| 1.4.2.3. | Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento)..... | 58 |
| 1.5. | PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO, PLAQUETE Y AISLAMIENTO | 60 |
| 1.5.1. | PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO "AGAR PAPA DEXTROSA" | 60 |
| 1.5.1.1. | MEDIO COMERCIAL | 60 |
| 1.5.2. | MEDIO | 62 |
| 1.5.3. | PLAQUEO | 65 |
| 1.6. | AISLAMIENTO DE HONGOS | 66 |
| 1.6.1. | ROYA DE CAFÉ (<i>Hemileia vastatrix</i>)..... | 66 |
| 1.6.2. | <i>Beauveria bassiana</i> | 66 |
| 1.6.3. | <i>Trichoderma sp.</i> | 67 |
| 1.6.4. | ROYA DEL AJO (<i>Puccinia allii</i>) | 67 |
| 1.6.5. | TRISTEZA DEL PALTO (<i>Phytophthora cinnamomi</i>)..... | 67 |
| CAPITULO IV | | 68 |
| 1. | RESULTADOS | 68 |
| 1.1. | METRADO Y PRESUPUESTO DE CAMARAS DE FLUJO LAMINAR | 68 |
| 1.1.1. | METRADO Y PRESUPUESTO PARA CONSTRUCCION DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR 68 | |
| 1.1.2. | COSTO DE MATERIALES PARA PROBAR LA CAMARA DE FLUJO LAMINAR..... | 69 |
| 1.2. | ANALISIS DE COSTO/BENEFICIO DE UNA CABINA DE FLUJO LAMINAR..... | 70 |
| 1.2.1. | COSTO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR COMERCIAL | 70 |
| 1.3. | Aislamiento de hongos..... | 72 |

| | |
|--|-----|
| CAPITULO V | 98 |
| DISCUSION..... | 98 |
| CAPITULO VI | 102 |
| CONCLUSIONES | 102 |
| CAPITULO VII | 103 |
| RECOMENDACIONES | 103 |
| CAPITULO VIII | 104 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 104 |
| Anexo 01. Fotografías de Elaboración de la Cámara de Flujo Laminar..... | 108 |
| Anexo 02. Traslado de Camara de Flujo laminar a laboratorio del Fundo la Banda Huasacache.. | 110 |
| Anexo 03. Resultados de Aislamiento de Hongos en la Camara de Flujo..... | 111 |
| Anexo 04. FICHA TECNICA..... | 113 |
| Anexo 05. Manual elaborado para la de Operación y Mantenimiento de la Cámara de Flujo Horizontal..... | 115 |
| Anexo 06. Plano diseñado para la elaboracion de la camara de flujo laminar..... | 124 |
| Anexo 07. Vista tridimensional con medidas de la parte frontal de la camara de flujo laminar... | 125 |
| Anexo 08. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la parte frontal de la camara de flujo laminar..... | 126 |
| Anexo 09. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la parte lateral de la camara de flujo laminar..... | 127 |
| Anexo 10. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la parte anterior de la camara de flujo laminar..... | 128 |
| Anexo 11. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la parte superior de la camara de flujo..... | 129 |
| Anexo 12. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la instalacion electrica de la camara de flujo..... | 130 |
| Anexo 13. Vista tridimensional de la parte frontal de la camara deflujo laminar..... | 131 |
| Anexo 14. Vista tridimensional de la parte frontal posterior superior de la camara deflujo laminar..... | 132 |
| Anexo 15. Vista tridimensional de la parte frontal de la camara de flujo laminar..... | 133 |
| Anexo 16. Vista tridimensional de la parte frontal anterior de la camara de flujo laminar..... | 134 |
| Anexo 17. Vista tridimensional de la parte lateral de la camara de flujo laminar..... | 135 |
| Anexo 18. Vista tridimensional de la parte lateral de la camara de flujo laminar..... | 136 |
| Anexo 19. Vista tridimensional de la instalacion electrica de la camara de flujo laminar..... | 137 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 01. Cámara de Flujo laminar Clavell y Rossi (1994). | 5 |
| FIGURA 02. Cámara de Flujo laminar horizontal Clavell y Rossi (1994). | 7 |
| FIGURA 03. Cámara de flujo laminar vertical Clavell y Rossi (1994). | 9 |
| FIGURA 04: Esquema de las posibles ubicaciones de las cabinas de seguridad biológica | 18 |
| FIGURA 05. AGRIOS (2005). Ilustración de Preparación de medios de cultivo sólidos en placas (cajas de Petri) y tubos de ensayo inclinados. | 39 |
| FIGURA 06. Agrios (2005). Ilustración de Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada. | 41 |
| FIGURA 07: Mapa Conceptual Explicando Las Siembras..... | 72 |
| | 77 |
| FIGURA 08: Mapa Conceptual Explicando Las Siembras para Beauveria bassiana..... | 77 |
| FIGURA 9 MAPA CONCEPTUAL EXPLICANDO LAS SIEMBRAS..... | 83 |
| FIGURA 10. MAPA CONCEPTUAL EXPLICANDO LAS SIEMBRAS..... | 88 |
| FIGURA 11. MAPA CONCEPTUAL EXPLICANDO LAS SIEMBRAS..... | 93 |



INDICE DE CUADROS

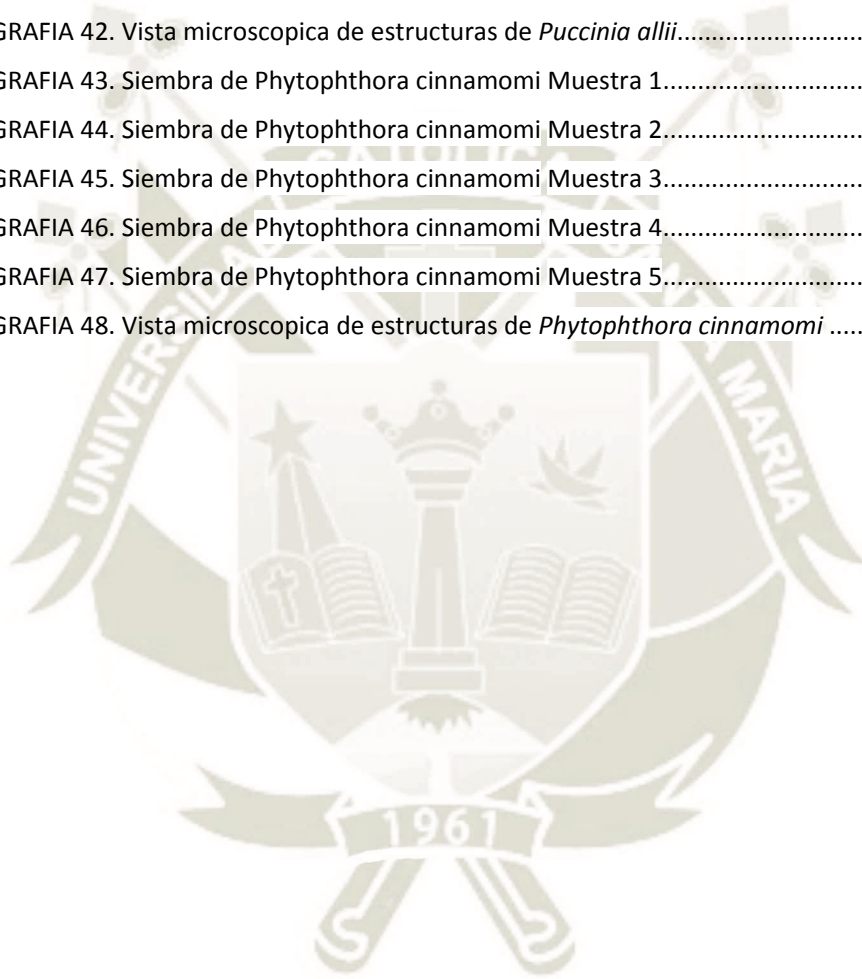
| | |
|--|----|
| CUADRO 01: Resultados de Cálculo de Número de Reynolds (Mott R. 2006)..... | 4 |
| CUADRO 02. Metrado y presupuesto de la Cámara de flujo laminar en “Diseño, construcción e instalación de una Cámara de flujo laminar para el cultivo de microorganismos en el Fundo “La Banda”- Huasacache de la Universidad Católica de “Santa María”..... | 68 |
| CUADRO 03. Costo de materiales de Laboratorio para probar Cámara de flujo laminar en “Diseño, construcción e instalación de una Cámara de flujo laminar para el cultivo de microorganismos en el Fundo “La Banda”- Huasacache de la Universidad Católica de “Santa María”. | 69 |



INDICE DE FOTOGRAFIAS

| | |
|---|----|
| FOTOGRAFÍA 01. Fundo “La Banda”, Huasacache, Hunter. Fuente: Google earth | 48 |
| FOTOGRAFIA 02. Cámara de flujo laminar instalada en el Laboratorio..... | 52 |
| FOTOGRAFÍA 03. Planchas de acero inoxidable embalado..... | 52 |
| FOTOGRAFÍA 04. A,B,C,D: Armadode de la Cámara de Flujo laminar en el Taller | 53 |
| FOTOGRAFÍA 05. A, B: Unión de planchas de acero con pernos inoxidables | 54 |
| FOTOGRAFIA 06. A,B,C,D: Filtro HEPA y ventilador centrífugo..... | 55 |
| FOTOGRAFÍA 07. A,B,C,D: Instalaciones eléctricas con luz ultravioleta..... | 56 |
| FOTOGRAFIA 08. Traslado de la Cámara del Taller hacia Fundo “La Banda”..... | 56 |
| FOTOGRAFIA 09. Grúa para elevar la Cámara del Primer Piso al Laboratorio en el Tercer Piso. | 57 |
| FOTOGRAFÍA 10. Tomando cantidades exactas para disolver el medio (DIPROQUIM). 39gr/1l. ... | 60 |
| FOTOGRAFIA 11. Esperando que el agua entre en su punto de ebullición. | 61 |
| FOTOGRAFÍA 12: Disolviendo el medio..... | 61 |
| FOTOGRAFÍA 13. Medio preparado instantáneamente listo. | 61 |
| FOTOGRAFIA 14. Medio en la autoclave para la esterilización..... | 62 |
| FOTOGRAFIA 15. A,B: Haciendo hervir la papa para preparar el medio | 63 |
| FOTOGRAFIA 16. A,B: Moviendo los ingredientes, hasta tenerlos totalmente disueltos..... | 63 |
| FOTOGRAFIA 17. Medio preparado con papa listo. | 64 |
| FOTOGRAFIA 18. Medio en la autoclave para la esterilización..... | 64 |
| FOTOGRAFÍA 19. Plaqueado de Medios (instantáneo B y artesanal A) | 64 |
| FOTOGRAFIA 20. A,B: Plaqueado de Medios. 1ml. Aprox..... | 65 |
| FOTOGRAFIA 21. Empaquetado de 10 unidades. | 66 |
| FOTOGRAFIA 22. Siembra de <i>Hemileia vastatrix</i> Muestra 1..... | 73 |
| FOTOGRAFIA 23. Siembra de <i>Hemileia vastatrix</i> Muestra 2..... | 74 |
| FOTOGRAFIA 24. Siembra Muestra 1..... | 75 |
| FOTOGRAFÍA 25 Vista microscopica de estructuras de <i>Hemileia vastatrix</i> | 76 |
| FOTOGRAFIA 26. Siembra de <i>Beauveria bassiana</i> Muestra 1..... | 78 |
| FOTOGRAFIA 27. Siembra de <i>Beauveria bassiana</i> Muestra 2..... | 79 |
| FOTOGRAFIA 28. Siembra de <i>Beauveria bassiana</i> Muestra 3..... | 80 |
| FOTOGRAFIA 29. Siembra de <i>Beauveria bassiana</i> Muestra 4..... | 81 |
| FOTOGRAFIA 30. Se observa la mista microscopica de estructuras de <i>Beauveria bassiana</i> | 82 |
| FOTOGRAFIA 31. Siembra de <i>Trichoderma</i> sp Muestra 1..... | 84 |
| FOTOGRAFIA 32. Siembra de <i>Trichoderma</i> sp. Muestra 2 | 85 |
| FOTOGRAFIA 33. Siembra de <i>Trichoderma</i> sp. Muestra 3..... | 86 |
| FOTOGRAFIA 34. Siembra de <i>Trichoderma</i> sp Muestra 4..... | 86 |

| | |
|---|----|
| FOTOGRAFIA 35. Vista microscopica de estructuras de <i>Trichoderma sp.</i> | 87 |
| FOTOGRAFIA 36. Siembra de <i>Puccinia allii</i> Muestra 1 | 89 |
| FOTOGRAFIA 37. Siembra de <i>Puccinia allii</i> Muestra 1 | 90 |
| FOTOGRAFIA 38. Siembra de <i>Puccinia allii</i> Muestra 3 | 90 |
| FOTOGRAFIA 39. Siembra de <i>Puccinia allii</i> Muestra 4 | 91 |
| FOTOGRAFIA 40. Siembra de <i>Puccinia allii</i> Muestra 5 | 91 |
| FOTOGRAFIA 41. Siembra de <i>Puccinia allii</i> Muestra 6 | 91 |
| FOTOGRAFIA 42. Vista microscopica de estructuras de <i>Puccinia allii</i> | 92 |
| FOTOGRAFIA 43. Siembra de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Muestra 1..... | 94 |
| FOTOGRAFIA 44. Siembra de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Muestra 2..... | 95 |
| FOTOGRAFIA 45. Siembra de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Muestra 3..... | 96 |
| FOTOGRAFIA 46. Siembra de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Muestra 4..... | 96 |
| FOTOGRAFIA 47. Siembra de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Muestra 5..... | 96 |
| FOTOGRAFIA 48. Vista microscopica de estructuras de <i>Phytophthora cinnamomi</i> | 97 |



CAPITULO I

1. PLANTEAMIENTO TEORICO

1.1. JUSTIFICACION

Trabajar en condiciones totalmente asépticas es una condición fundamental para todo proceso de cultivo *in vitro*, ya que permite evitar cualquier tipo de contaminación que pueda ser contraproducente para la reproducción de las plantas y microorganismos. Buena parte de las manipulaciones propias del cultivo *in vitro* deben realizarse en condiciones de esterilidad total para evitar la contaminación de los cultivos, para disponer de una superficie de trabajo limpia se usa cámaras de flujo laminar.

Es imprescindible que esta técnica se realice en condiciones totalmente asépticas de manera tal que el ambiente de trabajo quede libre de contaminantes o microorganismos como hongos bacterias etc. Que pueden ser perjudiciales para la reproducción de cultivos *in vitro*, la cámara de flujo laminar es ideal para lograrlo, ya que es una unidad autónoma que mediante un sistema de impulsión y filtración de aire logra una zona de trabajo aséptica, la esterilidad se consigue porque se hace circular a través del interior de la cámara una corriente de aire que previamente ha sido micro filtrada para eliminar toda partícula extraña.

Utilizar este equipo constituye una respuesta simple y eficiente al requerimiento de asepsia para el cultivo *in vitro*, que le permitirá tanto mantener los estándares de calidad en todo el proceso.

Por este motivo se ha visto la necesidad de diseñar y construir el equipo mencionado, equipo para el Laboratorio de Semillas de la Escuela de Ingeniería Agronómica y Agrícola de la Universidad Católica de “Santa María”, con la finalidad de satisfacer toda actividad que requiera esterilidad, producción de cultivos *in vitro* libre de contaminantes microbiológicos.

Si bien esto representa una alta inversión, no se compara con los beneficios que se obtendrá, ya que se podrán realizar trabajos de investigación que beneficiarán el aprendizaje de los alumnos y se irradiará a los campos que rodean al Fundo “La Banda”, además el precio de la construcción de esta

Cámara casera, no se iguala a la compra de una cámara de flujo laminar comercial, lo que justifica la ejecución de este trabajo de investigación.

1.2. HIPOTESIS

Dado que en el Mercado local existe la comercialización de Cámaras de Flujo Laminar, es posible que, con materiales propios, se puede diseñar, construir y poner en funcionamiento una Cámara de Flujo Laminar, con bajo costo de inversión comparado con una cámara de flujo laminar comercial

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Diseñar, construir, instalar y poner en funcionamiento una cámara de flujo laminar con el cultivo de hongos *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Hemileia vastatrix* y *Puccinia allii*

1.3.2. OBJETIVO ESPECIFICOS

- Establecer costo/beneficio de la construcción de una cámara de flujo laminar horizontal en comparación de una cámara de flujo laminar horizontal (comercial)
- Realizar el aislamiento del hongo.
 - ✓ *Beauveria bassiana*
 - ✓ *Trichoderma spp*
 - ✓ *Phytophthora cinnamomi*.
 - ✓ *Hemileia vastatrix*
 - ✓ *Puccinia allii*

CAPITULO II

1. REVISION DE LITERATURA

1.1. DEFINICION DE FLUJO LAMINAR

Se caracteriza porque el movimiento de las partículas del fluido se produce siguiendo trayectorias bastante regulares, separadas y perfectamente definidas dando la impresión de que se tratara de láminas o capas más o menos paralelas entre si, las cuales se deslizan suavemente unas sobre otras, sin que exista mezcla macroscópica o intercambio transversal entre ellas. Las partículas se desplazan siguiendo trayectorias paralelas, formando así en conjunto capas o láminas de ahí su nombre, el fluido se mueve sin que haya mezcla significativa de partículas de fluido vecinas (Rossi 1994).

1.1.1. CÁLCULO DEL NÚMERO DE REYNOLDS

El número de Reynolds es un número adimensional utilizado en mecánica de fluidos, diseño de reactores y fenómenos de transporte para caracterizar el movimiento de un fluido. Sabemos que para valores del flujo se mantiene estacionario y se comporta como si estuviera formado por láminas delgadas, que interactúan solo en base a esfuerzos tangenciales, por eso a este flujo se le llama flujo laminar. Con las velocidades características de la cámara de flujo laminar sugerida por varios autores realizamos los cálculos correspondientes para obtener el valor del número de Reynolds que nos indique el tipo de flujo que vamos a obtener. (Mott R.2006).

CUADRO 01: Resultados de Cálculo de Número de Reynolds (Mott R. 2006).

| Velocidad del aire m/s | Numero de Reynolds | Flujo |
|------------------------|--------------------|---------|
| 0,65 | 1967 | Laminar |
| 0,60 | 1816 | Laminar |
| 0,55 | 1665 | Laminar |
| 0,50 | 1513 | Laminar |
| 0,45 | 1362 | Laminar |
| 0,40 | 1211 | Laminar |
| 0,35 | 1059 | Laminar |

1.2. CAMARA DE FLUJO LAMINAR

Las cámaras de flujo laminar proporcionan un área delimitada por superficies fáciles de limpiar y desinfectar con un flujo de aire filtrado a través de pre filtros, que retienen las partículas más grandes que están presentes en el aire, y por filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air), que son filtros de alta eficiencia capaces de retener partículas $\geq 0,3 \mu\text{m}$ con una eficiencia mínima del 99,97%. (Clavell y Rossi 1994)

Cuando todo el aire que entra a la zona de trabajo es filtrado a través de los filtros HEPA se produce un flujo unidireccional, ya que el aire se mueve a través del área de trabajo con una velocidad uniforme a lo largo de líneas paralelas logrando un barrido o eliminación de las partículas presentes en el mismo. Anteriormente este movimiento se llamaba laminar, por esa razón los equipos se denominaron campanas de flujo laminar, nombre que se sigue utilizando. (Figura 01) (Clavell y Rossi, 1994).

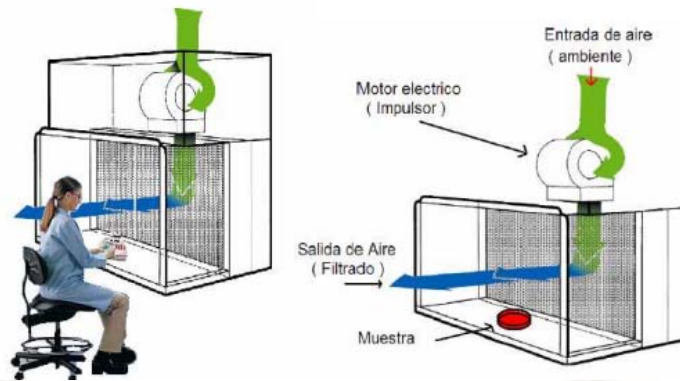


FIGURA 01. Cámara de Flujo laminar Clavell y Rossi (1994).

1.2.1. HISTORIA DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR

La Cámara de Flujo Laminar (CFL), comúnmente conocida como cabina de bioseguridad, forman parte de un grupo de equipos destinados a mejorar las condiciones generales bajo las cuales se realizan una gran variedad de actividades en los laboratorios clínicos y de investigación. Estas actividades abarcan desde procesos rutinarios para la identificación de microorganismos hasta actividades especializadas de investigación. (Bravo, 2002)

Además, es conocido con diversos nombres tales como "gabinets de bioseguridad", "campanas de flujo laminar" y "purificadores", entre otros, el término "flujo laminar" se utiliza también comúnmente para identificarlas. Los equipos son los que garantizan la existencia de ambientes controlados, indispensables para realizar actividades que por sus características resultan potencialmente peligrosas para la salud del hombre y del ambiente. (Pérez, 2003)

Por otra parte, algunas de las cabinas protegen el estado de los productos o cultivos objeto de la investigación. La concepción y desarrollo de este tipo de equipos se inició a principios del siglo XX, cuando se diseñó una caja de aislamiento microbiológico, la cual se mantenía a presión negativa. Disponía de un filtro de ingreso y el aire finalmente se extraía de la misma a través de un frasco que contenía una solución desinfectante. (Jardiel, 2000)

En 1943, Van Den Ende, diseño y construyó la que puede considerarse

como la primera cabina de seguridad biológica, en el cual se generaba un movimiento de aire hacia el área contenida a través de un quemador, colocado sobre el conducto de extracción o chimenea. Dicho diseño fue refinado y hacia 1953 se logró una 26 versión de las cabinas conocidas hoy en día como Clase I, aunque con filtros fabricados en lana de vidrio. (Harper, 2000)

Como consecuencia del desarrollo de los filtros denominados HEPA (High Efficiency Particulate Air) en 1962, se logró que el aire pudiera ser filtrado para ser descargado al exterior del laboratorio o pudiera ser reciclado dentro de la cabina, hecho que generó el desarrollo de las diversas clases de cabinas existentes hoy en día. (Rossi, 1994)

En el presente documento se aplicarán las diversas clases de cabinas de seguridad biológica, la forma como se encuentran clasificados, como se utilizan, cómo y con que agentes se desinfectan, como se tratan los incidentes que como derrames o salpicaduras se presentan durante el trabajo normal del laboratorio, que componentes las integran y como se manifiestan. (Jardiel, 2000)

1.2.2. TIPOS DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR

Dependiendo de la ubicación del filtro HEPA existen en el mercado dos tipos de campanas de flujo laminar:

1.2.2.1. Cámaras de Flujo Horizontal

Son aquellas en las que el filtro HEPA está colocado en la parte posterior de la campana, por lo que el flujo de aire unidireccional se mueve a través de líneas paralelas horizontales, es decir desde la parte posterior del equipo hacia el operador. (Clavell y Rossi 1994).

Este tipo de equipo no puede utilizarse para trabajar con productos peligrosos, por ejemplo, ciertos antibióticos y quimioterápicos, ya que durante la manipulación se pueden generar aerosoles que el flujo de aire llevará hasta el operador, (Figura 02). (Clavell y Rossi 1994).

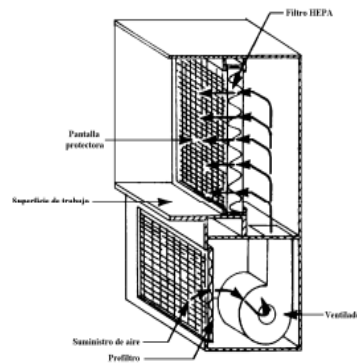


FIGURA 02. Cámara de Flujo laminar horizontal Clavell y Rossi (1994).

1.2.2.2. Cámaras de Flujo Horizontal

1.2.2.2.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE UNA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL

Las cámaras de flujo laminar horizontal crean zonas de trabajo exentas de partículas y polvo mediante el flujo laminar, básicamente están compuestas por:

- El compartimento puede estar construido en acero esmaltado al horno o con acero inoxidable.
- Debe encontrarse totalmente selladas para evitar contaminaciones al interior de las mismas por agentes externos en su parte superior posterior y a los lados, siendo fabricada en una sola pieza.
- Normalmente cada unidad va equipada con pre filtros, ventiladores centrífugos, reguladores de velocidad para los ventiladores, manómetros, cuadros de maniobra y señalización.
- Filtros HEPA (aire particulado de alta eficiencia) o ULPA absolutos de una eficacia del 99,997 % y 99,99%, son filtros empleados para esterilizar el aire. El aire que penetra en la cámara pasa por los filtros, de manera que la superficie queda estéril.

- El aire circula por la cabina a una velocidad entre 0,40 y 0,65 m/s. El flujo del aire es laminar sin turbulencias.
- La lámpara Ultravioleta tiene efectos de esterilización en la cámara, pero la misma solo debe permanecer encendida en ausencia total de los usuarios. La lámpara Ultravioleta nunca debe verse directamente a los ojos por efectos de radiación de intensidad esta debe ser > 1000 lux. (Características de CFLH. 2008).

1.2.2.2.2. DISEÑO DEL FUNCIONAMIENTO DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL

La técnica del flujo laminar, permite controlar la contaminación microbiológica en el aire mediante procedimientos básicos simultáneos: El primer procedimiento es introducción de aire estéril a través de filtros absolutos, ya que éstos retienen partículas desde 0.12 micras en adelante y su diseño interno obliga a las partículas a detenerse en el medio filtrante. La alta eficiencia de los filtros evaluada electrónicamente, permite asegurar este resultado.

En general, este tipo de unidad es idóneo para todas aquellas actividades que requieren esterilidad y que al mismo tiempo no son patógenas para el personal que opera el equipo. La cámara de flujo laminar horizontal protege fundamentalmente al producto. Una de las grandes ventajas del flujo unidireccional (Flujo Laminar Horizontal) en la cámara, es su alto grado de libertad para operar, pues no tienen bocamangas o elementos que limiten la capacidad de acción del operador. (Características de CFLH. 2008).

1.2.2.2.3. PERFIL DEL FLUJO DE LA CFLH

El flujo de aire de la cámara de flujo laminar horizontal tiene la siguiente trayectoria:

- Aire es forzado en forma uniforme a través del filtro; el resultado es la formación de un flujo laminar limpio que

atraviesa la zona de trabajo de la cabina; esto diluye y elimina del interior de la cabina todo posible contaminante aéreo.

- Una velocidad frontal nominal del flujo del aire de 0.40 m/s o 90 fpm asegura una renovación suficiente de aire dentro de la zona de trabajo todo esto para mantener la esterilidad.
- El aire purificado cruza la zona de trabajo de manera de flujo horizontal unidireccional que se evacua completamente por los calados que pueden ser ubicados en la pared trasera de la zona de trabajo. Los calados están diseñados para eliminar la turbulencia producida y evitar la formación de zonas de aire muerto en las esquinas de la zona de trabajo. (Características de CFLH. 2008).

1.2.2.3. Cámara de Flujo Vertical

Son aquellas en las que el filtro HEPA está colocado en la parte superior de la campana, por lo que el flujo de aire unidireccional se mueve a través de líneas paralelas verticales. Tienen una pantalla protectora transparente que cubre la parte frontal superior de la misma. En este caso, aunque hay mayor protección que con la anterior, no se recomienda para productos peligrosos, ya que el aire contaminado sale al ambiente de trabajo. (Figura 03). (Clavel y Rossi 1994).

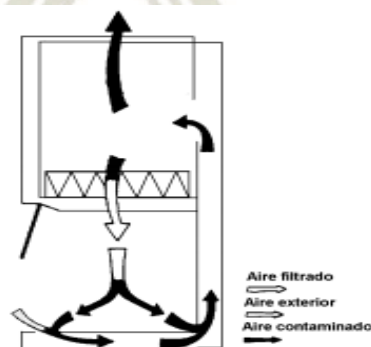


FIGURA 03. Cámara de flujo laminar vertical Clavell y Rossi (1994).

1.2.3. APLICACIONES DE LAS CÁMARAS DE FLUJO LAMINAR

Entre sus usos se cuentan las aplicaciones en las que no se produzcan materiales bio peligrosos y no se precise protección del usuario.

- Micología
- Microbiología de los alimentos
- Cultivos celulares vegetales y de mamíferos
- Protocolos hospitalarios y de farmacia clínica
- Salas limpias, montaje de semiconductores e industrias farmacéuticas, aeroespaciales y de productos sanitarios
- Preparación de soluciones oftálmicas.
- Preparación de soluciones tópicas, estériles y urológicas.
- Mezcla de alimentos y fórmulas para bebés.
- Ideal para pruebas de laboratorio clínico.
- Preparación de medios de cultivo.
- Siembras no patógenas.
- Preparación de soluciones hipertónicas.
- Preparación de mezclas con soluciones intravenosas.
- Llenado de productos estériles, como soluciones inyectables.
- Micro propagación de cultivos celulares.
- Técnicas de fertilización *in vitro*.

1.2.4. COMPONENTES PRINCIPALES DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR

1.2.4.1. Ventilador Axial

Son aquellos en los cuales el flujo de aire sigue la dirección del eje del mismo. Se suelen llamar helicoidales, pues el flujo a la salida tiene una trayectoria con esa forma. En líneas generales son aptos para mover grandes caudales a bajas presiones. Con velocidades periféricas medianamente altas son en general ruidosos. Suelen sub-clasificarse, por la forma de su envolvente.

- HELICOIDAL Ventiladores aptos para mover grandes caudales de aire con bajas presiones. Son de bajo rendimiento. La

transferencia de energía se produce mayoritariamente en forma de presión dinámica.

Se aplica en circulación y extracción de aire en naves industriales. Se instalan en pared sin ningún conducto. Utilizados con objetivo de renovación de aire. (Perez, 2003)

- TUBE AXIAL Tienen rendimiento algo superior al anterior y es capaz de desarrollar una presión estática mayor. Por su construcción es apto para intercalar en conductos.

Se utiliza en instalaciones de ventilación, calefacción y aire acondicionado que requieran altos caudales con presión media a baja. También se utiliza en algunos sistemas industriales como cabinas de pintura y extracciones localizadas de humos. (Perez, 2003)

- VANE AXIAL Con diseños de palas AIRFOIL, permiten obtener presiones medias y altas con buenos rendimientos. Las palas pueden ser fijas o de ángulo ajustable

Tiene aplicaciones similares a los TUBEAXIAL, pero con la ventaja de tener un flujo más uniforme y la posibilidad de obtener presiones mayores. Para una determinada prestación es relativamente más pequeño que el ventilador centrífugo equiparable. (Perez, 2003)

1.2.4.2. Filtros de aire

Un filtro de aire es un dispositivo que elimina partículas sólidas como por ejemplo polvo, polen bacterias del aire y otros. Los filtros de aire encuentran una utilidad allí donde la calidad del aire es de relevancia, especialmente en sistemas de ventilación de edificios y en motores tales como los de combustión interna, compresores de gas, compresores para bombonas de aire, turbinas de gas y cámara de flujo laminar, (Pérez, 2003).

1.2.4.3. Filtros de alta eficiencia

El filtro es el componente más importante de las cabinas de flujo laminar con un amplio abanico de aplicaciones en campos como la microelectrónica, investigación científica y sanidad. También

conocidos como filtros “absolutos”, fueron desarrollados durante la II Guerra Mundial para la eliminación de partículas radiactivas en la industria nuclear, (Pérez, 2003).

Desde entonces, se han producido continuos avances con el fin de satisfacer la demanda de mayores eficacias contra partículas más pequeñas. Un filtro HEPA convencional consiste en una lámina continua de una fibra de vidrio especial plegada en forma de “V” con separadores de aluminio corrugado entre los pliegues. La técnica con la que se disponen estos pliegues es la que confiere la eficacia de separación de estos filtros. El filtro es desechable tipo seco, las micro fibras de vidrio pueden ser de silicato de boro fundido en una lámina delgada, similar a un pedazo de papel montado sobre un marco de aluminio. El filtro fue diseñado específicamente para proteger el sistema respiratorio del ser humano, tiene alta eficiencia en el control de partículas suspendidas, son conocidos como filtros absolutos debido a su eficiencia, (Pérez, 2003).

Actualmente son reconocidos por la Environmental Protection Agency (EPA) como el método probado más reciente para limpiar el aire. El filtro retiene y filtra todas las partículas del aire desde un tamaño de 0.3 micras con una eficiencia del 99.997%. Para preservar la vida útil, es importante el remplazo continuo de los pre-filtros de fibra de vidrio, (Pérez, 2003). Aunque el medio filtrante, permite retener microorganismos o partículas sostenidas en el aire de las dimensiones ya señaladas, no impide el paso directo de los gases. En el interior del medio filtrante las partículas son retenidas por medio de cinco fenómenos bien diferenciados, (Pérez, 2003).

1.2.4.4. Acero inoxidable

Nombre genérico que se emplea comúnmente para designar un grupo de aleaciones que tienen como componente principal el hierro, y que tiene una excepcional resistencia a la oxidación y la corrosión gracias al contenido de cromo (Cr). El cromo en cantidades superiores al 10%, con un contenido bajo de carbono, da como

resultado que el hierro se torne efectivamente inoxidable, (Ecured, 2017)

Otros elementos aleantes, especialmente el níquel (Ni) y el molibdeno (Mo), pueden agregarse a la composición básica del acero inoxidable para promover variedad y mejoría en las propiedades. A nivel comercial, se producen más de 100 clases diferentes de aceros inoxidables, y sólo la mitad aproximadamente se identifica dentro de alguna norma. Algunas aleaciones se catalogan más correctamente como hierros inoxidables porque no endurecen como el acero; otras son aceros verdaderos, para los cuales la resistencia a la corrosión es una propiedad adicional. Aún existen otras que no son propiamente aceros ni hierros, pero que corresponden a nuevas clases de materiales desde el punto de vista químico y mecánico, (Ecured, 2017)

a) Propiedades del acero inoxidable

El acero inoxidable es resistente a la corrosión, dado que el cromo, u otros metales que contiene, posee gran afinidad por el Oxígeno y reacciona con él formando una capa pasivadora, evitando así la corrosión del hierro. (Ecured, 2017)

Sin embargo, esta capa puede ser afectada por algunos ácidos, dando lugar a que el hierro sea atacado y oxidado por mecanismos intergranulares o picaduras generalizadas. Algunos tipos de acero inoxidable contienen además otros elementos aleantes; los principales son el Níquel y el Molibdeno. (Ecured, 2017)

b) Características del acero inoxidable

Como todos los tipos de aceros, el acero inoxidable es un material simple. Lo que tienen en común todos los aceros es que el principal componente (elemento que forma la aleación) es el hierro, al que se añade una pequeña cantidad de carbono.

El Acero inoxidable fue inventado a principios del Siglo XX cuando se descubrió que una pequeña cantidad de Cromo (habitualmente un mínimo de 12%) añadido al acero común, le daba un aspecto brillante y lo hacía altamente resistente a la suciedad y a la oxidación. Esta resistencia a la oxidación, denominada «resistencia a la corrosión», es lo que hace al acero inoxidable diferente de otros tipos de acero. (Ecured, 2017)

1.2.5. PREVIA UTILIZACIÓN DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR

- a) Lavar las manos y brazos con un jabón germicida.
- b) Vestir los elementos de protección personal bata de manga larga, con puños ajustados y guantes de caucho, usar también anteojos protectores y si resulta apropiado, una máscara protectora.
- c) Rociar y refregar todas las superficies interiores con etanol al 70% o con un desinfectante adecuado.
- d) Permitir que el aire que circula dentro de la cámara seque las superficies. (Bravo, 2002)

1.2.6. UTILIZACION DE LA CAMARA DE FLUJO LAMINAR

Para la obtención de buenos resultados en relación con la seguridad y salud de los trabajadores, la protección del medio ambiente y el control y seguridad de los productos trabajados, se han establecido y probado una serie de procedimientos que deben seguirse de forma ordenada para lograr un buen rendimiento y efectividad al trabajar con cámaras de flujo laminar. Entre los más destacados se encuentran los siguientes. (Reyes, 2009)

- Planear en detalle el trabajo o los procedimientos a realizar.
- Poner en marcha la cámara de flujo laminar.
- Cargar los materiales y equipos.
- Desarrollar los procedimientos.
- Descargar los materiales y equipos.

- Desinfectar la cámara de flujo laminar.
- Apagar la cámara de flujo laminar.

1.2.7. RECOMENDACIONES PARA EL USO DE CABINAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

1.2.7.1. Materiales y equipos

Se recomienda ubicar todo el material a utilizar en el interior de la Cabina antes de empezar a trabajar. De esta forma, se evita que nada pase hacia dentro o hacia fuera de la misma hasta que el trabajo haya terminado.

No es recomendable el uso de mecheros Bunsen o similares, puesto que su incorrecta ubicación en el interior de la Cabina puede provocar desviaciones y turbulencias del flujo laminar y quemar los filtros HEPA. Cuando su uso sea necesario deberá estudiarse su ubicación de modo que las turbulencias provocadas por el calor de la llama influyan lo menos posible en la zona estéril de trabajo.

Es recomendable el uso de micro-incineradores eléctricos para la esterilización de asas de siembra microbiológicas, aunque es preferible que éstas sean desechables.

Es recomendable que el material a introducir en la Cabina esté libre de partículas, por ello debería limpiarse cuidadosamente antes de su introducción en la misma.

No es aconsejable introducir en la zona de trabajo materiales que emitan fácilmente partículas tales como: papel, madera, cartón, lápices, goma de borrar, etc.

Es preferible utilizar tubos y/o frascos con tapones de rosca en lugar de tapones de algodón, ya que estos desprenden fibras.

No se deben utilizar las Cabinas como almacén de materiales y equipos de laboratorio.

Todos los productos de desecho (asas de siembra, placas de cultivo, medios de cultivo, muestras, etc.), se evacuarán de la Cabina en

recipientes impermeables y aptos para ser esterilizados. (Reyes, 2009)

1.2.7.2. Procedimiento de trabajo

Es aconsejable realizar movimientos lentos de brazos y manos en el interior de las Cabinas, ya que de lo contrario se crean corrientes de aire que rompen la laminaridad del flujo y pueden provocar la entrada o salida de contaminantes transportados por el aire.

Las manipulaciones a realizar en las Cabinas no deben efectuarse cerca de la superficie de trabajo, ya que el aire al chocar con la superficie se desplaza horizontalmente pudiendo recoger la contaminación depositada sobre la misma.

Se recomienda trabajar entre 5 y 10 cm sobre la mesa de la Cabina, y por detrás de la "zona de partición de humos" (zona en la que el aire estéril descendente se divide para seguir su recorrido a través de las rejillas anterior y posterior de las Cabinas. Clase II). Esa zona es variable y debe conocerse para cada Cabina. En general, la zona de menor seguridad para el trabajador y el producto son los 8 cm más próximos a la abertura frontal. (Reyes, 2009)

A fin de preservar al máximo los filtros HEPA deben evitarse, en cualquier tipo de operación, los golpes, la proyección de líquidos o salpicaduras, perforaciones, etc., contra la rejilla de protección del mismo.

Es recomendable la puesta en funcionamiento de la Cabina unos 15 - 30 min. antes del inicio del trabajo. Asimismo, debe mantenerse en funcionamiento durante un tiempo prudencial después de finalizado el trabajo (algunos autores recomiendan el funcionamiento continuado de las Cabinas para conseguir su óptimo rendimiento).

Se recomienda esperar de 2 a 3 minutos antes de empezar a trabajar, cuando se haya introducido algún material en el interior de Cabinas dotadas del flujo laminar. Ello dará lugar a que éste se

reconstituya y purifique la posible contaminación transportada del exterior a la zona de trabajo estéril.

En la zona de trabajo sólo debe introducirse el material verdaderamente necesario y de uso inmediato. Preferiblemente se colocará de modo que se eviten movimientos innecesarios en el interior de la Cabina.

No deben colocarse objetos entre el filtro HEPA y el área en que se vaya a trabajar puesto que se producirán sombras y turbulencias (la laminaridad del flujo de aire no vuelve a recuperarse hasta una distancia de 2,5 veces el diámetro del objeto interpuesto).

1.2.7.3. Ubicación de las cabinas

Es recomendable instalar las Cabinas de Seguridad Biológica de modo que estén alejadas de puertas, ventanas y salidas de la ventilación general forzada o mejor dicho de las corrientes de aire que éstas puedan generar.

Es asimismo aconsejable mantener una baja actividad en el local o habitación en la que se encuentre instalada la Cabina, ya que corrientes de aire provocadas por el paso o movimiento de personas pueden alterar el equilibrio de flujos de aire. (Figura 04) muestra un esquema de aquellas zonas más (++) adecuadas y menos (--) adecuadas para la ubicación de las Cabinas respecto a las corrientes de aire que se pueden generar en un local. (Reyes, 2009)

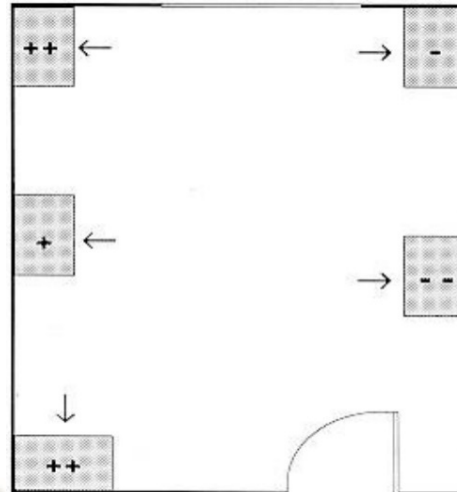


FIGURA 04: Esquema de las posibles ubicaciones de las cabinas de seguridad biológica

1.2.7.4. Mantenimiento de las cabinas

Es necesario disponer, para cada Cabina, de una ficha de mantenimiento y control situada en lugar visible, en la que se reflejarán las modificaciones realizadas y su periodicidad y las operaciones de mantenimiento. En la ficha deberá constar:

- Modelo y referencia.
- Fecha de control.
- Horas de funcionamiento.
- Presión de trabajo en mm de c.d.a. (milímetros de columna de agua).
- Velocidad de aire en m/seg.
- Test D.O.P.
- Fecha de sustitución de filtro HEPA.
- Fecha de sustitución del prefiltro.
- Fecha de la próxima revisión aconsejada.

No es aconsejable trasladar las Cabinas una vez instaladas y verificadas, ya que ello podría provocar fisuras en la continuidad del sello estanco del filtro y provocar fugas de aire no tratado. En caso de traslado, es necesario efectuar un nuevo Test D.O.P. de control de fugas. (Pozo, 2008)

1.2.7.5. Limpieza y desinfección de las cabinas

Es aconsejable realizar una limpieza y desinfección de las superficies de las Cabinas antes de iniciar el trabajo. El uso de aspiradores eliminará el polvo acumulado durante el montaje y transporte. La desinfección se realizará, bien con una disolución bactericida de elevado poder esterilizante, o bien empleando alcohol al 70% (alcohol isopropílico).

La limpieza y desinfección de la Cabina se efectuará en los siguientes casos:

- Antes de cualquier trabajo de mantenimiento rutinario o accidental de la Cabina.
- Antes de realizar un test de control mecánico o biológico en la zona de trabajo.
- Antes de empezar a trabajar.
- Siempre que se cambie de programa de trabajo.
- En caso de que se haya producido un derramamiento de líquido en la mesa de trabajo.

Todas aquellas partes de la Cabina que están contaminadas (ventiladores, plenos, filtros, etc.) y que no son accesibles en operaciones normales de limpieza y desinfección, deben ser descontaminadas mediante esterilización gaseosa.

El procedimiento más sencillo consiste en la despolimerización de paraformaldehído por calentamiento. Esta operación debe realizarse en los siguientes casos:

- Antes de trabajos de mantenimiento.
- Antes del cambio de los filtros.
- Antes de realizar los test básicos de control.

Asimismo, es aconsejable realizar esta descontaminación:

- Antes del traslado de la Cabina.
- Antes de cambiar el programa de trabajo.

- Después de un derrame que contenga una alta concentración del agente manipulado. (Pozo, 2008)

1.2.7.6. Sistema de extracción de las cabinas

Preferiblemente la descarga de aire se efectuará al exterior, de este modo, a pesar de que el aire extraído es microbiológicamente limpio, se consigue una seguridad adicional que consiste en el factor de dilución atmosférico en los casos en que se produzcan fallos en el sellado de los filtros o en los propios filtros.

En los casos en que la descarga se haga en el interior de los locales hay que tener en cuenta que, en función de los materiales manipulados, partículas de diámetro inferior a $0,3 \mu\text{m}$, pueden no ser retenidas por los filtros HEPA, por lo que deberá incorporarse un sistema complementario de tratamiento del aire extraído.

1.2.7.7. Equipos de protección personal

Se recomienda el uso de batas de manga larga con bocamangas ajustadas.

Se recomienda la utilización de guantes impermeables a las disoluciones manipuladas.

No es preciso el uso de mascarillas respiratorias en cualquiera de los diferentes tipos de Cabinas descritos. (Pozo, 2008)

1.3. MICROORGANISMOS

Llamado también microbio u organismo microscópico. La ciencia que estudia a los microorganismos es la Microbiología. «Micro» del griego (diminuto, pequeño) y «bio» del griego (vida) seres vivos diminutos. Son organismos dotados de individualidad que presentan, a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental. En su mayoría son unicelulares o incluso multicelulares, (Folgueras, 2008).

Dentro de los microorganismos se encuentran organismos unicelulares Procariotas, como las Bacterias, y eucariotas, como los Protozoos, una parte de las Algas y los Hongos, e incluso los organismos de tamaño ultramicroscópico, como los Virus. Los microbios tienen múltiples formas y tamaños, (Folgueras, 2008).

1.3.1. HONGOS

Los hongos son organismos eucariontes uni o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células de los segundos se agrupan en filamentos llamados hifas que en conjunto recibe el nombre de micelio. (Agrios, 2005 y Urbina, 2011)

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. La mayoría de las 100000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel o de sus apéndices. Se considera que más de 8.000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida estos hongos se conocen como parásitos obligados o biótrofos. Otros requieren de una planta hospedante durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo y reproduciéndose tanto en materia orgánica muerta como en plantas vivas (como por ejemplo los parásitos no obligados). (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

1.3.1.1. Características generales de los hongos

La reproducción puede ser asexual o sexual, principalmente por esporas. La mayor parte de los hongos son saprofitos; algunos se consideran parásitos; otros mutualistas (que se asocian con otros seres en beneficio mutuo, como ocurre con los líquenes). Eucariontes (con pared celular). Sin tejido vascular. (Agrios, 2005 y Urbina, 2011)

- Se reproducen principalmente por medio de esporas, que son diseminadas por el viento y pueden ser asexuadas o sexuadas.
- No tienen movimiento
- Pueden ser unicelulares o multicelulares
- La pared celular está formada de quitina; en las plantas es celulosa. Son heterotróficos, se alimentan de materia orgánica.
- Los hongos primero digieren y después ingieren.
- Para lograr lo anterior producen toxinas.
- La mayoría de los hongos, almacenan alimentos como glicógeno, igual que los animales: mientras las plantas almacenan polisacáridos.
- La mayoría de los hongos tiene un núcleo pequeño con poco DNA
- Son saprofitos. Se les considera parásitos y mutualistas.
- La falta de clorofila afecta profundamente su forma de vida: No necesitan de la luz.
- Crecen en cualquier dirección, invaden el sustrato con filamentos absorbentes.
- Como parásitos usan la materia orgánica de organismos vivos, causando algún daño a plantas, animales y humanos.
- En simbiosis pueden beneficiar a otros organismos como las micorrizas.
- Son organismos muy útiles por su versatilidad genética y fisiológica.

- Producen enormes cantidades de esporas que permanecen viables, hasta que las condiciones climatológicas favorecen su multiplicación.

Son muy importantes en la investigación, debido a que se reproducen rápido y fácilmente, ocupan poco espacio y su ciclo de vida es corto. (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

1.3.1.2. Morfología de los hongos

La mayoría de los hongos tienen un área o soma vegetativo similar al de las plantas que consta de filamentos microscópicos continuos más o menos alargados y ramificados que tienen paredes celulares definidas. Al soma del hongo se le denomina micelio, y a las bifurcaciones individuales o filamentos del micelio se les denomina hifas. Cada hifa o micelio puede tener un grosor uniforme o pueden terminar en porciones más delgadas o más anchas. Las hifas de algunos hongos tienen un diámetro de tan sólo 0.5 micras, mientras que otras tienen un espesor de más de 100 micras. En algunos hongos, el micelio tiene una longitud de tan sólo unos cuantos micrómetros, pero en otros produce filamentos miceliales de varios metros de longitud. En algunos hongos, el micelio está constituido por células que contienen uno o dos núcleos por célula. En otros, el micelio es cenocítico, es decir, contiene muchos núcleos y está integrado por una célula multinucleada continua y tubular que puede o no ramificarse, o bien puede estar dividido por varias paredes transversales (septos), de ahí que cada segmento represente una hifa multinucleada. El crecimiento del micelio se produce en las puntas de las hifas. (Agrios, 2005 y Urbina, 2011)

Algunos de los hongos inferiores carecen de un micelio verdadero y producen un plasmodio multinucleado, amiboideo y desnudo (como en los *myxomycetes*) o un sistema de filamentos de diámetro más o menos distinto y que varía constantemente, denominado *rizomicelio* (como en los *chytridiomicetes*). (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

1.3.1.3. Reproducción de los hongos

Los hongos se reproducen principalmente mediante esporas, las esporas son estructuras reproductoras o especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la producción, por el micelio del hongo, de células individuales especializadas las esporas sin intervención de cariogamia o meiosis) o ser el resultado de un proceso sexual. (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

En los hongos inferiores, las esporas asexuales se forman en el interior de un saco denominado esporangio y se diseminan en el momento en que se rompe esta estructura o a través de una abertura que posee. Algunas de esas esporas se mueven mediante flagelos y se les denomina zoosporas. Otros hongos producen esporas asexuales denominadas conidios, que se desprenden de las células terminales o laterales de hifas especializadas denominadas conidióforos. (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

En algunos hongos, las células intercalares o terminales de una hifa se alargan, están rodeadas por una pared densa y se separan para formar clamidosporas. En otros grupos de hongos, las esporas asexuales (conidios) se forman en el interior de estructuras de pared gruesa denominadas picnidios. (Agrios, 2005).

La reproducción sexual, o los procesos que se asemejan a ella, se presentan en la mayoría de los grupos de hongos. En algunos de ellos, un par de células (gametos) de tamaño y forma semejante se fusionan y producen un cigoto, denominado zigospora. En otros grupos, los gametos son de tamaño distinto y al cigoto que forman se le denomina oospora. En algunos hongos, no se forman gametos definidos, y en lugar de ello un micelio se fusiona con otro micelio compatible, (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

La fusión de los núcleos sexuales del cigoto produce un núcleo diploide ($2n$). Por lo común, las primeras divisiones de este núcleo son meióticas, de ahí que el hongo contenga núcleos haploides ($1n$)

durante todo su ciclo de vida, excepto en el momento en que se han fusionado los núcleos gaméticos. Sin embargo, en algunos grupos de hongos, en particular en los basidiomicetos y en menor grado en los ascomicetos, las células de todo el micelio o de ciertas partes de él contienen un par de núcleos haploides, los cuales se mantienen separados en el interior de la célula. A dicho micelio se le denomina dicariótico, pero se comporta de manera bastante semejante a como lo hace un micelio diploide (en el que ambos núcleos se mantienen fusionados). (Agrios, 2005 y Urbina, 2011)

En la mayoría de los hongos, los gametos masculino y femenino se forman en un mismo micelio (como es el caso de los hongos hermafroditas). Cuando los gametos masculinos fecundan a los femeninos del mismo micelio, el hongo se le denomina homotálico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los gametos masculinos fecundan únicamente a los gametos femeninos de otro micelio sexualmente compatible, por lo que se dice que el hongo es heterotálico, (Agrios, 2005 y Urbina, 2011).

1.3.1.4. Aislamiento de hongos Fito patógenos

En la estructura de los hongos patógenos, las diversas formas que desarrollan: Estructuras vegetativas. Estructuras propagativas. Estructuras reproductivas. Estructuras de conservación. Todos estos datos entran en juego cuando se quiere clasificar a los diferentes agentes fitopatógenos. (Folgueras, 2008).

Para que se logre observar las diferentes estructuras que se mencionaron anteriormente es necesario en algunas ocasiones y en algunos tipos de hongos fitopatógenos en especial que se necesita de poder aislarlos para determinar el agente causal. (Folgueras, 2008)

El aislamiento consiste en el proceso de separación de microorganismos a partir de su sustrato natural (plantas, hojas, tubérculos, tallo raíces o suelo) para hacerlas crecer en un medio de cultivo artificial (Por ejemplo, medio PDA). El aislamiento y cultivo

persigue diversos fines, el más común en un laboratorio de fitopatología es para diagnosticar la causa de una enfermedad desconocida. (Folgueras, 2008)

El cultivo de microorganismos tiene enormes ventajas que contribuyen al conocimiento de la biología de estos. Sin embargo, hay que considerar que al cultivar un organismo: (Folgueras, 2008)

- Los hongos pueden o no formar cuerpos fructíferos en medios artificiales; estos cuerpos pueden presentar variación,
- Existen hongos que no se pueden cultivar (parásitos obligados) y otros que requieren medios complejos para su desarrollo. (Folgueras, 2008).

1.3.1.5. Principales hongos estudiados

- *Beauveria bassiana*

- DESCRIPCION

Beauveria bassiana es un hongo ascomiceto mitospórico que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a insectos de diferentes especies, causando la enfermedad blanca de la muscardina, Nombre por el cual se la conoce. Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como insecticida biológico o biopesticida controlando un gran número de parásitos de las plantas como orugas, termitas, moscas blancas, áfidos, escarabajos y tisanópteros.

- MORFOLOGIA

Es un hongo imperfecto de la clase Sordariomycetes, capaz de infectar a más de 200 especies de insectos. Es de apariencia polvosa, de color blanco algodonoso o amarillento cremoso. El ciclo de vida de este hongo consta de dos fases: la patogénica y la saprofitica. (INTAGRI S.C. , 2017)

- **TAXONOMIA**

- ✓ REINO: Fungi.
- ✓ DIVISION: Ascomycota.
- ✓ CLASE: Sordariomycetes.
- ✓ ORDEN: Hypocreales.
- ✓ FAMILIA: Clavicipitaceae.
- ✓ GENERO: Beauveria.
- ✓ ESPECIE: *Beauveria bassiana* (Vuillemin, 1912).

• *Hemileia vastatrix*

- **DESCRIPCION**

Hemileia vastatrix es un hongo del orden Pucciniales (también conocidos como Uredinales) que causa la roya en las hojas de café (CLR, por sus siglas en inglés), una enfermedad que en épocas de altas epidemias, devasta las plantaciones de café . El café sirve como el huésped obligado de la roya donde el hongo debe tener un contacto físico con la planta de café (*Coffea* sp.) para poder sobrevivir.

- **MORFOLOGIA**

La roya del café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. El micelio de este hongo se encuentra completamente dentro del mesófilo y consiste de hifas hialinas en abundancia, de aspecto tortuoso y frecuentemente ramificado en forma muy irregular; el diámetro de las hifas es bastante uniforme y oscila entre 5 y 6 mm. Presenta septas que están separadas a veces por intervalos grandes, especialmente en las hifas que crecen rápidamente. Algunas veces el contenido de las hifas tiene una coloración anaranjado-rojiza (Subero, 2005).

Las hifas crecen entre las células del mesófilo y penetran en ellas mediante ramificaciones cortas, filiformes, que terminan en expansiones ovales, reniformes o un poco irregulares, 7 a 8 x 4.5 mm, que contienen citoplasma denso con uno a dos gránulos refringentes. Estas expansiones constituyen los haustorios y sirven probablemente como órganos de absorción de alimentos. El micelio del hongo es más abundante en el parénquima esponjoso de la hoja. En las variedades más susceptibles, el micelio tiende a penetrar el tejido de empalizada y hasta puede enviar haustorios a las células de la epidermis superior (Subero, 2005). Las hifas forman unas masas entretejidas de micelio en las cavidades sub estomáticas. De estas masas crece un fascículo de filamentos finos llamados “esterigmas”, que emergen a través de las estomas, dando lugar a las esporas. La masa de esporas es bien visible a simple vista, por presentar aspecto de un polvillo anaranjado. La forma de las uredosporas maduras varía según su posición en el haz de estas estructuras. Generalmente son angostas y triangular-redondeadas en un corte transversal (Subero, 2005).

- **TAXONOMIA**

- ✓ REINO: Fungi.
- ✓ DIVISIÓN: Eumycota
- ✓ CLASE: Teliomycetes
- ✓ ORDEN: Uredinales
- ✓ FAMILIA: Pucciniaceae
- ✓ GÉNERO: Hemileia
- ✓ ESPECIE: *Hemileia vastatrix*.(Bayer, 2008).

- *Trichoderma sp.*

- **DESCRIPCION**

Estos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang et al. 2005). Algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, y otras son micoparásitas. Además, pueden colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Bissett 1991, Harman et al. 2004). Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, y su humedad y temperatura óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C. Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad.

- **MORFOLOGIA**

En cuanto a Características macroscópicas; las colonias se reconocen por su crecimiento rápido y su coloración, blancas – verdes, amarillo – verdosas; las áreas con conideas se presentan con anillos concéntricos (Arango y col, 1988; Baenett & Hunter, 1972). El revés de las colonias es usualmente no coloreado, amarillo, ámbar o amarillo – verde, y muchas especies producen grandes cantidades de clamidosporas en cultivo sumergido (Howell, 2003).

En Características Microscópicas; los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificada, no verticilada, los cuales pueden ser solitarios o en grupos. Las fialides son en forma de botella, únicas o en grupos, hinchadas en la región central pero delgada hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Las conidias son unicelulares subglobosas y oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fialides.

- **TAXONOMIA**

- ✓ REINO: Mycetae (fungi)
- ✓ DIVISION: Eumycota
- ✓ CLASE: Euascomycetes
- ✓ ORDEN: Hypocreales
- ✓ FAMILIA: Hypocraceae
- ✓ GENERO: *Trichoderma* e *Hypocrea*. Lieckfeldt et al. (1999), Samuels y Chaverri (2003), Samuels (2005)

- *Puccinia allii*

- **DESCRIPCION**

Se trata de una roya autoica y macrocíclica. Forma uredinios, con urediniosporas de forma esférica a elíptica de 23-32 x 20-26 μm . Éstas tienen las paredes hialinas a amarillentas, de superficie espinosa. Los telios, frecuentemente dispersos, tienen teliosporas de color castaño, de forma elíptica y uniseptadas, que miden 36-65 x 18-28 μm . Los ecios son escasos y llevan eciosporas esféricas a elipsoidales de 16-28 μm de diámetro.

- **MORFOLOGIA**

La roya del ajo es la enfermedad de las hojas que más daño provoca en este cultivo. Se identifica por las costras de forma circular-ovalada de 1 a 3 milímetros de largo y color anaranjado que aparecen sobre la superficie de las hojas. Cuando la infección es alta la hoja se amarillea y casi toda su superficie se cubre de un polvillo anaranjado, al que en algunos lugares denominan hierrillo, óxido, eslorra o alhorra. En fases avanzadas las costras anaranjadas adquieren un color negruzco o marrón oscuro, que se hace más patente en las hojas secas. Las condiciones favorables para el

desarrollo de esta enfermedad se producen con un 100 % de humedad relativa y con temperatura entre 10 y 18 °C. Este ambiente se da en primavera, cuando las noches son aún frescas y las serenadas frecuentes. Por ello, aparece a lo largo de los últimos meses de cultivo. Las plantas estresadas (falta o exceso de agua) y las sometidas a dosis excesivas de nitrógeno son más sensibles a la enfermedad. No todas las variedades muestran la misma sensibilidad a la roya. Los ajos grandes o ajos porros se ven también bastante afectados.

- **TAXONOMIA**

- ✓ REINO: Fungi, Filo Basidiomycota
- ✓ DIVISION: Eumycota
- ✓ CLASE: Urediniomycetes
- ✓ ORDEN: Urediniomycetes
- ✓ FAMILIA: Pucciniaceae
- ✓ GENERO: Puccinia
- ✓ ESPECIE: Puccinia alli (CROP SCIENCE CHILE, 2017)

- *Phytophthora cinnamomi*

- **DESCRIPCION**

Phytophthora cinnamomi es un oomicete que produce una fitopatología (micosis) llamada tinta del castaño. Vive en el suelo nutriéndose gracias a materias en descomposición, e inicia su destrucción por las raíces más pequeñas, avanzando de forma centrípeta con el fin de destruir el núcleo del árbol y su sistema conductor. Está incluido en la lista 100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

"Infección de *Phytophthora cinnamomi*" Este daño de Micosis radicular frondosa, Comienza con el daño de las raíces absorbentes(secundarias), causando su pudrición. Mediante las zoosporas invaden las raíces estructurales (primarias) y a partir de aquí se expande al tallo mediante el micelio. (Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. 2000).

- **MORFOLOGIA**

La enfermedad causa un progresivo decaimiento que eventualmente conduce a la muerte de los árboles severamente atacados. Inicialmente, la planta presenta defoliación parcial y clorosis que se manifiesta de forma leve a moderada. El crecimiento vegetativo se detiene y, por ende, la producción de fruta, lo cual afecta tanto la calidad como la cantidad de los frutos. Al examinar las raíces, se puede evidenciar necrosis y pudrición parcial o total de las raicillas (Besoain et al. 2005).

- **TAXONOMIA**

- ✓ REINO: Protista
- ✓ DIVISION: Oomycota
- ✓ CLASE: Oomycetes
- ✓ ORDEN: Pythiales
- ✓ FAMILIA: *Phytophthora*
- ✓ GENERO: *Phytophthora*
- ✓ ESPECIE: *P. cinnamomi* (Rands 1992)

1.3.2. BACTERIAS

Son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida

intracelular obligada, como Chlamydias y Rickettsias. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento. Las bacterias integran el reino procariota (pro de primitivo y cariota de núcleo). Todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y procariotas. Tienen estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética, (Mayea et al, 1998).

Dentro de este esquema, las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas. En este reino, según criterios evolutivos, diferenciamos el grupo de las eubacterias y el de las arqueobacterias. Este último comprende bacterias sin peptidoglicano como las anaerobias que viven en condiciones ácidas calientes, las que viven en condiciones salinas y las que reducen el anhídrido carbónico (CO_2) a metano, (Mayea et al, 1998).

1.3.2.1. Características generales de las bacterias

Como característica principal, los procariotas no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear, a diferencia de los eucariotas. También es importante destacar que el ADN procariota es circular y cerrado, mientras que el eucariota se organiza en cromosomas individuales y se asocia a proteínas de tipo histonas. Las bacterias poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano (a excepción de los Mycoplasmas) mientras que las células eucariotas no tienen este tipo de pared (la pared celular de los vegetales es de celulosa), (Mayea et al, 1998).

La reproducción en los eucariotas puede ser tanto sexuada como asexuada, mientras que los procariotas se reproducen por división simple (forma asexuada). El tamaño de la célula eucariota es mayor que el de la procariota. Los procariotas no poseen citoesqueleto, a diferencia de los eucariotas. Otra diferencia es la presencia de fimbrias o pilis en las bacterias, (Mayea et al, 1998).

Los procariotas pueden poseer flagelos, mientras que los de los eucariotas si los poseen, éstos tienen una estructura más compleja. Por último, mencionar que mientras las células eucariotas se reproducen por mitosis, las células procariotas lo hacen por fisión binaria. En dicho proceso la célula crece, se forma un tabique y finalmente se desprenden dos células nuevas. En este proceso se produce también la replicación del ADN, de forma que las células hijas contienen cada una un duplicado idéntico del genoma de la progenitora, (Mayea et al, 1998). (Figura 05).

1.3.2.2. Morfología de las bacterias

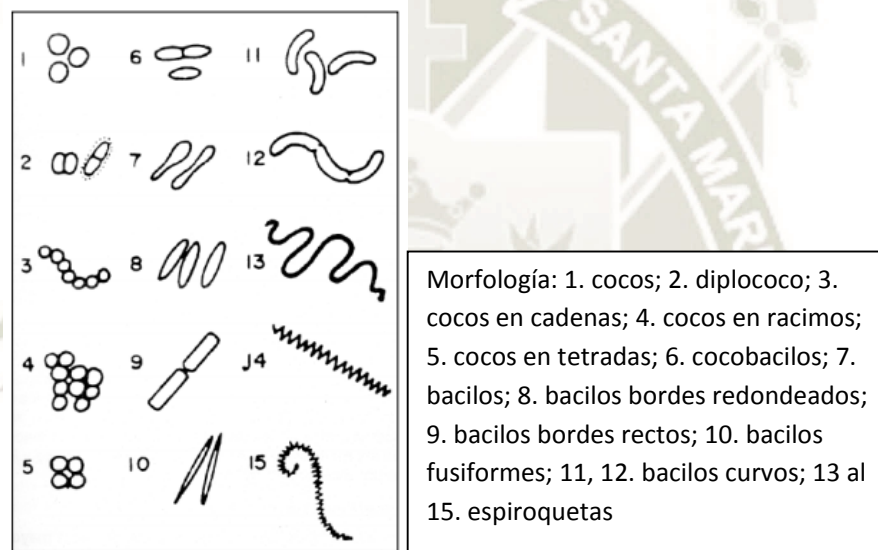


FIGURA 05. Morfología de las bacterias (Prescott, et al., 1999)

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esférica u ovalada), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral); dentro de estas últimas se encuentran: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*. Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en

tétradas o en racimos (*Staphylococcus*). Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas (*Corynebacterium*). Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (*Vibrio cholerae*), (Prescott et al, 1999).

1.3.3. METODOS DE SIEMBRA AGENTES FITO PATOGENOS

1.3.3.1. Siembra por estrías

Este método de siembra se realiza sobre la superficie de los medios de cultivo sólidos distribuidos en placas de petry o en tubos de ensayo solidificados en forma de cuña. (Slam)

Instrumentos de siembra a emplear.

Para la siembra por estría se utiliza el asa de platino o el hisopo. En algunas ocasiones, como explicaremos más adelante, se utilizan ambos instrumentos en la misma siembra, (Gonzales, 2004).

1.3.3.2. Siembra por punción

Como es obvio, el instrumento de siembra a emplear será la aguja de platino y el medio de cultivo sólido, generalmente, en tubo de ensayo. Las manipulaciones y la observancia de las precauciones de asepsia, son similares que cuando se utiliza el asa. La particularidad que tiene este método, es que la aguja (con el inóculo) debe atravesar perpendicularmente el medio de cultivo, (Gonzales, 2004).

1.3.3.3. Siembra volumétrica

Este método de siembra consiste en sembrar una muestra líquida cuyo volumen no puede ser predeterminado, en medio de cultivo sólidos o líquidos. Por ejemplo: En las muestras de exudado vaginal tomadas con pipetas de Pasteur, no puede determinarse el volumen, ya que este tipo de pipeta carece de escala de graduación, sin embargo, la orina empleadas en el urocultivo o la sangre para el

hemocultivo se puede determinar con pipeta o jeringuilla respectivamente el volumen que será sembrado, (Gonzales, 2004).

1.3.3.4. Siembra masiva

Cuando se desea realizar una siembra masiva se puede utilizar la espátula de Driglaski. En este caso la gota de muestra líquida se esparce con la espátula por toda la superficie del medio de cultivo sólido imprimiendo un movimiento en espiral. La siembra masiva también se puede realizar con un hisopo grueso embebido de un cultivo líquido, procediendo a su deslizamiento sobre toda la superficie de una placa de agar, (Gonzales, 2004).

1.3.4. MEDIOS DE CULTIVO PARA LABORATORIO

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Se puede añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras. (Gonzales, 2004).

Los medios pueden ser sólidos o líquidos. Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo, sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado. La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas). El agar empieza a derretirse a partir de 80 o C° y soporta temperaturas altas sin descomponerse, solidificándose entre los 35 y 50 o C. Los

medios de cultivo se vierten en placas Petri o en tubos inclinados. (Gonzales, 2004).

Los primeros ofrecen la ventaja de tener mayor superficie para el desarrollo del hongo y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamientos, aspecto del cultivo, velocidad de crecimiento, etc. sin embargo, son más fáciles de contaminarse. Los tubos, a pesar de tener una superficie mucho más reducida, ofrecen seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación. Se utilizan para conservar cultivos por tiempo más o menos prolongado. Los medios se seleccionan en base al tipo de muestra que queremos reproducir. (Gonzales, 2004).

El pH recomendado para el cultivo de hongos en el laboratorio es de alrededor de 7, un pH neutro o ligeramente ácido (6.8). Para seguridad del que opera y evitar contaminaciones, los medios de cultivo se deben manipular en campanas de flujo laminar (Figura 3). A continuación, se describen los medios de cultivo mayormente utilizados y su composición. (Gonzales, 2004).

1.3.4.1. Agar agua

Es un medio pobre en el cual el micelio crece en forma muy rala. Es especialmente usado para hacer aislamientos de punta de hifa. De acuerdo a la consistencia que se quiera dar al medio, se puede hacer con mayor o menor cantidad de agar. (Gonzales, 2004).

- ✓ Agar 10 g
- ✓ Agua destilada 1 litro

1.3.4.2. Papa dextrosa agar (PDA)

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) y *Metarhizium*, los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio. Cuando se aíslan hongos a partir de insectos colectados del suelo, es recomendable acidificar el medio con ácido láctico al 25%. Se agregan 3 ó 4 gotas sobre el agar

solidificado de la placa con el objeto de evitar el desarrollo de bacterias. (Gonzales, 2004).

Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PD), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva.

Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. (Gonzales, 2004).

- ✓ Papa sin pelar 200 g
- ✓ Dextrosa 10 g
- ✓ Agar 18 g
- ✓ Agua destilada 1 litro

1.3.4.3. Fito levadura

Este medio se usa para aislar hongos a partir de animales. Los hongos aislados de insectos crecen exuberantemente con micelio bien algodonoso y buena producción de esporas. (Gonzales, 2004).

- ✓ Dextrosa 20 g
- ✓ Extracto de levadura 5 g
- ✓ Peptona 5 g
- ✓ Agar 18 g
- ✓ Agua destilada 1 litro

1.3.5. MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO DE AGENTES FITOPATÓGENOS A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL

La mayoría de las enfermedades de las plantas se diagnostican al observarlas a simple visto o mediante el microscopio, lo cual hace innecesario el aislamiento del patógeno. Sin embargo, hay muchas enfermedades bacterianas y fungosas en las que es imposible identificar al patógeno que ya se encuentra mezclado con uno o más contaminantes, porque aún no ha producido sus cuerpos fructíferos característicos y esporas, debido a que una misma enfermedad puede

deberse ya sea a uno o a varios patógenos morfológicamente semejantes o tal vez a algún factor del ambiente, o bien a que la enfermedad es causada por un nuevo patógeno hasta ese momento desconocido, el cual debe aislarse y estudiarse. Como es habitual, los patógenos de enfermedades desconocidas deben aislarse de los tejidos enfermos de una planta a fin de que se pueda llevar a cabo un estudio de sus características, hábitos, etc. (Gonzales, 2004)

1.3.5.1. PREPARATIVOS PARA EL AISLAMIENTO

Siempre que se desee aislar una bacteria o un hongo patógeno de los tejidos de una planta enferma, deben llevarse a cabo los siguientes procedimientos preliminares (Figura 06)

- ✓ Esterilización del material de cristalería (autoclave)
- ✓ Eliminación de contaminantes que pudieran influir en el análisis.
- ✓ Preparación del medio de cultivo (Agrios, 2005)

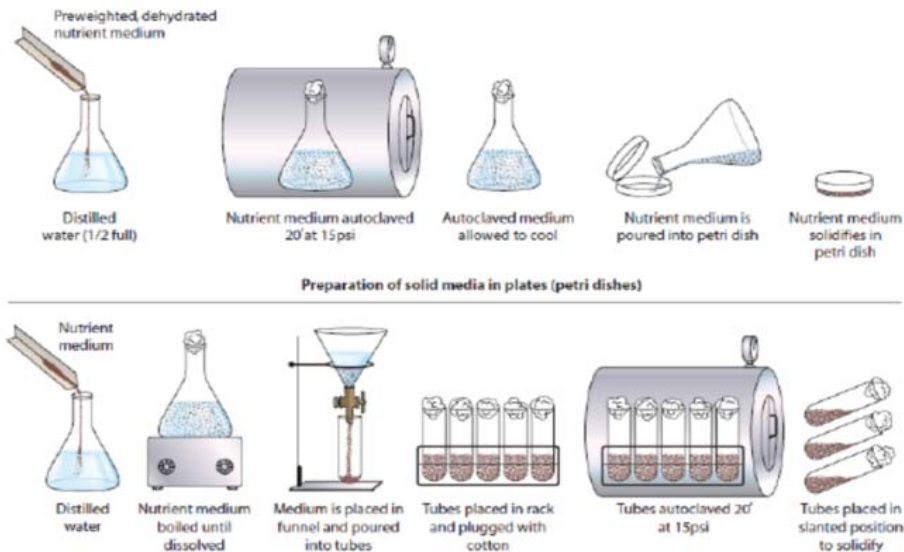


FIGURA 05. AGRIOS (2005). Ilustración de Preparación de medios de cultivo sólidos en placas (cajas de Petri) y tubos de ensayo inclinados.

1.3.5.2. Aislamiento de hojas

En caso de que la infección de las hojas de una planta avance en forma de tizón o mancha foliar fungosa y en caso de que las esporas

del hongo aparezcan sobre su superficie, algunas de esas esporas deben depositarse sobre una caja de Petri que contenga medio de cultivo. (Gonzales, 2004)

En ocasiones, el aislamiento del patógeno a partir de tizones y manchas foliares bacterianas o fungosas se logra mediante la esterilización superficial de la zona infectada con soluciones de Cloro o de Rada, separando una pequeña porción del tejido infectado con un escalpelo estéril u otro objeto y colocándola en una caja de Petri que contenga un medio nutritivo. Sin embargo, el método más común para aislar a los patógenos de las hojas infectadas y de otros órganos de la planta es aquel en el que se seleccionan varios cortes pequeños de 5 a 10mm² a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos. (Gonzales, 2004).

Los cortes esterilizados en su superficie durante menos tiempo generalmente contienen al patógeno y a varios contaminantes, mientras que los que se han esterilizado durante más tiempo no permiten el desarrollo de cualquier tipo de microorganismos debido a que han sido destruidos por el esterilizante de superficie. (Gonzales, 2004).

1.3.5.3. Aislamiento a partir de tallos, frutos, y otros órganos aéreos de la planta.

La mayoría de los métodos que se han descrito para aislar bacterias y hongos patógenos de las hojas, pueden también utilizarse para aislar esos mismos patógenos de las infecciones superficiales de los tejidos mencionados. (Gonzales, 2004).

1.3.5.4. Aislamiento a partir de raíces, tubérculos, raíces carnosas y frutos de hortalizas que se encuentran en contacto con el suelo.

El aislamiento de los patógenos de cualquier tejido vegetal enfermo que se encuentre en contacto con el suelo, presenta una serie de problemas adicionales que ocasionan numerosos organismos

saprófitos que invaden el tejido después de que ha sido destruido por el patógeno, (Figura 07). (Gonzales, 2004).

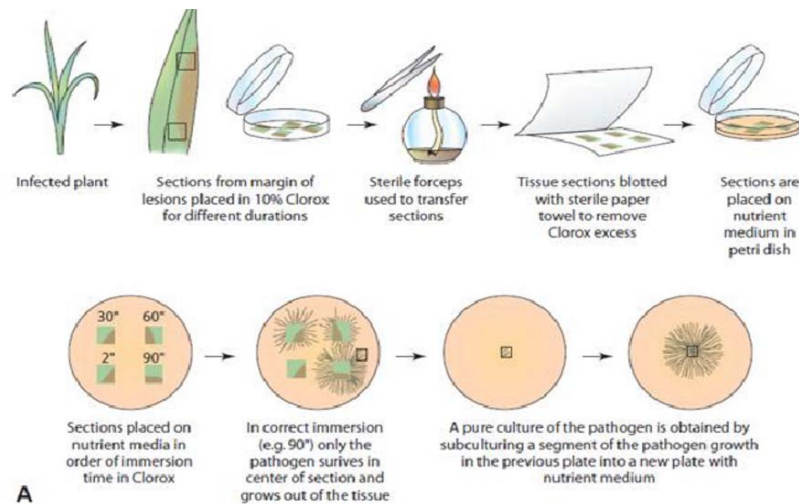


FIGURA 06. Agrios (2005). Ilustración de Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada.

1.3.6. SIEMBRA DE AGENTES FITO PATOGENOS

1.3.6.1. Siembra de hongos

La siembra se realiza con el fin de aislar o repicar los hongos para su uso inmediato o para mantenerlos viables por un tiempo corto. La siembra o aislamiento en cultivo puro consiste en dejar crecer el hongo elegido bajo condiciones en las que pueda desarrollar y esporular convenientemente. Para ello es necesario verter el medio de cultivo, dejarlo enfriar, acidificarlo –si fuera necesario– y colocar una pizca del hongo a sembrar. Se realiza por medio de una aguja o de un ansa, ya sea por un simple toque o por rayado continuo. Generalmente para la siembra se usan placas, tubos y frascos. Después de la siembra se sellan las placas, tubos y frascos, se coloca la fecha y se incuba durante el tiempo conveniente hasta que se vea que el hongo ha crecido y está esporulando. (Agrios, 2005).

1.3.6.2. Siembra de bacterias

El método de siembra a emplear dependerá de los objetivos que se pretendan alcanzar con el cultivo, ya que en ocasiones se requiere que el desarrollo del microorganismo se produzca de forma masiva, mientras que en otras resulta indispensables que las colonias queden aisladas o que las manifestaciones del metabolismo tengan lugar con tensiones reducidas o privadas de oxígeno, los métodos de siembra más empleados son los siguientes: (Agrios, 2005).

- ✓ Siembra por estrías.
- ✓ Siembra por punción.
- ✓ Siembra volumétrica.
- ✓ Siembra masiva.

1.4. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS

A. **GAVIDIA, A., 2009**, realizó una investigación cuyo objetivo fue diseñar una cámara de flujo laminar horizontal para la producción de plantas *in vitro*, que se realizó en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para optimizar una parte del proceso de producción de estas plantas, ya que en un futuro se desea emprender un plan agresivo de producción de plantas nativas de la zona.

Para el diseño se realizaron pruebas donde se evaluó las condiciones de asepsia dentro de un equipo de experimentación, mediante simulación de manipulaciones en medios de cultivo. Se identificó las variables de proceso (equipo), y resolvió los cálculos de ingeniería, para el dimensionamiento, características y presupuesto económico. En el diseño, la cámara de flujo laminar tiene medidas generales de 1300 x 750 x 1100 mm (Largo x Fondo x Alto), Su estructura es de acero inoxidable AISI 304, está compuesta por: un ventilador centrífugo para el sistema de flujo de aire, un pre filtro de poliéster de 600 x 30 x 600 mm, filtro ULPA 914 x 610 x 66 mm, un sistema de luz ultra violeta para el control de la contaminación superficial y la descontaminación de la zona de trabajo entre periodos de funcionamiento.

Con este diseño del equipo se obtiene un flujo laminar de aire purificado con una eficiencia 99,99% que viaja a través de la zona interior en forma horizontal, unidireccional a una velocidad nominal de 0,40 m/s y es eliminada a través del área principal de trabajo frontal de la cabina dando una protección óptima del producto.

B. **TAMAYO, J., 2009**, indica que la multiplicación de tejidos *in vitro* es una técnica muy utilizada para la propagación de especies vegetales. Para su implementación, se requiere de un estricto control de asepsia en cada paso del proceso, siendo ésta la medida más importante para el éxito de la multiplicación. La práctica y enseñanza de la técnica bajo condiciones de laboratorio implica el uso de equipos especializados fundamentales, como son las cámaras de flujo laminar, y de la misma manera se deben realizar procedimientos de desinfección y controlar el flujo de personal a las áreas de transferencia. La enseñanza de las técnicas de multiplicación *in vitro* a grandes grupos y en un aula, tiene como limitante la dificultad de contar con equipos e infraestructura adecuados para todos los estudiantes, que garanticen la asepsia de los materiales y la facilidad de manejo de los mismos a mediano o largo plazo. La posibilidad de establecer alternativas de multiplicación viables que puedan ser usadas con grandes grupos y que se puedan implementar bajo condiciones limitadas toma gran importancia. Debido a esto, y para simular las condiciones de uso de cámaras de flujo laminar, se propone el uso de cámaras es portátiles (CAP), las cuales han sido diseñadas, evaluadas y presentadas por los autores dentro del laboratorio de Ciencias y Recursos Naturales de la Universidad EARTH en Guácimo, Limón, Costa Rica. La cámara portátil ha sido elaborada con materiales reutilizables, de fácil adquisición, y fueron evaluadas con especies como lechuga, repollo, mostaza, violetas, achiote, gloxíneas y orquídeas con fines didácticos y experimentales; contaron con adecuación metodológica, considerando los requerimientos de asepsia de los materiales y las posibilidades del mismo durante el proceso de evaluación.

C. **MICHELL J., 2015**, señala que la Medicina Veterinaria es una de las especialidades que permite contribuir en la solución de problemas en el sector pecuario y brindar un servicio el cual se permita resolver problemas que se presentan a diario en el campo pecuario. Indica que, para el manejo eficiente, buen uso en el funcionamiento y mantenimiento de los equipos de laboratorio, es necesario la capacitación, para ayudar y complementar el manual del fabricante.

El concurrente trabajo de exploración se ha realizado con el propósito de definir los problemas que existen y las opciones de solución a los mismos, en función de los requisitos de una guía para el desenvolvimiento de las actividades dentro del Laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria. El elaborar el manual de funcionamiento, mantenimiento y plan de renovación de los equipos Cámara de Flujo Laminar e Incubación, se realizó con el fin de diagnosticar cada uno de los equipos, su funcionamiento adecuado que fue realizado en el Laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria.

D. **OVIEDO, U., 2014**. En su trabajo nos da a conocer los resultados obtenidos durante la cualificación de los equipos de tratamiento de aire, con el fin de demostrar documentalmente para su uso previsto dentro de los rangos de trabajo definidos por la Normativa Vigente.

- **TEST DE INTEGRIDAD EN FILTROS ABSOLUTOS HEPA/ULPA**

Objetivo: Demostrar la ausencia de fugas en los filtros absolutos instalados en el equipo:

- En la junta situada entre el marco del filtro y el equipo.
- Entre el medio filtrante y el marco del filtro.
- En el medio filtrante.

- **ENSAYO DE VELOCIDAD Y UNIFORMIDAD DEL AIRE**

Objetivo: Determinar la velocidad promedio del aire de impulsión, la uniformidad del flujo del aire en el interior de la cabina y cuando sea aplicable la velocidad frontal y de extracción.

- **CONTAJE DE PARTICULAS**

Objetivo: Verificar que se ha alcanzado el grado previsto de limpieza del aire en el equipo.

- **TEST DE VISUALIZACIÓN DEL FLUJO DE AIRE**

Objetivo: Estudiar la direccionalidad del aire mediante el comportamiento del humo generado en la cabina, con el fin de comprobar su estanqueidad o de localizar posibles “zonas muertas” en su interior.

- **VERIFICACIÓN FUNCIONAMIENTO DE LOS MANDOS DE CONTROL DEL EQUIPO**

Objetivo: Comprobar visualmente el correcto funcionamiento de todos los elementos (interruptores, indicadores, etc.) existentes en el equipo.

- **DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE LUMINOSIDAD**

Objetivo: Comprobar los niveles de luminosidad que se alcanzan en el interior del equipo.

- **DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE RUIDO**

Objetivo: Comprobar qué niveles de ruido se alcanzan en el equipo.

E. **DIANA, M., 2010**, indica que la Sigatoka negra, destructiva enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es la principal limitante fitosanitario en la producción de musáceos comestibles en Ecuador y en todas las zonas productoras del mundo, la cual reduce los rendimientos, que pueden superar el 50 % y tornar la fruta no apta para la exportación al causar su madurez prematura. Para su control son utilizados fungicidas de síntesis química que tienen un efecto adverso en el ambiente.

El objetivo del presente estudio fue buscar microorganismos con capacidad antagónico del hongo *M. fijiensis* a partir de muestras de tejido

foliar y suelo con hojarasca de plantaciones de musáceas que fueron colectadas de varias localidades de las provincias del litoral ecuatoriano. Se aislaron 57 cepas de hongo del genero *Trichoderma* spp. Y 177 cepas de bacterias quitinolíticas, en las que fue necesaria la obtención y utilización de quitina coloidal a partir de exoesqueletos de camarón para identificar las cepas con esta característica. Los microorganismos fueron evaluados en laboratorio. En el caso de cepas de hongos, estas fueron enfrentadas a colonias *M. fijiensis* en una prueba de hiperparasitismo, mediante la cual se seleccionaron cuatro cepas para su evaluación en invernadero. Las cepas de bacterias se evaluaron en medio de cultivo agar nutriente quitina (ANQ), en el que se midió la amplitud del halo transparente por efecto de la degradación de quitina, de las cuales 26 cepas mostraron la mayor producción de quitinasa con un promedio de 45,25 mm de amplitud del halo a las 120 horas de su siembra en ANQ, de las cuales se seleccionaron 19 cepas que luego fueron evaluadas en una prueba invitro frente a ascosporas del hongo causal, cuyos resultados mostraron el alto efecto inhibitorio de dos cepas MA04608 Y LR06208, con 99.54 y 97.75 % en su orden. En vista de haberse observado el gran potencial de biocontrol de estas bacterias para su evaluación en invernadero, se seleccionaron 14 que mostraron mayor porcentaje de inhibición de los tubos germinativos de las ascosporas del hongo y 7 por la producción de quitinasa antes de las 24 horas.

Se instalaron dos ensayos de invernadero, uno de plantas de banano y otras de plátano, ambos casos con plantas de 5 meses de edad, donde se evaluaron 30 tratamientos con 6 repeticiones .se realizaron 5 aplicaciones de los tratamientos a una frecuencia de 10 días y 7 evaluaciones de las hojas 1 y 2 aplicadas mediante la escala de Stover modificada por gahul. Además, se evaluó el número de lesiones en la segunda hoja aplicada y el ritmo de emisión foliar de las plantas. El tratamiento químico tuvo el mayor porcentaje promedio de control con 82.15 %; entre las cepas de bacterias, las 10 con mayor porcentaje de control respecto al testigo fue: MA01908, EO00608, MA02508, LR03908, GU00808, EO00108, MA02008, GU03008, LR05308,

MA04608, con valores de 62.45, 58.96, 56.52, 55.07, 50.76, 50.2, 49.16, 47.8, 42.99 y 42.45 % en su orden. Entre las cepas del hongo trichoderma spp. Evaluadas, las cepas TMA00408 mostro el mayor porcentaje de control con un 55.40%, le siguió la cepa TCA00308, con 25.12 %. El porcentaje de control de las cepas de bacterias en la hoja 1 aplicada de plantas de banano fue de 27.06% y en la hoja 2 aplicada fue de 55.58%; en plátano en la hoja 1 aplicada 34.28% y en la hoja de 48.58%.

De los microorganismos evaluados se seleccionaron por su mejor efecto control 10 cepas de bacterias y 2 de hongos trichoderma spp. ; con estas cepas se realizó la evaluación invitro de compatibilidad a fungicidas a 4 concentraciones de i.a (0, 10, 100 y 1000 ppm) de ocho de los principales fungicidas (Calixin, Tilt, Sico, Bankit, Opal, Volley, Regnum, Cumoral) utilizadas para el control de la enfermedad en Ecuador determinándose diversos niveles de compatibilidad en cada caso, el fungicida Cumora (Boscalit) demostró la mayor compatibilidad con las dos cepas evaluadas hasta en 1000 ppm, lo opuesto a regnum (pyraclostrobin), en el cual se determinó incompatibilidad total con ambas cepas en todas las concentraciones. Se encontró que todos los fungicidas fueron compatibles con las cepas de bacterias al no observarse presencia de halo de inhibición en ninguna concentración de ingredientes activos.

CAPITULO III

1. MATERIALES Y METODOS

1.1. UBICACIÓN DEL AREA EXPERIMENTAL

La Cámara de flujo horizontal fue diseñada y construida en el Centro de la Ciudad de Arequipa y trasladada y puesta en funcionamiento, en el Fundo “La Banda” Huasacache , perteneciente a la Universidad Católica de “Santa María” en el Anexo de Huasacache, Distrito de J.D. Hunter, Provincia y Región Arequipa, ubicado geográficamente a $16^{\circ} 27' 51''$ Latitud Sur, $71^{\circ} 34' 30''$ Longitud Oeste y a una altitud de 2 210 m.s.n.m, (Fotografía 01).



FOTOGRAFÍA 01. Fundo “La Banda”, Huasacache, Hunter. Fuente: Google earth

1.2. FECHA DE INICIO Y TÉRMINO

La elaboración de la Cámara de Flujo se inició en junio del 2017 y con el cultivo de microorganismo en diciembre del 2017

1.3. COMPONENTES EN ESTUDIO

- Diseñar, construir, instalar y poner en funcionamiento una cámara de flujo laminar vertical
- Aislar los diferentes hongos *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Hemileia vastatrix* y *Puccinia allii*

1.4. MATERIALES EMPLEADOS Y METODOLOGIA SEGUIDA

1.4.1. MATERIALES EMPLEADOS

a) Materiales de campo

- Navajas
- Lupas
- Papel kraft
- Recipientes
- Bolsas
- Agua
- Lejía
- Machete
- Papel toalla
- Tijeras
- Rotulador
- Etiquetas

b) Material de Laboratorio

- Placas Petri
- Agua destilada
- Pipeta
- Bagueta o varilla
- Matraz

- Papel toalla
- Pinzas
- Bisturí
- Medio de cultivo (agar, papa dextrosa)
- Alcohol
- Autoclave
- Estufa
- Colador
- Papel aluminio
- Papel film
- Algodón
- Ligas
- Punzon
- Mecheros
- Microscopio

c) Material Biológico

- Órganos de diferentes plantas con síntomas y signos de enfermedades causadas por hongos y bacterias.

d) Material de Escritorio

- Libreta
- Lapiceros
- Etiquetas
- Marcador indeleble
- Computadora
- Impresora

e) Material para construcción de Cámara

- Filtro hepa
- Ventilador
- Kit de luces uv estándar
- Pre filtro

- Luminaria
- Planchas de acero inoxidable
- Base de enchufe
- Pernos de acero inoxidable
- Tubo cuadrado de acero inoxidable policarbonato
- Ángulos de acero inoxidable
- Manómetro
- Barra de acero de 12mm
- Pegamento para plástica
- Cordel
- Soldadura
- Electrodo
- Espuma
- Jebe
- Planchas de Policarbonato
- Acrílico
- Manijas
- Cables
- Cuchilla eléctrica
- Pulsadores
- Cinta
- Silicona
- Taladro
- Esmeril
- Materiales de Seguridad
- Extensión

1.4.2. METODOLOGIA DE CONSTRUCCION

1.4.2.1. Diseño y construcción de la cámara de flujo laminar

- a) Se diseñó sobre un plano la Cámara de flujo laminar, donde se observa que las medidas en el Plano son:
 - Altura: 1,400 m
 - Largo: 1,235 m

- Ancho: 0,65 m (Fotografía 02)



FOTOGRAFIA 02. Cámara de flujo laminar instalada en el Laboratorio.

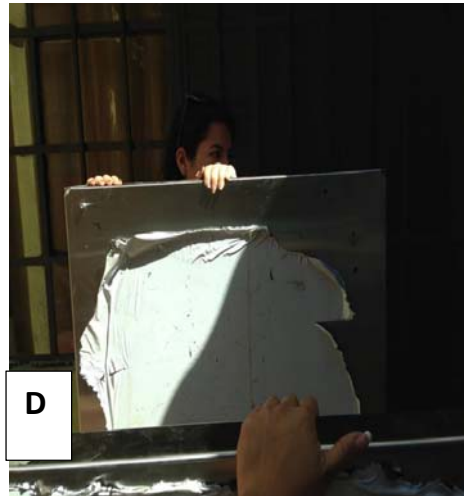
- b) Se cotizó y se realizó la compra de materiales. (Fotografía 03)



FOTOGRAFÍA 03. Planchas de acero inoxidable embalado

- c) Se realizó los trazos para hacer plegados en todos los bordes al igual que en las esquinas.
- d) Se hizo el plegado y soldado en las esquinas para lograr una mayor firmeza.

- e) Se procedió a lijar todas las partes soldadas para que éstas tengan un mejor acabado. (Fotografía 04).
- f) Se ejecutó el armado de la cámara, para esto se emplearon pernos de acero inoxidable. Estos se utilizaron en todas las esquinas y los medios de la parte media y baja. El armado de la cámara se puede observar en el (Anexo 03).

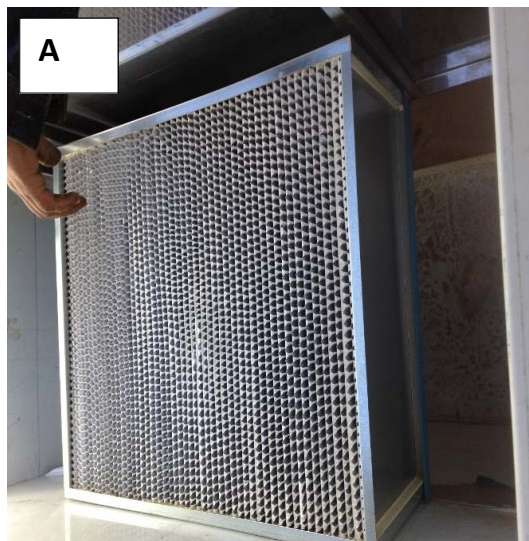


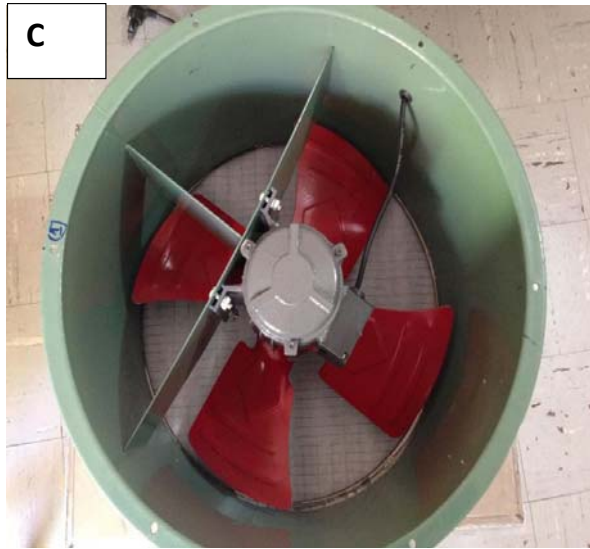
FOTOGRAFÍA 04. A,B,C,D: Armado de la Cámara de Flujo laminar en el Taller

- g) Una vez armadas las paredes se procedió a colocar el filtro, pre filtro y ventilador. Esto se hizo con la ayuda de ángulos, los cuales permitieron un mayor soporte. (Fotografía 05, Fotografía 06).



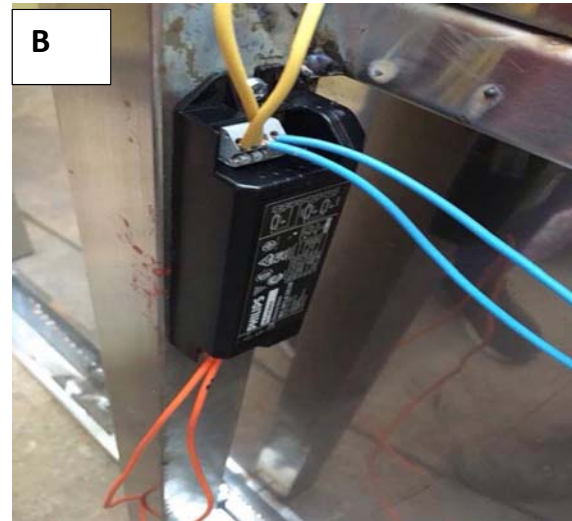
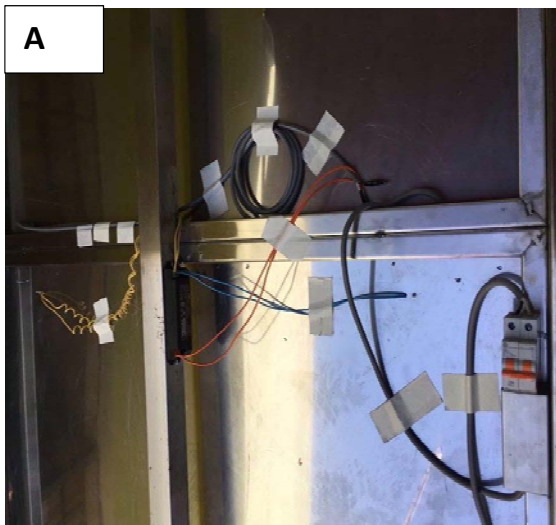
FOTOGRAFÍA 05. A, B: Unión de planchas de acero con pernos inoxidables





FOTOGRAFIA 06. A,B,C,D: Filtro HEPA y ventilador centrífugo

h) Finalmente se efectuó la instalación del kit de luminaria, al igual que todos los accesorios necesarios, (Fotografía 07).





FOTOGRAFÍA 07. A,B,C,D: Instalaciones eléctricas con luz ultravioleta

- i) Del taller, la cámara fue trasladada al Fundo “La Banda” en Huasacache y luego al Laboratorio en el Tercer Piso (Fotografía 08 y Fotografía 09). En el (Anexo 03) podemos observar más fotografías de la instalación en laboratorio.



FOTOGRAFIA 08. Traslado de la Cámara del Taller hacia Fundo “La Banda”



FOTOGRAFIA 09. Grúa para elevar la Cámara del Primer Piso al Laboratorio en el Tercer Piso.

1.4.2.2. Aislamiento de microorganismos

a) Asepsia

Se tuvo cuidado en la limpieza del material y del laboratorio para realizar trabajos confiables. El medio ambiente se encuentra, generalmente, cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el ámbito de trabajo, por ello es conveniente no descuidar la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para el trabajo. Los materiales de vidrio y cualquier otro elemento deben estar profundamente limpios antes de comenzar el trabajo.

b) Lavado

Durante los trabajos con microorganismos, específicamente hongos, es necesario y fundamental trabajar con mucha asepsia, debido a

que es indispensable el mantenimiento de los cultivos puros. Por lo tanto, es conveniente que luego de lavar todo el material de vidrio, éste sea enjuagado dos veces con agua destilada, para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado.

c) Esterilización

La esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivo nos aseguró un estado de asepsia que permitió trabajar sin dificultades cuando se ejecuta en forma eficiente. La forma más común de esterilización es por medio del calor seco o húmedo. La esterilización por calor seco se consigue con el uso de un horno o estufa y es útil en el caso de esterilizar placas petri y otros materiales de vidrio. La temperatura a la que se sometió el material durante 90 a 120 minutos, debe fluctuar entre 160 y 180 °C. Es eficaz, siempre y cuando se deje espacio libre para que el aire caliente circule alrededor de los materiales.

La esterilización por calor húmedo o a presión de vapor de agua se consigue con el uso de una autoclave. A mayor presión, mayor es la temperatura de ebullición del agua; cuando la presión aumenta a 15 libras (dos atmósferas), la temperatura llega a 121.6 °C.

No existe microorganismo que tolere esta temperatura durante 15 minutos. El tiempo es el factor que permite que el calor penetre en la masa de esterilización y se absorba. Cuando se esterilizan medios de cultivo en frascos de vidrio, se debe asegurar que éstos ocupen no más de las tres cuartas partes del frasco para permitir una ligera ebullición sin derramarse, por lo mismo, las tapas deben colocarse ligeramente sueltas. Los frascos Erlenmeyer se deben taponar con algodón para permitir la circulación del vapor. Los tubos de ensayo conteniendo medio, se deben colocar en una gradilla o rejilla.

1.4.2.3. Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento)

Cuando se trabaja con hongos, es necesario tener los ambientes de trabajo, así como los utensilios, materiales de vidrio, etc. en completo

estado de asepsia. Existe un conjunto de procedimientos para eliminar o reducir la contaminación por microorganismos ya sean hongos entomopatógenos, fitopatógenos, patógenos del hombre, saprofitos, etc. que puedan interferir con el trabajo que se desea realizar. Éstos pueden estar flotando en el aire, depositados sobre las superficies de trabajo y del ambiente como paredes, techos, estantes, entre otros.

El alcohol es muy utilizado en trabajos de laboratorio para desinfectar la superficie de la cámara de flujo laminar, así como las superficies de trabajo. Los alcoholes actúan desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agentes deshidratantes.

Para reducir la contaminación en el ambiente de trabajo, se pueden realizar aplicaciones de sustancias antisépticas como el Timol.

Preparación:

- **Preparar una solución de 1 gramo de Timol (2-Isopropyl-5-methylphenol) en 1 litro de agua**

Esta solución se asperja sobre muebles, paredes, etc. y todo aquello que forma parte del interior del laboratorio.

- **Precauciones al aplicar**
 - Evitar que caiga sobre la piel y los ojos, de ser así lavar bien con agua corriente.
 - Evitar inhalarlo.
 - Luego de aplicar, dejar la habitación totalmente cerrada.
 - No aplicar sobre alimentos.
 - Aplicar sobre toda superficie del laboratorio: paredes, muebles, pisos, zócalos, etc
 - El operador debe estar provisto de máscara, guantes y toda protección posible.
 - La operación de aplicación no debe durar más de 10 minutos.

1.5. PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO, PLAQUETEO Y AISLAMIENTO.

1.5.1. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO "AGAR PAPADEXTROSA"

- Se preparó dos tipos de medio de cultivo, uno comercial y el medio convencional.

1.5.1.1. MEDIO COMERCIAL

- Este medio se obtuvo de una Distribuidora de Productos Químico
- Para su preparación se necesita disolver 39gr/l.
- Procedimiento:
- Poner 1 litro de agua destilada en un vaso precipitado y llevar a la estufa, esperar que esta llegue a punto de ebullición y agregar el medio poco a poco, agitando con una bagueta evitando que se formen grumos, en caso contrario colar la muestra.
- Pasar el medio a una fiola, tapar herméticamente con algodón y papel aluminio. Llevar el medio a la autoclave, para la esterilización. Como se puede observar en las (Fotografías 11, 12, 13,14 y15).



FOTOGRAFÍA 10. Tomando cantidades exactas para disolver el medio (DIPROQUIM). 39gr/1l.



FOTOGRAFIA 11. Esperando que el agua entre en su punto de ebullición.



FOTOGRAFÍA 12: Disolviendo el medio.



FOTOGRAFÍA 13. Medio preparado instantáneamente listo.



FOTOGRAFIA 14. Medio en la autoclave para la esterilización.

1.5.2. MEDIO

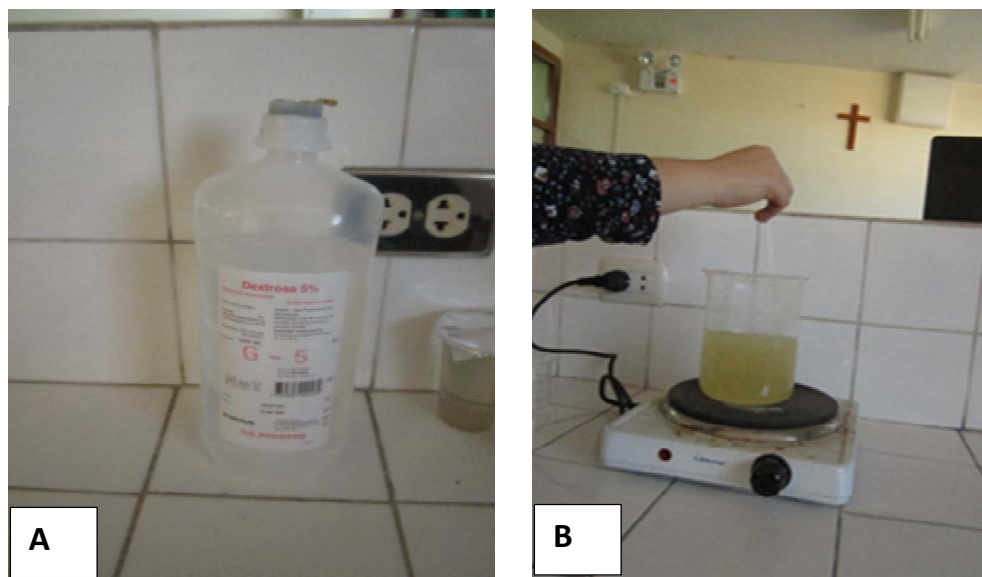
- Para preparar este medio se utilizó, 200 g. de papa, 15 g. de Agar-Agar, 20 g. de dextrosa o glucosa y 2 g. de levadura.

- **Preparación:**

Se cortó y se puso a hervir la papa en 500 ml. De agua destilada durante 10 – 15 min. El extracto se filtró, se agregaron los otros ingredientes y se movió constantemente durante 1 – 2 min. Hasta que queden totalmente disueltos. El procedimiento se puede observar en las (Fotografías 16, 17, 18, 19 y 20).



FOTOGRAFIA 15. A,B: Haciendo hervir la papa para preparar el medio .



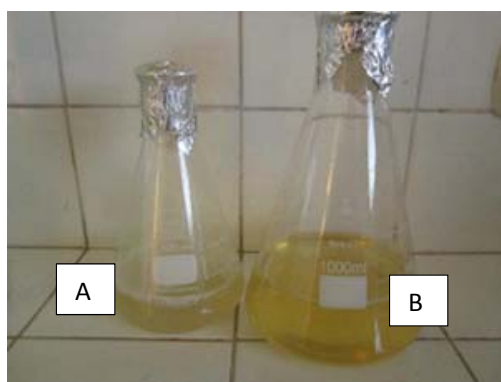
FOTOGRAFIA 16. A,B: Moviendo los ingredientes, hasta tenerlos totalmente disueltos.



FOTOGRAFIA 17. Medio preparado con papa listo.



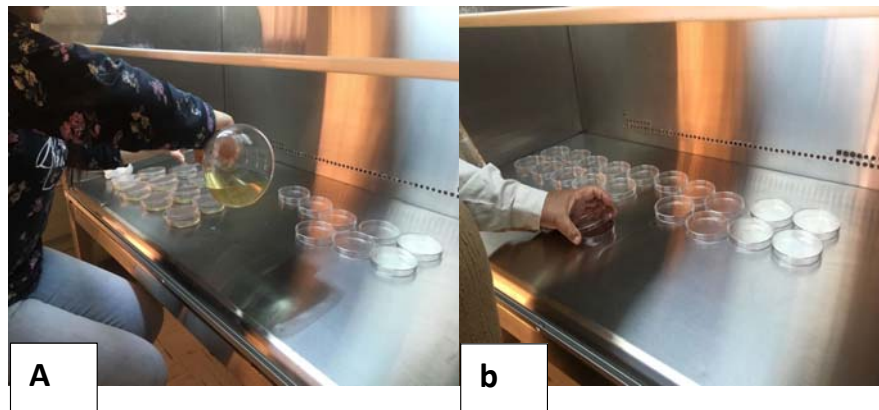
FOTOGRAFIA 18. Medio en la autoclave para la esterilización.



FOTOGRAFÍA 19. Plaqueado de Medios (instantáneo B y artesanal A)

1.5.3. PLAQUEO

- Una vez esterilizado el medio, se inicia el plaqueo.
- Esto se hizo en placas Petri de plástico estériles en la Cámara de Flujo Laminar.
- El paquete contenía 25 placas Petri, una vez abierta se tienen que utilizar todas, ya que estas son estériles
- Se echa aprox. 5-10 ml. Del medio "AGAR PAPADEXTROSA" por placa Petri.
- Se destapa la placa Petri, solo de un lado, se agrega el medio lo más rápido que se pueda, para evitar contaminación.
- Dejar enfriar hasta que se solidifique. Aprox 5 min.
- Empaquetar con papel film las placas, como mejor le sea conveniente, en este caso lo hicimos en paquetes de 10. (Fotografía 21 y 22).



A

b

FOTOGRAFIA 20. A,B: Plaqueo de Medios. 1ml. Aprox.



FOTOGRAFIA 21. Empaquetado de 10 unidades.

1.6. AISLAMIENTO DE HONGOS

1.6.1. ROYA DE CAFÉ (*Hemileia vastatrix*)

PROCEDIMIENTO

- El Hongo fue extraído de hojas de la planta de cafeto del Distrito de Echarate, La Convención – Quillabamba – Cusco.
- Se obtuvo tres muestras de distintas plantas que contenían este hongo.
- Se procedió con la siembra (tres muestras).
- Luego se hizo dos resiembras con cada una de estas muestras, se escogió las muestras más puras, para volver a re sembrarlas y así obtener nuestro objetivo de tener nuestra muestra pura (hongo aislado).

1.6.2. *Beauveria bassiana*

PROCEDIMIENTO

- El hongo (*Beauveria bassiana*) fue extraído de plantas de café que habían fumigado contra la broca de café (*Hypothenemus hampei*).
- Se cosecho el fruto de cuatro plantas, luego se hizo el raspaje correspondiente para dicha siembra (cuatro muestras).
- Se hicieron las resiembras dependiendo del grado de contaminación de las muestras, muestras menos contaminadas se tomaron para seguir resembrando y lograr nuestro objetivo (hongo aislado).

1.6.3. *Trichoderma sp.*

PROCEDIMIENTO

- El hongo (*Trichoderma sp.*) fue extraído de plantaciones de arroz en el Distrito de Camaná – Arequipa.
- Se tomó muestras de distintas zonas, luego se procedió a la siembra (cuatro muestras).
- Se hicieron las re siembras dependiendo del grado de contaminación de las muestras, en este caso solo se necesitó hacer dos resiembras y se obtuvo nuestro objetivo (hongo aislado).

1.6.4. ROYA DEL AJO (*Puccinia allii*)

PROCEDIMIENTO

- El hongo (*Puccinia allii*) fue extraído de plantaciones de ajo del Valle de Tambo – Arequipa.
- Se tomó muestras de distintas zonas, luego se procedió a la siembra (seis muestras).
- Se hicieron las resiembras dependiendo del grado de contaminación de las muestras, hasta obtener nuestro objetivo (hongo aislado).

1.6.5. TRISTEZA DEL PALTO (*Phytophthora cinnamomi*)

PROCEDIMIENTO

- El hongo de la tristeza del palto fue extraído de árboles del palto en el Departamento de Moquegua.
- Se tomó muestras de la raíz de la planta, luego se procedió a la siembra (cinco muestras).
- Se hicieron las resiembras dependiendo del grado de contaminación de las muestras, hasta obtener nuestro objetivo (hongo aislado).
(Anexo 05) Fotografías de aislamiento de hongos

CAPITULO IV

1. RESULTADOS

1.1. METRADO Y PRESUPUESTO DE CAMARAS DE FLUJO LAMINAR

1.1.1. METRADO Y PRESUPUESTO PARA CONSTRUCCION DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR

En el Cuadro 02, se muestra el Metrado y costo de la Cámara de Flujo laminar, donde se observa que el Costo asciende a S/. **5,961.00** (Cinco mil novecientos sesenta y uno soles 00/00)

CUADRO 02. Metrado y presupuesto de la Cámara de flujo laminar en “Diseño, construcción e instalación de una Cámara de flujo laminar para el cultivo de microorganismos en el Fundo “La Banda”- Huasacache de la Universidad Católica de “Santa María”.

| Orden | Descripción | Unidad | Cantidad | Precio Unitario | Total S/. |
|--------------|---------------------------------|------------|----------|-----------------|-----------------|
| 1 | Filtro Hepa 99% de eficiencia | U. | 1 | 1,320.00 | 1,320.00 |
| 2 | Ventilador de ½ HP. | U. | 1 | 600.00 | 600.00 |
| 3 | Equipo fluorescente | U. | 2 | 12.00 | 24.00 |
| 4 | Foco UV | U. | 1 | 240.00 | 240.00 |
| 5 | Fluorescente | U. | 1 | 28.00 | 28.00 |
| 6 | Pre filtro con marco de metal | U. | 2 | 70.00 | 140.00 |
| 7 | Plancha acero 4'x8' C430 N4 | U. | 4 | 203.00 | 812.00 |
| 8 | Pernos inoxidable exagonal C304 | Perno | 20 | 4.00 | 80.00 |
| 9 | Tubo cuadrado acero inoxidable | Tubo | 4 | 150.00 | 600.00 |
| 10 | Toma corriente 220 voltios | U. | 2 | 2.50 | 5.00 |
| 11 | Ángulos acero inoxidable | Angulo | 8 | 62.50 | 500.00 |
| 12 | Mano de Obra especializada | Técnico | 1 | 1,000.00 | 1,000.00 |
| 13 | Silicona | U. | 3 | 14.00 | 42.00 |
| 14 | Manómetro presión diferencial | Anemómetro | 1 | 570.00 | 570.00 |
| TOTAL | | | | | 5,961.00 |

\$ 1.00 = S/. 3.25

1.1.2. COSTO DE MATERIALES PARA PROBAR LA CAMARA DE FLUJO LAMINAR

En el Cuadro 03, se muestra el costo de los materiales de laboratorio, necesarios para realizar el aislamiento de los hongos *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinamoni*, *Puccinia allí*, *Hemileia vastatrix* en la Cámara de Flujo laminar casera, donde se observa que el Costo asciende a S/. **1,472.00** (mil cuatrocientos setenta y dos soles), (\$1 = S/. 3.25)

CUADRO 03. Costo de materiales de Laboratorio para probar Cámara de flujo laminar en “Diseño, construcción e instalación de una Cámara de flujo laminar para el cultivo de microorganismos en el Fundo “La Banda”- Huasacache de la Universidad Católica de “Santa María”.

| Orden | Descripción | Unidad | Cantidad | Precio Unitario | Total S/. |
|--------------|--------------------------------|---------|----------|-----------------|-----------------|
| 1 | Mandil | U. | 2 | 35 | 70 |
| 2 | Navajas | Navaja | 2 | 25.00 | 50.00 |
| 3 | Lupas | Lupa | 2 | 50.00 | 100.00 |
| 4 | Limpiador de acero inox | U. | 1 | 26.00 | 26.00 |
| 5 | Papel Kraft | Pliego | 50 | 0.20 | 10.00 |
| 6 | Papel film | Rollo | 1 | 32.00 | 32.00 |
| 7 | Recipientes de plástico | U. | 5 | 6.00 | 30.00 |
| 8 | Bolsas plástico transparente | Paquete | 1 | 1.50 | 1.50 |
| 9 | Papel toalla | U. | 6 | 3.50 | 21.00 |
| 10 | Libreta de campo | U. | 2 | 3.00 | 6.00 |
| 11 | Lapiceros | U. | 2 | 1.00 | 2.00 |
| 12 | Etiquetas para rotular | U. | 100 | 0.20 | 20.00 |
| 13 | Marcador tinta indeleble | U. | 2 | 2.50 | 5.00 |
| 14 | Placas Petri | Paquete | 12 | 18.00 | 216.00 |
| 15 | Agua destilada | Litro | 20 | 10.00 | 200.00 |
| 16 | Bagueta o varilla | U. | 3 | 17.00 | 51.00 |
| 17 | Matraz | Matraz | 2 | 70.00 | 140.00 |
| 18 | Vaso precipitado | U. | 2 | 70 | 140.00 |
| 19 | Pinzas acero inoxidable | Pinzas | 2 | 29.90 | 59.80 |
| 20 | Mango de bisturí | U. | 2 | 12.00 | 24.00 |
| 21 | Bisturí | Bisturí | 6 | 0.70 | 4.20 |
| 22 | Tijera | U. | 1 | 3.50 | 3.50 |
| 23 | Lamparilla mecheros de alcohol | U. | 2 | 14.00 | 28.00 |
| 24 | alcohol en gel | Unidad | 1 | 7.00 | 7.00 |
| 25 | Algodón | kg | 1 | 9.00 | 9.00 |
| 26 | Alcohol | Litro | 1 | 4.00 | 4.00 |
| 27 | Toalla de higiene | U. | 3 | 4.00 | 12.00 |
| 28 | PDA | Gr. | 250 | 0.8 | 200 |
| TOTAL | | | | | 1,472.00 |

\$ 1.00 = S/. 3.25

1.2. ANALISIS DE COSTO/BENEFICIO DE UNA CABINA DE FLUJO LAMINAR

1.2.1. COSTO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR COMERCIAL

Se muestra el Costo de Cámaras de Flujo Laminar de Hera Scientific de la Serie Helios C72 y ESCO Airstream Laminar Flow Clean Bench, modelo AHC-4D_. Diseñados para situaciones en la que se requiere la protección del producto contra los efectos peligrosos debido a la difusión incontrolable del aire, que transportan los contaminantes del medio ambiente al producto durante su manipulación. (Anexo 06) Manual de manipulación de cámara de flujo laminar

✓ **Camara de Flujo laminar Horizontal Hera Scientific de la Serie Helios C72:**

Dimensiones externas, ancho 1 920 mm, fondo 875 mm, alto 1 284 mm, dimensiones internas, ancho 1 880 mm, fondo 537 mm, alto 814 mm, zona de trabajo 180 cm, Costo de la cámara S/. 22 775.60.

✓ **Camara de Flujo laminar Horizontal; ESCO, Modelo AHC-4D_**

Tiene un tamaño nominal de 1,2 metros, dimensiones exteriores (largo: 1340 x ancho: 750 x alto: 1105 cm), dimensiones útiles (largo: 1180 x ancho: 630 x alto: 575 cm), zona de trabajo utilizable es de 0.74 m². Costo de la Cámara **S/.28,147.80**

CAMARA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL COMERCIAL Y UNA CAMARA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL

Se presenta los costos de la Cámara de Flujo laminar Horizontal, Serie Helios, Modelo C72 que asciende a **S/. 22 775.60** el Modelo ESCO AHC-4D_, con precio de **S/.28,147.8** y el de fabricación, cuyo costo es de **S/. 5 961.00**

✓ **Cámara de Flujo laminar Horizontal, Serie Helios, Modelo C72 S/. 22 775.60**

✓ **Cámara de Flujo laminar Horizontal; ESCO, Modelo AHC-4D_ S/. 28,147.80**

✓ **Cámara de Flujo laminar Horizontal S/. 5 961.00**
S/. 1.00 = S/. 3.25

Asumiendo que el alquiler de estas Cabinas es de S/. 1 000.00 mensuales, al año se tendría una Utilidad de S/. 12 000.00, resulta que la Relación B/C, para las cámaras sería:

- ✓ Cámara de Flujo laminar, sería:

$$\text{S/. } 12\ 000.00 / 5961 + (\text{Imprevistos } 10\%) = 1.83$$

- ✓ Cámara Serie Helios Modelo C72:

$$\text{S/. } 12\ 000.00 / 22\ 775.60 + (\text{Imprevistos } 10\%) = 0.48$$

- ✓ Cámara Serie ESCO, Modelo AHC-4D_:

$$\text{S/. } 12\ 000.00 / 28,147.80 + (\text{Imprevistos } 10\%) = 0.39$$



1.3. Aislamiento de hongos

ROYA DE CAFÉ (*Hemileia vastatrix*)

En la Figura 08 se puede observar el conceptual donde se explica la siembra con su respectiva leyenda

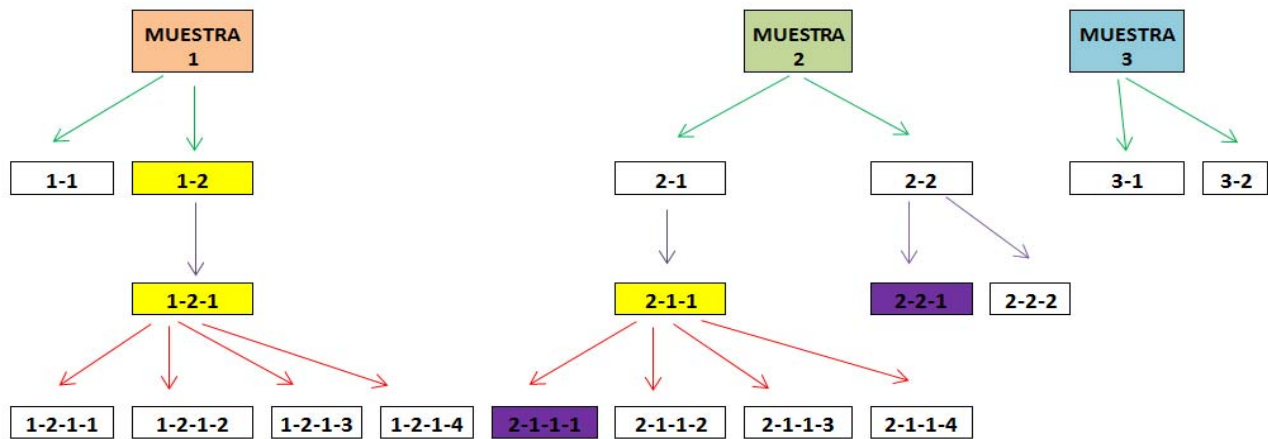
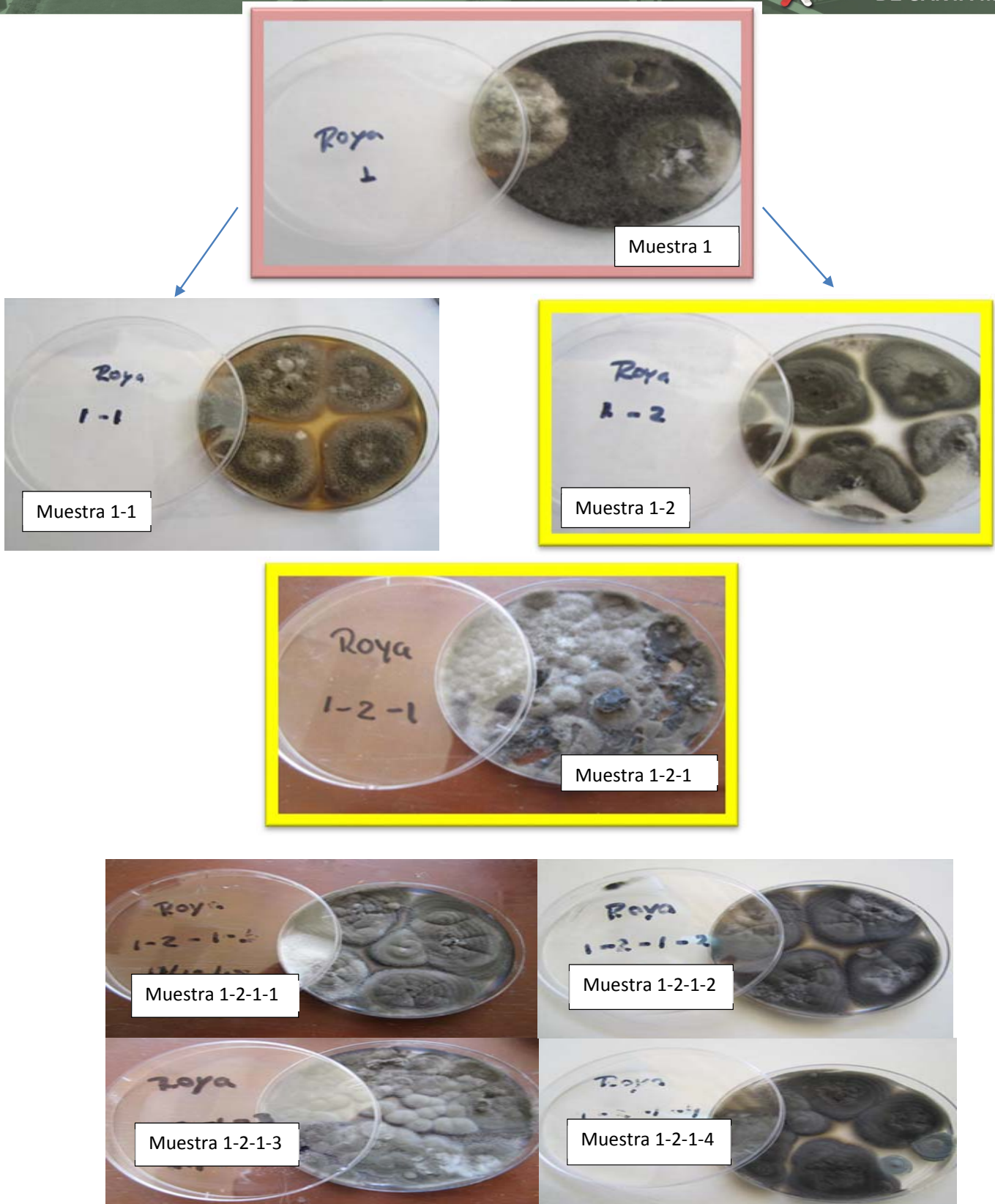


FIGURA 07: Mapa Conceptual Explicando Las Siembras

| LEYENDA DE MAPA CONCEPTUAL | |
|----------------------------|---|
| | : Representan a las muestras tomadas. |
| | : Muestras con menor grado de contaminación. |
| | : Objetivo logrado, muestra aislada (hongo puro). |

En las fotografías 22, 23, 24 se observa el proceso de aislamiento para cada una de las muestras respectivamente.

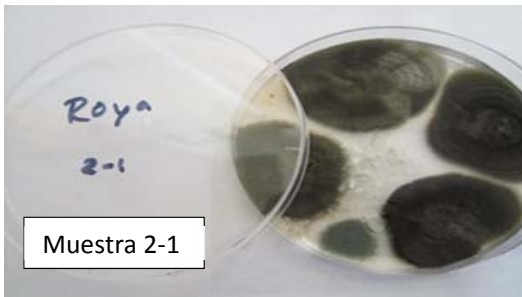
En la Fotografía 25 se observa la vista microscopica de estructuras



FOTOGRAFIA 22. Siembra de *Hemileia vastatrix* Muestra 1



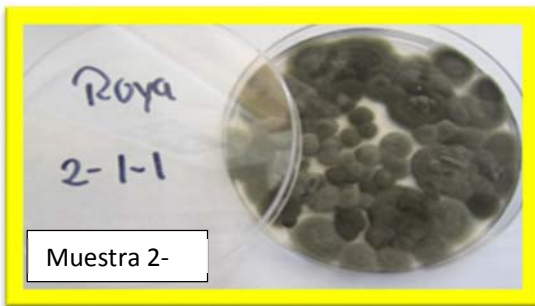
MUESTRA 2



Muestra 2-1



Muestra 2-2



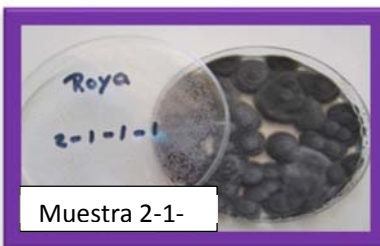
Muestra 2-



Muestra 2-



Muestra 2-



Muestra 2-1-



Muestra 2-2-1



Muestra 2-1-1-

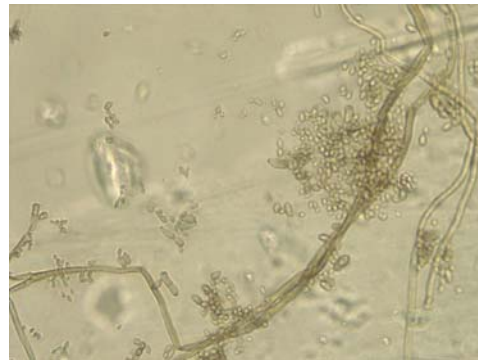
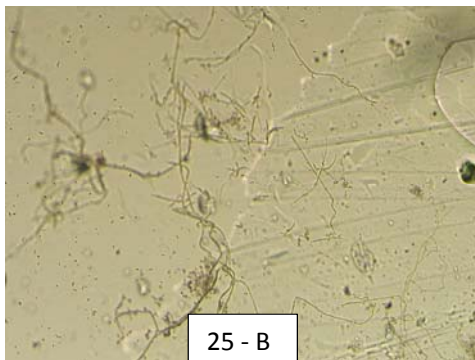


Muestra 2-1-1-

FOTOGRAFIA 23. Siembra de *Hemileia vastatrix* Muestra 2



FOTOGRAFIA 24. Siembra Muestra 1



FOTOGRAFÍA 25 Vista microscopica de estructuras de *Hemileia vastatrix*

Beauveria bassiana

En la Figura 09 se puede observar el conceptual donde se explica la siembra con su respectiva leyenda

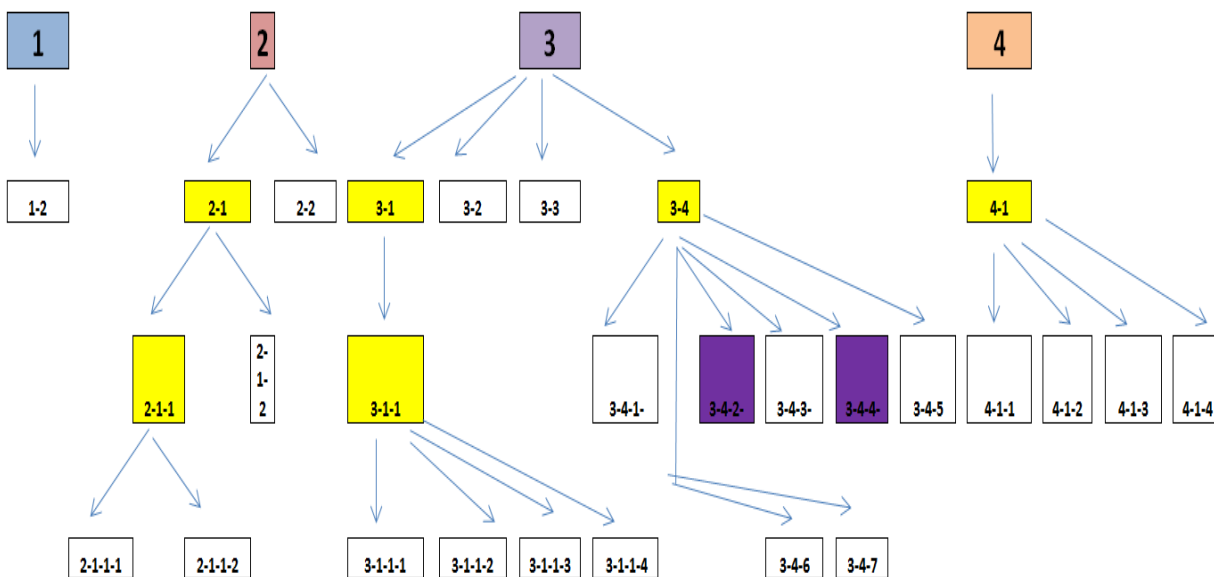


FIGURA 08: Mapa Conceptual Explicando Las Siembras para Beauveria bassiana

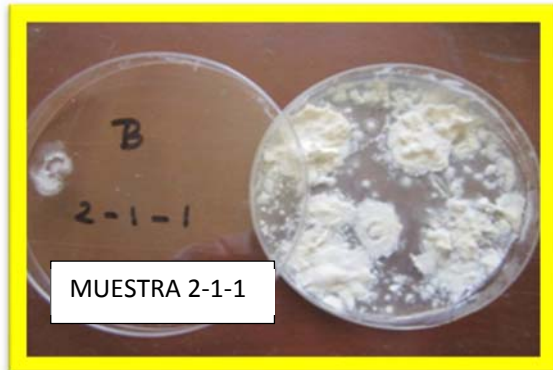
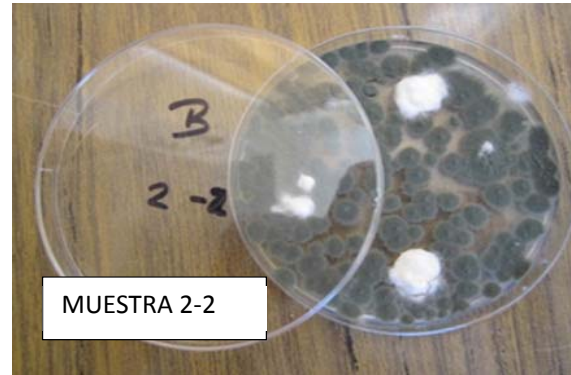
| LEYENDA DE MAPA CONCEPTUAL | |
|----------------------------|---|
| | : Representan a las muestras tomadas. |
| | : Muestras con menor grado de contaminación. |
| | : Objetivo logrado, muestra aislada (hongo puro). |

En las fotografías 26, 27, 28,29 se observa el proceso de aislamiento para cada una de las muestras respectivamente.

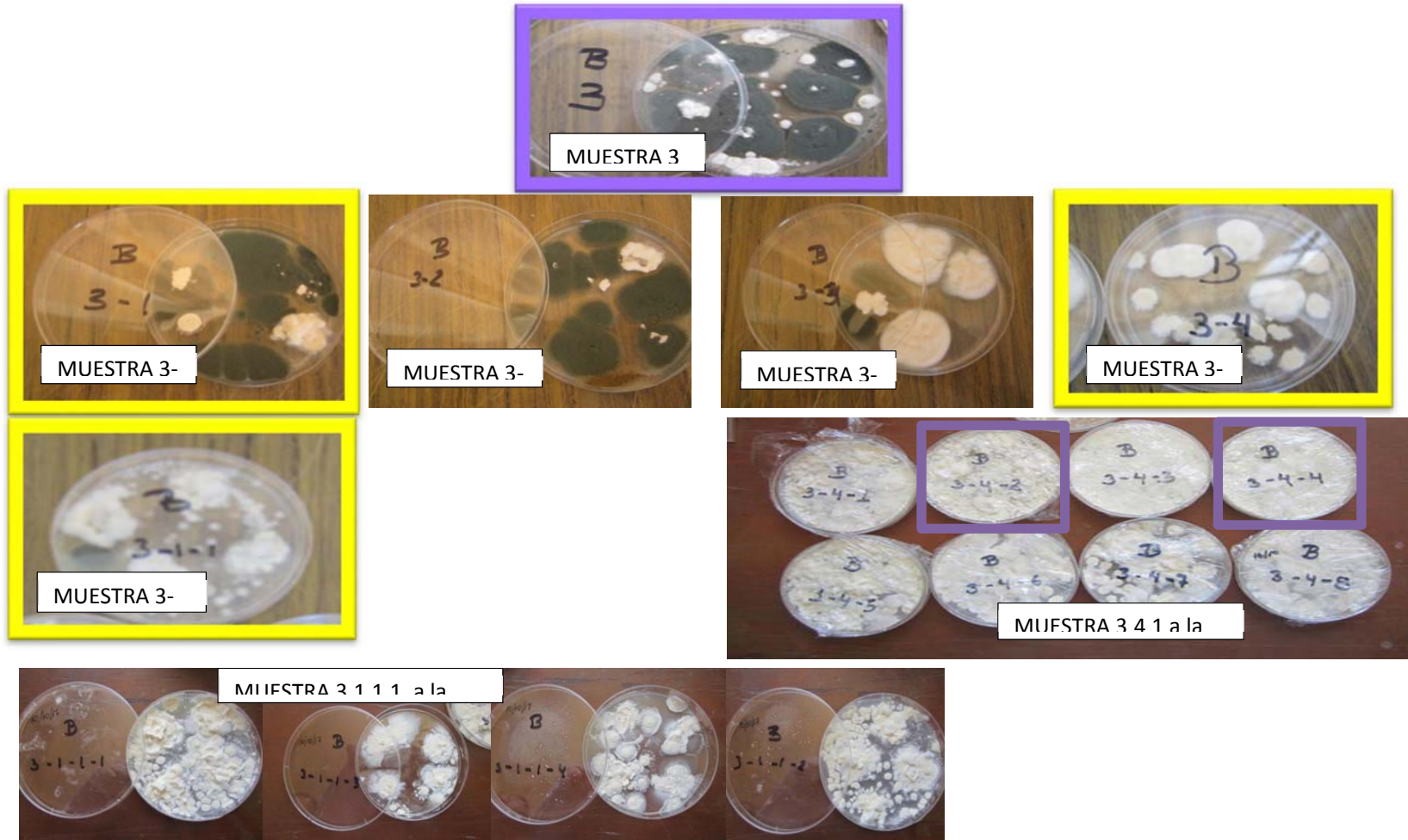
En la fotografía 30 se observa la vista microscopica de estructuras de *Beauveria bassiana*.



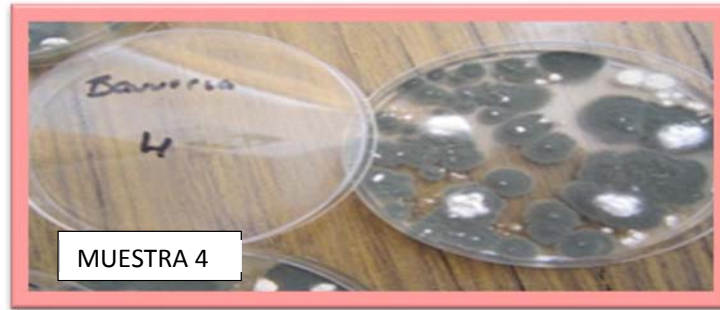
FOTOGRAFIA 26. Siembra de *Beauveria bassiana* Muestra 1



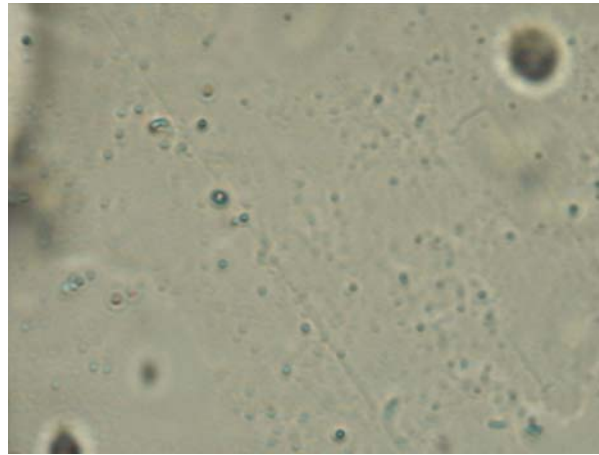
FOTOGRAFIA 27. Siembra de *Beauveria bassiana* Muestra 2



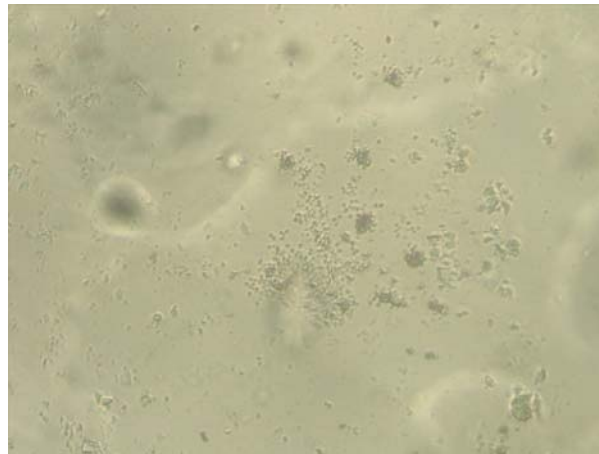
FOTOGRAFIA 28. Siembra de *Beauveria bassiana* Muestra 3



FOTOGRAFIA 29. Siembra de *Beauveria bassiana* Muestra 4



30 - A



30 - B

FOTOGRAFIA 30. Se observa la mista microscópica de estructuras de *Beauveria bassiana*

Trichoderma sp.

En la Figura 10 se puede observar el conceptual donde se explica la siembra con su respectiva leyenda

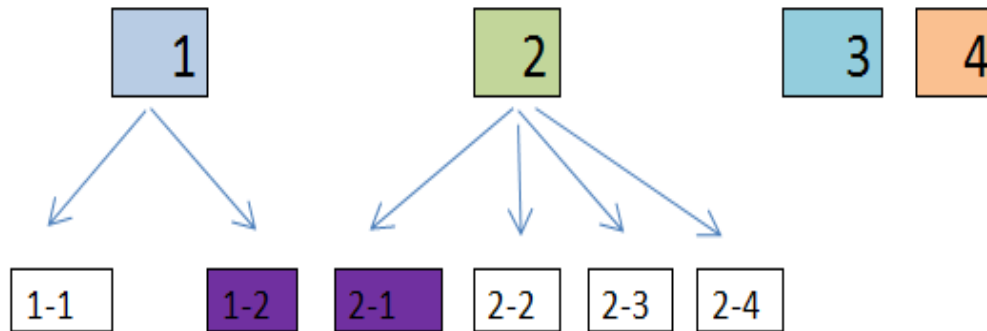


FIGURA 9 MAPA CONCEPTUAL EXPLICANDO LAS SIEMBRAS

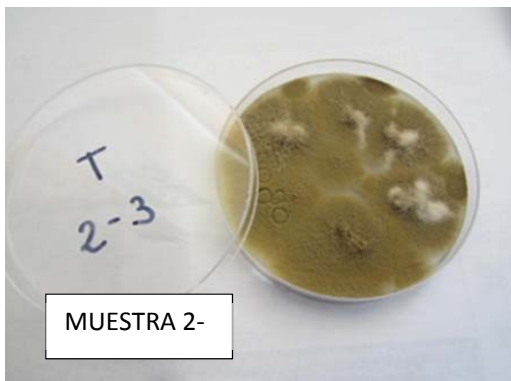
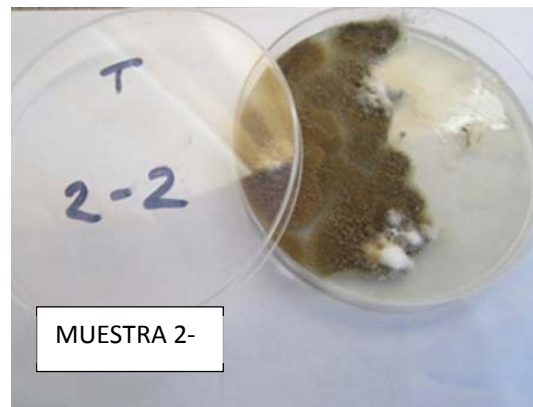
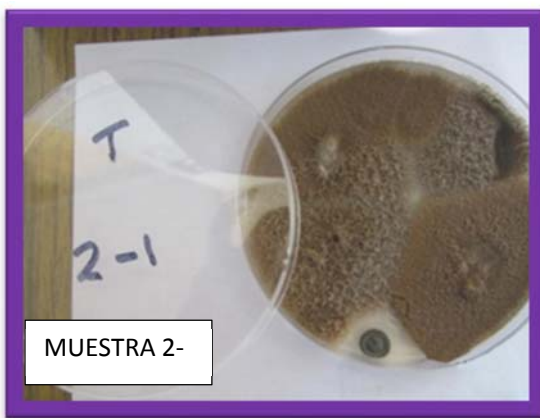
| LEYENDA DE MAPA CONCEPTUAL | |
|----------------------------|---|
| | : Representan a las muestras tomadas. |
| | : Muestras con menor grado de contaminación. |
| | : Objetivo logrado, muestra aislada (hongo puro). |

En las fotografías 31, 32, 33 Y 34 se observa el proceso de aislamiento para cada una de las muestras respectivamente.

En la fotografía 35 se observa la vista microscopica de estructuras de *Trichoderma sp.*



FOTOGRAFIA 31. Siembra de *Trichoderma sp.* Muestra 1



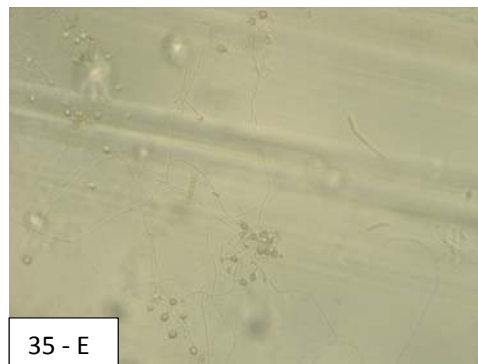
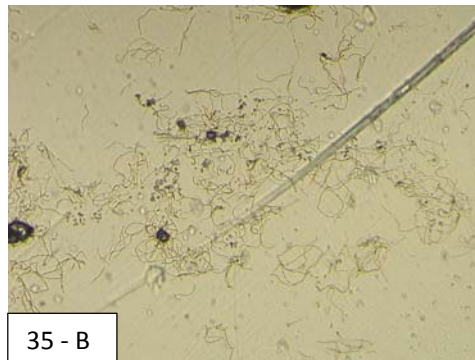
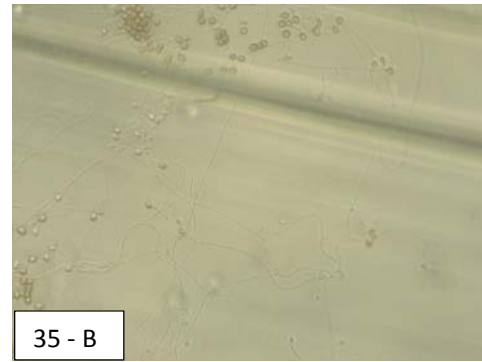
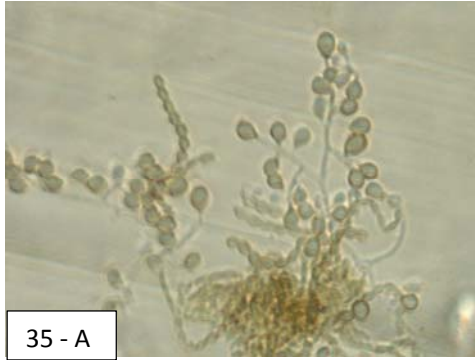
FOTOGRAFIA 32. Siembra de *Trichoderma sp.* Muestra 2



FOTOGRAFIA 33. Siembra de *Trichoderma* sp. Muestra 3



FOTOGRAFIA 34. Siembra de *Trichoderma* sp Muestra 4



FOTOGRAFIA 35. Vista microscópica de estructuras de *Trichoderma sp.*

ROYA DEL AJO (*Puccinia allii*)

En la Figura 11 se puede observar el conceptual donde se explica la siembra con su respectiva leyenda

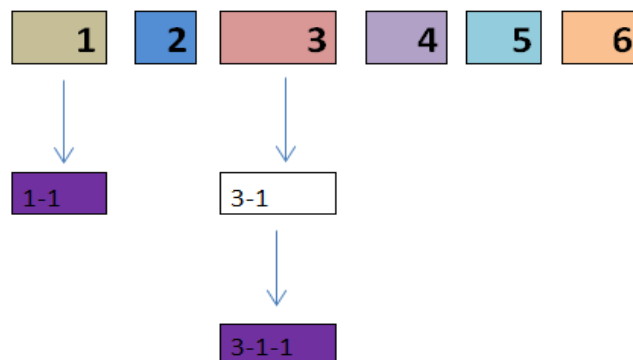





FIGURA 10. MAPA CONCEPTUAL EXPLICANDO LAS SIEMBRAS

| LEYENDA DE MAPA CONCEPTUAL | |
|---|---|
|  | : Representan a las muestras tomadas. |
|  | : Muestras con menor grado de contaminación. |
|  | : Objetivo logrado, muestra aislada (hongo puro). |

En las fotografías 36, 37, 38, 39, 40, 41 se observa el proceso de aislamiento para cada una de las muestras respectivamente.

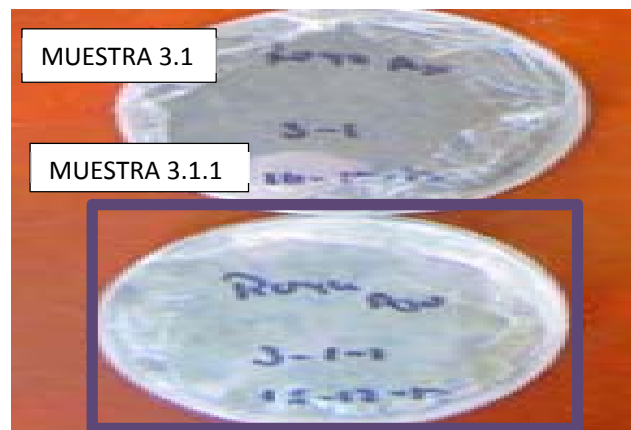
En la fotografía 42 se observa la vista microscopica de estructuras para *Puccinia allii*



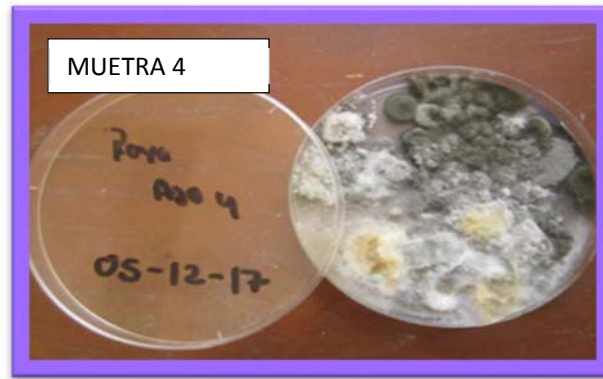
FOTOGRAFIA 36. Siembra de *Puccinia allii* Muestra 1



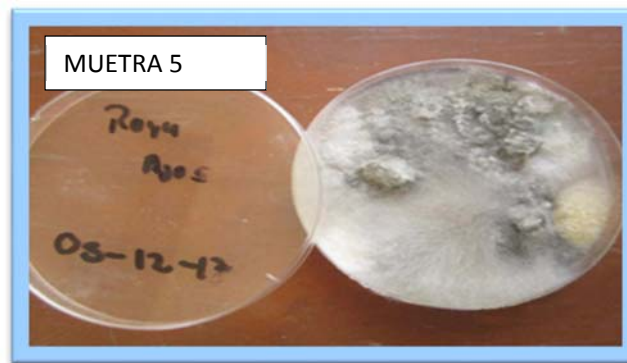
FOTOGRAFIA 37. Siembra de *Puccinia allii* Muestra 1



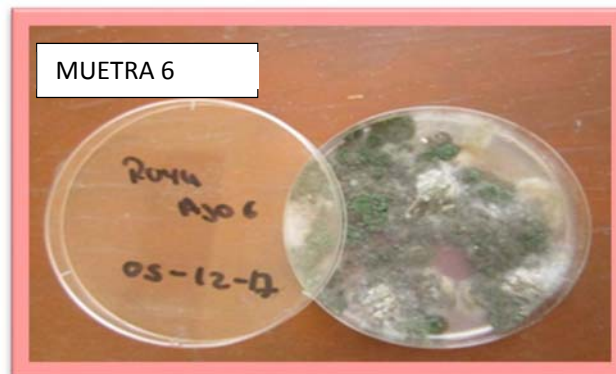
FOTOGRAFIA 38. Siembra de *Puccinia allii* Muestra 3



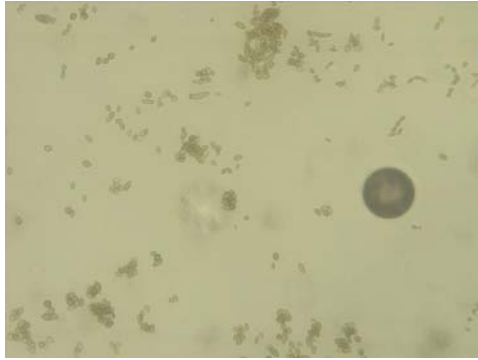
FOTOGRAFIA 39. Siembra de *Puccinia allii* Muestra 4



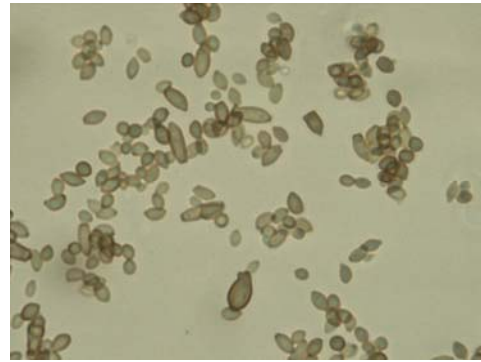
FOTOGRAFIA 40. Siembra de *Puccinia allii* Muestra 5



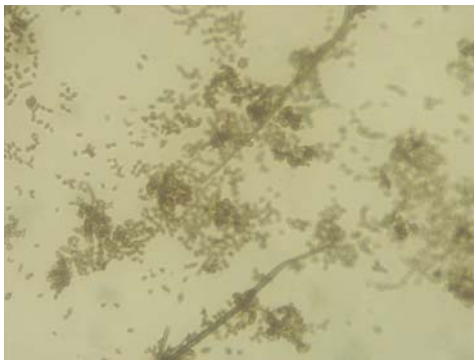
FOTOGRAFIA 41. Siembra de *Puccinia allii* Muestra 6



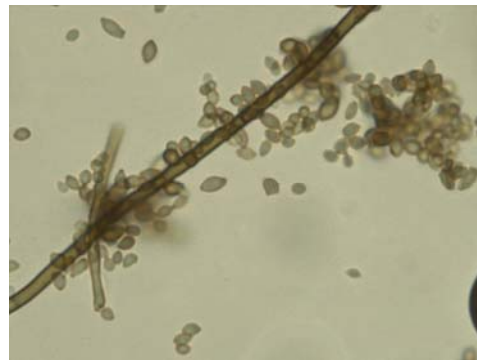
42 - A



42 - B



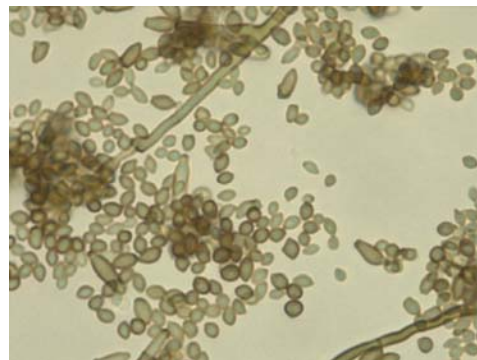
42 - C



42 - D



42 - E



42 - F

FOTOGRAFIA 42. Vista microscópica de estructuras de *Puccinia allii*

TRISTEZA DEL PALTO (*Phytophthora cinnamomi*)

En la Figura 12 se puede observar el conceptual donde se explica la siembra con su respectiva leyenda

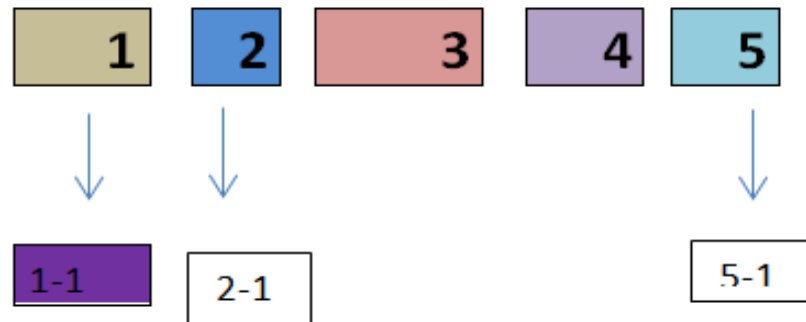


FIGURA 11. MAPA CONCEPTUAL EXPLICANDO LAS SIEMBRAS

| LEYENDA DE MAPA CONCEPTUAL | |
|----------------------------|---|
| | : Representan a las muestras tomadas. |
| | : Objetivo logrado, muestra aislada (hongo puro). |

En las fotografías 43, 44, 45, 46, 47 se observa el proceso de aislamiento para cada una de las muestras respectivamente.

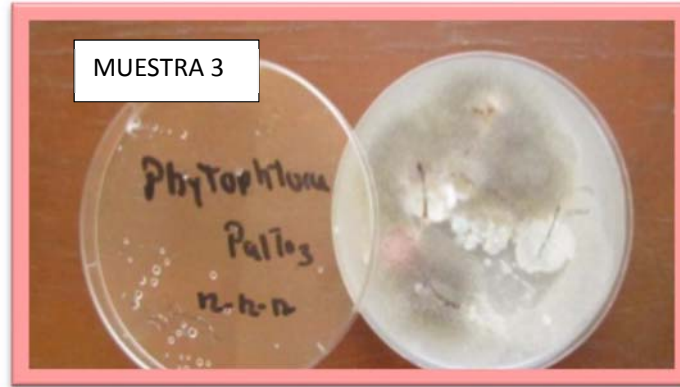
En la fotografía 48 se muestra la vista microscopica de estructuras de *Phytophthora cinnamomi*



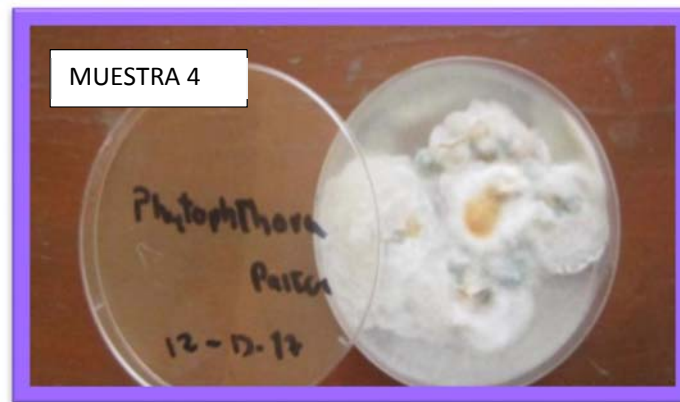
FOTOGRAFIA 43. Siembra de *Phytophthora cinnamomi* Muestra 1



FOTOGRAFIA 44. Siembra de *Phytophthora cinnamomi* Muestra 2



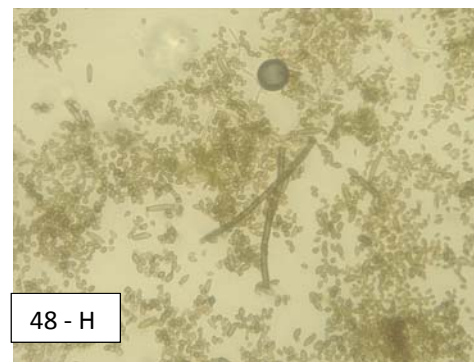
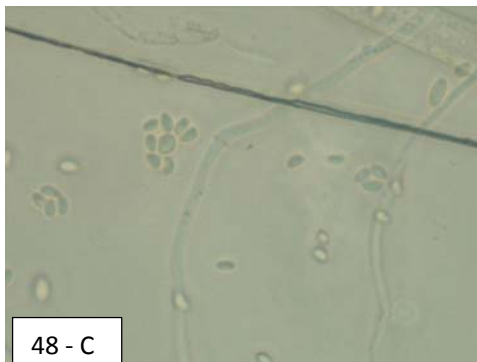
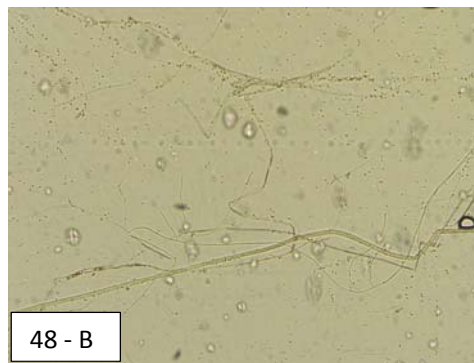
FOTOGRAFIA 45. Siembra de *Phytophthora cinnamomi* Muestra 3



FOTOGRAFIA 46. Siembra de *Phytophthora cinnamomi* Muestra 4



FOTOGRAFIA 47. Siembra de *Phytophthora cinnamomi* Muestra 5



FOTOGRAFIA 48. Vista microscópica de estructuras de *Phytophthora cinnamomi*

CAPITULO V

DISCUSION

1. Diseño, construcción funcionamiento de una cámara de flujo laminar para el cultivo de microorganismos.

En base a la información existente y a Catálogos que existe en nuestro medio, se diseñó, luego se construyó con Técnicos especializados y bajo una dirección permanente, la Cámara de Flujo Laminar, en un Taller especializado. En el Anexo 05 se puede observar los planos de La Cámara de Flujo Laminar.

La Cabina fue trasladada al Fundo “La Banda” en Huasacache y fue instalada en el Laboratorio de Semillas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica y Agrícola.

Se hizo una prueba en vacío y luego se trabajó en el aislamiento de Hongos, funcionando perfectamente la Cabina. Estos resultados contrastan con la investigación Diseño de una cámara de Flujo Laminar Horizontal para la Producción de Plantas *in vitro*, realizada en La Escuela superior de Chimborazo Ecuador en la Facultad de Ciencias Escuela de Ingeniería química al realizar las pruebas en vacío y la propagación de plantas *in vitro* lograron sus objetivos planteados.

Una forma más práctica de calcular la velocidad de flujo de ingreso de aire, es con el uso de un anemómetro, el cual posee una forma cónica de base rectangular. El anemómetro mide directamente el caudal que ingresa a la cabina en un área determinada. Por lo tanto, la velocidad de flujo de ingreso de aire es:

$$\text{Velocidad (ingreso)} = \text{Caudal (m}^3\text{/s)} / \text{Área (m}^2\text{)}$$

Según el número de Reynolds los valores menores a 2000 el Flujo se comporta como si estuviera formado por laminas delgadas que interactúan solo en base a esfuerzos tangenciales por eso este flujo se llama Flujo Laminar. Como se observa en el CUADRO 01, los valores para que haya un

Flujo Laminar oscilan entre 0.65 a 0.35 m/s, contando la cámara con un valor de 0.45 m/s, con lo cual se demuestra que hay un Flujo Laminar.

La cámara que se eligió para el diseño es una cámara de flujo laminar horizontal que es un equipo que permite la obtención de un ambiente aséptico libre de contaminantes, protegiendo de contaminación al operador, medio ambiente, pero en especial en el producto. El aire purificado cruza la zona de trabajo de manera de flujo horizontal unidireccional que se evacua por los orificios que están ubicados en la pared trasera de la zona de trabajo.

Según Clavel y Rossi (1994) en las cabinas de flujo laminar existen modelos de FLH y FLV, en los dos modelos el aire entra por encima de la cabina y atraviesa un filtro ULPA. En los modelos de FLH, el aire filtrado atraviesa la cámara principal de la cabina en una corriente de aire laminar horizontal unidireccional antes de ser extraído por la apertura frontal de la cabina. En los modelos de flujo laminar, el aire filtrado atraviesa la cámara principal de la cabina en una corriente de aire laminar vertical antes de ser extraído por la apertura frontal de la cabina.

Respecto al uso del filtro HEPA en lugar del ULPA se debió a que el filtro ULPA es un filtro más aséptico ya que filtra los organismos más pequeños como virus y estos son más utilizados en laboratorios médicos y su uso hubiera aumentado el costo, el filtro HEPA es el más adecuado para los trabajos de investigación que se realizarían en el Programa Profesional

En las características técnica de los equipos de laboratorio se tiene que FILTROS HEPA TIENE UNA EFICIENCIA DE 99.99%, PARA PARTÍCULAS DE 0.3 μM O MAYOR Y PARA FILTROS ULPA TIENE UNA EFICIENCIA DE 99.999% PARA PARTICULAS DESDE 0.1 A 0.3 micras

Para los trabajos en el aislamiento de hongos, se invirtió en materiales de Laboratorio, la suma de S/. 1,272.00

2. Establecer costo – beneficio de la construcción de una cámara de flujo laminar horizontal, en comparación de una cámara de flujo laminar horizontal (comercial).

Para hallar el Beneficio/Costo (B/C) de las Cabinas de Flujo Laminar, se asumió que el Alquiler a la Universidad es de S/. 250.00 x Semana, que representa S/. 1 000.00 x mes, teniendo una utilidad anual de S/. 12 000.00.

- ✓ En base a este análisis, se tiene que para la Cámara de flujo laminar una Relación B/C, de 1.83, para el Modelo C72 de 0.48 y para el modelo ESCO AHC-4D_ de 0.39.

Se observa que el Modelo construida tiene la relación B/C de 1.83, más alta que los dos otros aparatos de Flujo Laminar.

A esto hay que sumar los beneficios que va a recibir la Escuela y que ha demandado un esfuerzo técnico y económico.

El ventilador que se empleo tiene las siguientes características Carcasa tubular fabricada en acero al carbón con bridas y aplicación de pintura epoxica en polvo horneada. Hélice de aluminio anti-chispa dinámicamente balanceada en 6 alabes con aplicación de pintura epóxica en polvo horneada. Accionado por acoplamiento directo a un motor eléctrico Para garantizar el flujo del aire

3. Realizar el aislamiento del hongo.

Se logró aislar y purificar cinco especies de hongo en cada uno de los hongos, se realizó un diagrama conceptual para explicar cómo se hicieron las siembras, cuántas muestras se tomaron y así poder ver los resultados.

Para la siembra se utilizó el PDA como medio *ya que* es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium (Verticillium)* y *Metarhizium*, los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio. (Gonzales, 2004).

Los hongos aislados fueron *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Hemileia vastatrix* y *Puccinia allii*. Para realizar el aislamiento el tiempo máximo que se tomo fue para *Hemileia vastatrix* con una duración de tres meses no se registra antecedentes de tiempo para realizar aislamiento, se tiene referencia de aislamiento de hongos entomopatógenos donde se tomaron un tiempo de 7 días para la incubación y 20 días para en aislamiento según lo manifestado por Cañedo V. y Ames T, (2004) en el manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos.



CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- Se logró Diseñar, construir, instalar y poner en funcionamiento una cámara de flujo laminar para el cultivo de microorganismos.
- Con respecto a la Relación Costo/Beneficio (C/B) para la Cámara de flujo laminar fue de 1.83, comparando con la Cámara de flujo laminar horizontal para el Modelo C48 que tiene una Relación B/C de 0.48 y para el Modelo C72 de 0.39. por lo cual es más beneficioso la construcción de una cabina comparado con una de alta gama ya que esta no solo ofrece beneficios económicos si no que funciona igual.
- Se realizó el aislamiento y purificación de los hongos *Beauveria bassiana*, *Hemileia vastatrix*, *Phytophthora cinnamomi*, *Puccinia allii* y *Trichoderma sp.* Lo cual comprueba que la Cámara de Flujo Laminar cumple con su objetivo.
- La cámara de flujo laminar construida mostro ser eficiente logrando obtener aislamiento de sepas de hongo *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Hemileia vastatrix* y *Puccinia allii*

CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

- Se recomienda la construcción de una cámara de flujo laminar horizontal con materiales originales que permitan el mismo uso a un menor costo.
- Siendo un aparato costoso y de mucha utilidad, es necesario un manejo y mantenimiento cuidadoso, para que sirva en la realización de trabajos de investigación de la especialidad por parte de los alumnos e investigadores.
- El diseño puede ser utilizado para otros usos ya que es idóneo para toda actividad que requiere esterilidad.
- Realizar investigaciones utilizando la cámara de flujo laminar.



CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

1. **AGRIOS, G.** 1998. Fitopatología. 5ª. edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 928 p.
2. **AGRIOS, G.**, 2005; Fitopatología Editorial Mc Graw Hill. México.
3. **BISSETT J** (1991c) A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can J Bot* 69:2418–2420.
4. **BRAVO, Maria Teresa.** 2002. Evaluacion de cabinas de seguridad biologicas. Evaluacion de cabinas de seguridad biologicas. [Online] 2002. [Cited: mayo 26, 2017.] <http://www.ispch.cl/>.
5. **CAÑEDO, V; AMES, T.** 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p
6. **CLAVELL, L.; ROSSI L.** 1994. Campanas de flujo laminar. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia . Venezuela.
7. **CROP SCIENCE CHILE.** (DICEIMBRE de 2017). Obtenido de <http://www.cropscience.bayer.cl/soluciones/fichaproblema.asp?id=116>
8. **DIANA, M.**, 2010. Identificación y evaluación en laboratorio e invernadero de microorganismos antagonistas de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis morelet*) en musaceas en el litoral ecuatoriano. Santa Ana - Manabi - Ecuador.
9. **ECURED,** 2017..Acero inoxidable fecha de consulta (marzo, 27,2017) disponible en (https://www.ecured.cu/acero_inoxidable)
10. **FOLGUERAS, M.** 2008. Microbiología general. Conferencia tercer año de Ingeniería Agropecuaria en el Centro Universitario Municipal (CUM), Santo Domingo, Villa Clara, Cuba, 14 p.
11. **GAVIDIA, E.** 2009. Diseño de una Cámara de flujo laminar horizontal para la producción de plantas *in vitro*. Riobamba – Ecuador.
12. **GONZALES, J.** 2004. Laboratorio de microbiología. instrumentación y principios básicos. La Habana, Cuba
13. **INTAGRI S.C.** . (2017). Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>

14. **HARMAN, G.,** Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2(1):43-56. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>
15. **HARPER,** Erickson. 2000. A guide to Biosafety Enclosures. A guide to Biosafety Enclosures. [Online] 2000. [Cited: mayo 25, 2015.] www.labconco.com.
16. **HOWELL,** C. 2003. Understanding the Mechanisms Employed by Trichoderma virens to Effect Biological Control of Cotton Diseases. Phytopathology. 96(2):178-180. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-96-0178>
17. **JARDIEL,** Sanchis. 2000. Validacion, verificacion y mantenimiento de cabinas de flujo laminar. Validacion, verificacion y mantenimiento de cabinas de flujo laminar. [Online] 2000. [Cited: mayo 26, 2015.] <http://www.juntadeandalucia.es>.
18. **KALSTEIN 2008.** Características de CFLH, Disponible en: <http://www.kalstein.net/tc/index.php?cPath=7> 2008-11-15
19. **LIECKFELDT E, SAMUELS GJ, NIRENBERG HI** (1999) Tricho-derma asperellum, a new species with warted conidia, and redescription of Trihcoderma viride. Sydowia 51:71–88 (PDF) Two new species of Trichoderma from.... Available from: https://www.researchgate.net/publication/6568270_Two_new_species_of_Trichoderma_from_Yunnan_China [accessed Aug 14 2018].
20. **LOWE, S., BROWNE, M., BOUDJELAS, S. AND DE POORTER, M. (2000)** 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A Selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG), 12 p
21. **MAYEA S; CARONE, M., NOVO, R., BOADO, I., SILVEIRA, E.; SORIA, M.; MORALES, Y., VALIÑO, A.** 1998. Microbiología Agropecuaria Tomos I y II. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba. pp. 500.
22. **MICHELL, M.** 2015. Elaboración de un manual de funcionamiento, mantenimiento de los equipos cámara de flujo laminar e incubación del laboratorio de biotecnología de la reproducción. Latacunga - Ecuador.
23. **MOTT, R.** Mecánica de Fluidos. 4ª.ed. México: 2006. pp. 545.
24. **OVIEDO, U. D.** 2014. Informe de cualificación. España.
25. **PÉREZ, P.,** 1972. Prontuario de ventilación. Soler & Palau

26. **PEREZ, W.** 2003. Mantenimiento de cabinas de flujo laminar. Mantenimiento de cabinas de flujo laminar. En línea 2003. [Cited: mayo 26, 2017.] <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd29/laboratorio/cap6.pdf>
27. **POZO, J. Á.** (08 de JUNIO de 2008). *UNILEON*. Obtenido de www.unileon.es/intranet/prevencion/abiologicos_cabinas.do
28. **PRESCOTT, H.**, 1999 Microbiología. Mc Graw-Hill Interamericana de España. 4^a ed. 1999.
29. **REYES, Edgar.** 2009. Cámaras de seguridad biológica. Cámaras de seguridad biológica. En línea enero 2009. [Cited: mayo 27, 2017.] www.amexbio.org
30. **ROJAS, T.** 2011 Concepto y Practica de Microbiologia General Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira
31. **ROSSI, Clavell.** 1994. Campanas de Flujo Laminar. Campanas de Flujo Laminar. En línea 1994. [Cited: Mayo 25, 2017.] www.labconco.com
32. **SAMUELS GJ** (2005b) Trichoderma: systematics, the sexualstate, and ecology. *Phytopathology* 96:195–206
33. **SAMUELS GJ, CHAVERRI P, STEWART EL** (2003) Hypocreavirens sp. nov., the teleomorph of Trichoderma virens. *Mycologia* 93:1113–1124
34. **SUBERO, L.** (2005). La roya del café (en línea). Consultado 13 abr. 2017. Disponible en www.infocafes.com.
35. **TAMAYO, J.** 2009. Cámaras es portátiles para la enseñanza de la multiplicación *in vitro*. *Tierra tropical revista de la Universidad earth*.
36. **URBINA,** 2011. Fitopatología Editorial Mc Graw Hill. México.
37. **WIKIPEDIA, LA ENCICLOPEDIA LIBRE** Filtro de aire. 2017.. fecha de consulta: marzo252017 <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=filtro de aire&oldid=98026329>.
38. **VUILLEMIN,** 1912 e *Metarhizium anisopliae* *Avaliação da eficácia in vitro dos fungos Beauveria bassiana (Balsamo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil*
39. **ZHANG CL, Druzhinina IS, Kubicek CP et al** (2005) Trichoderma biodiversity in China: Evidence for aNorth to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol Lett* 251:251–257 (PDF) Two new species of Trichoderma from.... Available from:

https://www.researchgate.net/publication/6568270_Two_new_species_of_Trichoderma_from_Yunnan_China [accessed Aug 14 2018].



ANEXOS

Anexo 01. Fotografías de Elaboración de la Cámara de Flujo Laminar



2A,2B,2C Armado de cámara de flujo laminar



2D, 2E, 2F Armado y Plegado de las Planchas de Acero Inoxidable



2-J;2-K;2-L. Armado y Plegado de las Planchas de Acero Inoxidable



2G,2H,2I Filtro Hepa y Ventilador Axial

**Anexo 02. Traslado de Camara de Flujo laminar a laboratorio del Fundo la
Banda Huasacache.**



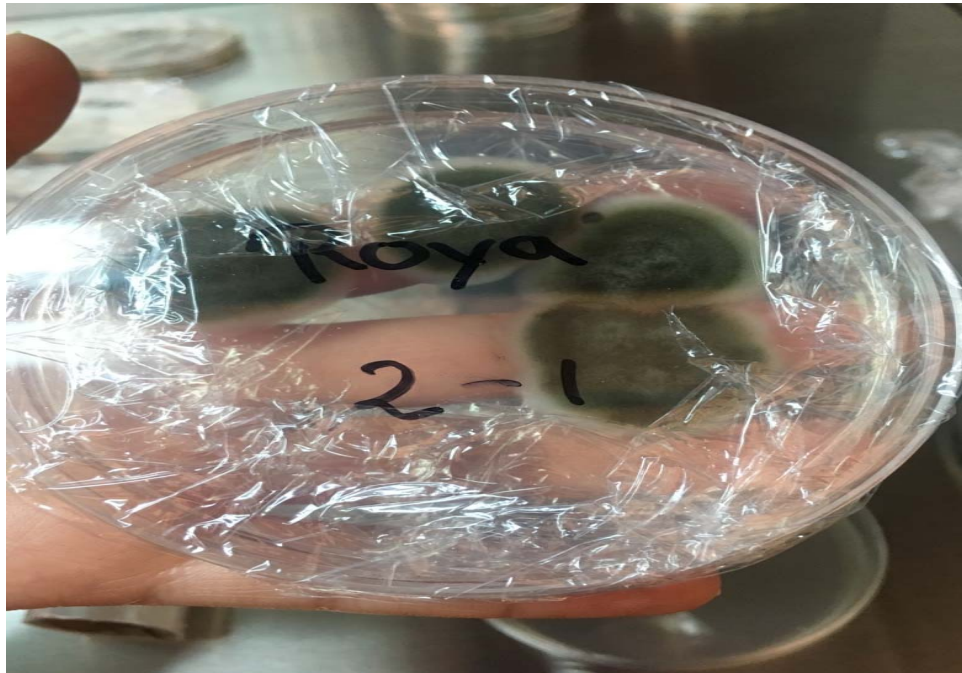
Camion Grua que e empleo para el traslado

Anexo 03. Resultados de Aislamiento de Hongos en la Camara de Flujo Laminar.

Hongos de Bauveria en proceso de aislamiento



Trabajo de aislamiento en hongos de roya para prueba de funcionamiento



Anexo 04. FICHA TECNICA

| CARACTERISTICAS TECNICAS | |
|---|--|
| Fabricación (superficies externas) | Acero inox AISI 304 2B |
| Filtro Absoluto HEPA | Con ecualizador de flujo, eficiencia 99.97 % sobre partículas 0.3 micras. |
| Motor Ventilador | Axial, apto para proporcionar el flujo laminar en el rea de trabajo. Con un motor de 2 HP |
| Iluminación | Lámpara LED colocadas en la parte central, proporcionando una mejor distribución de luz sobre el plano de trabajo. |
| UV Germicida | Radiación ultravioleta de 253,7 nanómetros. |

| ESPECIFICACIONES TECNICAS | |
|--|---|
| N° de filtros | 1 |
| N° de pre filtros | 2 |
| Velocidad Media del aire en fachada | 0.45 m/s |
| Consumo eléctrico Total | 211 W |
| Nivel de iluminación | 18 W / 900 Lux |
| Uv germicida | Radiación ultravioleta de 253,7 nanómetros. |

| EQUIPAMIENTO SERIE | |
|--|---|
| Circuito eléctrico | Básico |
| Sistema eléctrico y reposición de filtros | Básico |
| Iluminación | Tubo de 96 LED de alta intensidad lumínica y bajo consumo - 18 Watts / 700 Lux |
| Cronómetro digital con aviso sonoro | No |
| Toma eléctrica | Toma eléctrica individual |
| Superficie de trabajo inox. | Plano de trabajo con superficie de trabajo acero inox AISI 304 2B |
| Pre filtro G4 | Manta pre filtrante de bio fibras sintéticas de clase G4 (norma EN-779) para la retención del polvo atmosférico |
| Garantía | 4 años |

DIMENSIONES CABINA

| | |
|---------------|---------|
| Altura | 1,400 m |
| Largo | 1,235 m |
| Ancho | 0.65 m |



Anexo 05. Manual elaborado para la de Operación y Mantenimiento de la Cámara de Flujo Horizontal.

1. DATOS GENERALES

El presente Manual de Instrucciones y Mantenimiento es válido para la cámara de flujo laminar que está instalada en el Laboratorio de Semillas en el Fundo Huasacache de la Universidad Católica de Santa María procedente de la tesis “Diseño, Construcción, Instalación y Funcionamiento de Una Cámara de Flujo Laminar para el Cultivo de Microorganismos en el Fundo la Banda – Huasacache de la Universidad Católica de Santa María.”



PRECAUCION

Es obligatoria la lectura y comprensión del presente Manual antes de proceder a la puesta en marcha de la cabina de flujo laminar.

Respetar todas las instrucciones de seguridad que se mencionan en el Manual.

Antes de realizar cualquier intervención de Mantenimiento sobre la cabina, desconectarla de la fuente de energía.

Una utilización o aplicación no conforme con las recomendaciones expresadas en el Manual, puede generar una situación de riesgo.

2. DATOS DE LA CAMARA

a. FUNCIONAMIENTO

Las cabinas de flujo laminar vertical están equipadas con ventiladores de alta eficacia.

Mueble exterior en acero inoxidable, de diseño funcional, medidas exteriores reducidas y acceso frontal para cambio de filtros.

El aire impulsado por el ventilador es descargado en cámara y a través del filtro absoluto HEPA es filtrado y en régimen laminar entra en la zona de trabajo.



PRECAUCION

En ningún caso es posible la manipulación en ambiente de gases corrosivos, inflamables o explosivos.

b. DESCRIPCION DE LOS COMPONENTES

1.4.

| Descripción | Cantidad |
|-------------------------|----------|
| Ventilador Axial | 1 |
| Filtro HEPA | 1 |
| Prefiltros | 2 |
| Conexión toma Eléctrica | 1 |
| Caratula de Mandos | 1 |
| Fluorescente | 1 |
| Foco Uv | 1 |
| | |
| | |

c. CARACTERISTICAS TECNICAS

| CARACTERISTICAS | UNIDADES |
|--|----------|
| TAMAÑO NOMINAL | |
| DIMENSIONES EXTERIORES (LARGO X ANCHO X ALTO) | |
| ZONA DE TRABAJO UTILIZABLE | |
| VELOCIDAD DEL FLUJO DEL AIRE | |
| EFICACIA DEL FILTRO HEPA | |
| INTENSIDAD LUMINARIA | |
| VENTILADORES | |
| PESO NETO | |

3. INSTRUCCIONES DE INSTALACION

a. EMPLAZAMIENTO

- a) Las cabinas deberían ubicarse lejos de entradas, pasillos, difusores de aire, etc., que afectarían al flujo del aire de la cabina.
- b) Debe asegurarse un perfecto asentamiento de la cabina en la mesa.
- c) Para evitar un sobre-calentamiento de la zona de trabajo es recomendable que la temperatura ambiente de la habitación esté dentro de los márgenes de confort de trabajo.
- d) Cuando sea preciso, se deberían modificar los difusores de entrada de aire de la sala para que desvíen el aire lejos de las cabinas o bien reducir la velocidad de entrada de aire de la sala.
- e) El hecho de abrir y cerrar de repente puertas puede perturbar los flujos de aire de la cabina, y se debería evitar cuando las cabinas están en funcionamiento.

b. PRECAUCIONES EN LA PRIMERA CONEXIÓN

- Antes de conectarla a la red eléctrica, se procederá a una limpieza general con la finalidad de eliminar las partículas de polvo acumulado durante el transporte. Para ello se seguirán las instrucciones de limpieza y desinfección.
- Efectuar la conexión eléctrica adecuada
- Antes de trabajar por primera vez, poner en funcionamiento la cabina para purgar los filtros.

c. CONEXIÓN ELECTRICA

La cabina se suministra con electro ventiladores monofásicos.

PRECAUCION



La cabina sólo puede ser accionada a través del interruptor general situado en la parte **Posterior Izquierda**

d. PUESTA EN MARCHA

Una vez controlados los puntos anteriores, poner en marcha la cámara de flujo laminar accionando sobre el interruptor situado en la parte posterior izquierda, para utilizar cada uno de los elementos (Luz Uv., Luz fluorescente y/o ventilador) únicamente es necesario accionar los pulsadores (Fig. 1.).

e. DESCONEXION

Para proceder al paro de algún elemento de la cámara, únicamente es necesario accionar los pulsadores (Fig. 1.).

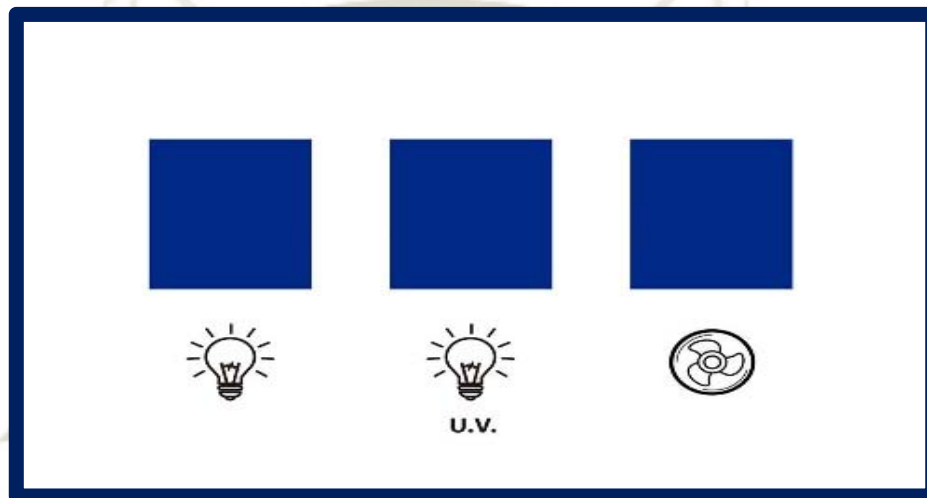


Fig. 1.

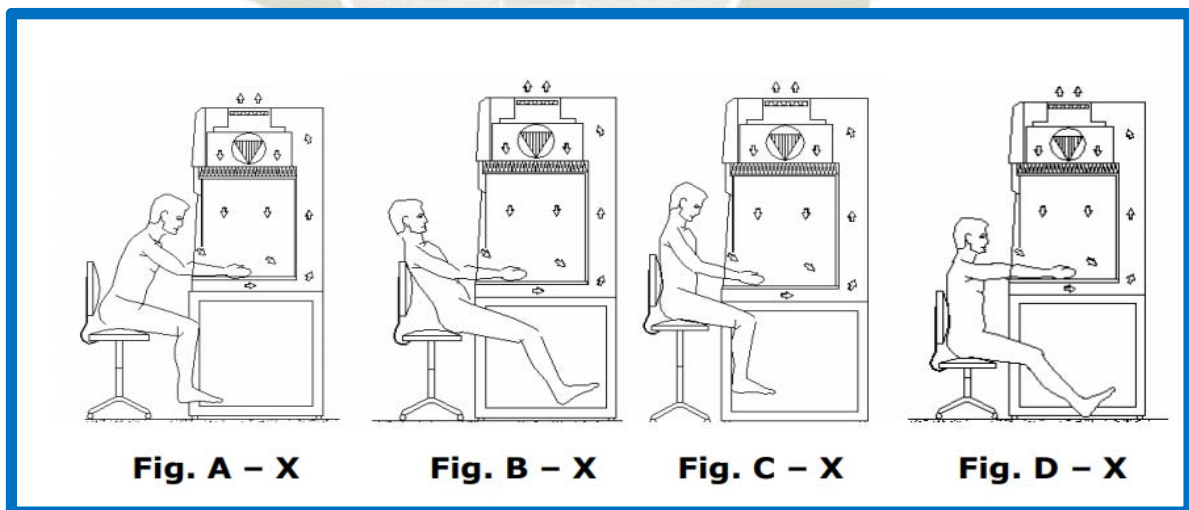
4. INSTRUCCIONES DE USO**a. RECOMENDACIONES GENERALES DE USO**

- No debe utilizarse la zona de trabajo de la como como almacén de equipos de laboratorio. Ello puede producir una acumulación de polvo innecesaria y peligrosa para trabajar en condiciones estériles.
- Todo el material necesario para el trabajo deberá estar libre de partículas, limpiándose cuidadosamente antes de su introducción.
- No se debe introducir en la zona de trabajo materiales tales como: papel, madera, cartón, lápices, goma de borrar, etc. ya desprenden gran cantidad de partículas.

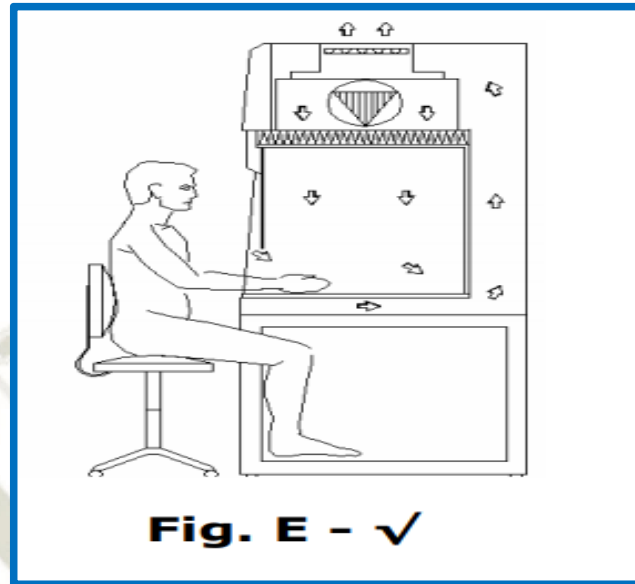
- Antes y después del trabajo se recomienda lavarse bien brazos, manos y uñas con jabón desinfectante. El personal deberá evitar tocarse la boca, así como los ojos.
- Es necesario el uso de mandil, mascarillas (cubre bocas),
- Debe ponerse en marcha la cabina unos 10 minutos antes de empezar a trabajar. De esta forma se llevará a cabo un barrido de partículas de la zona de trabajo y del material introducido.
- Si por el trabajo a realizar es necesario el empleo de la llama se utilizará un mechero de alcohol. Téngase en cuenta que una llama excesivamente grande puede llegar a quemar los filtros absolutos.
- Una vez finalizado el trabajo, todos los productos desechables (asas, placas de Petri, etc.), así como medios de cultivo, muestras, tubos, frascos, etc. se evacuarán de la cámara.
- Durante el trabajo en la cabina y en las operaciones de limpieza, debe evitarse dañar los filtros HEPA dando golpes, proyectando líquidos o salpicaduras, etc.

i. ERGONOMIA

Por su seguridad, el usuario deberá tener en cuenta las posturas adoptadas durante el trabajo realizado en la cabina.



Ajustar el asiento y adoptar una postura correcta permitirá al usuario trabajar con seguridad y además evitar posibles daños físicos (vista, cervicales, espalda, etc.). **Posición correcta**



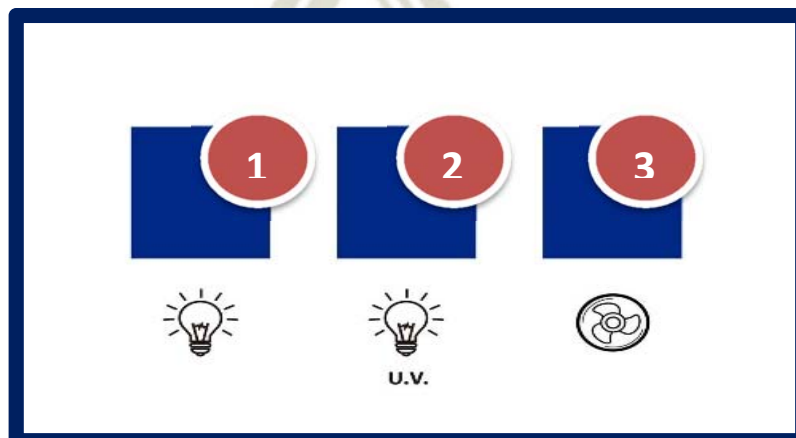
b. CARATULA DE MANDOS

i. DESCRIPCION DE LA CARATULA DE MANDOS

- 3 Pulsadores

ii. FUNCIONES DE LA CARATULA DE MANDOS

- Pulsador nº 1: Conecta la iluminación, es de tipo on/off
- Pulsador nº 2: Conecta la lámpara germicida U. V., es de tipo on/off.
- Pulsador nº 3: Conecta el ventilador, es de tipo on/off. Por defecto la velocidad del ventilador será la estándar.



iii. LAMPARA GERMICIDA (UV)

Radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra comprendida entre los 200 y los 390 nm. Se utiliza en las cámaras de flujo laminar porque tiene propiedades bactericidas.



PRECAUCION

En caso de utilizarse este accesorio, deben observarse las precauciones normales en el uso de este tipo de lámparas.

Su empleo viene sólo indicado para la esterilización exterior previa de los materiales introducidos en la cámara.

Para ello la lámpara es un complemento previo al trabajo en la cámara, y es imprescindible mantenerla apagada cuando el operario esté enfrente de la mesa o trabajando en la misma.

Las radiaciones directas de los rayos U.V. se reflejan sobre partes metálicas pulidas y pueden dañar seriamente los ojos del operario. Por todo esto, se debe utilizar la lámpara germicida únicamente cuando no se esté trabajando.

Antes de iniciar cualquier intervención de Mantenimiento o desmontaje de la cabina, desconectarla de la fuente de energía.

En general, una vez al año debe efectuarse un control periódico del correcto funcionamiento de todos los componentes de la cabina.

| OPERACIÓN | PERIODICIDAD |
|--------------------------------------|---|
| Limpieza del prefiltro | Cada 500 horas de trabajo |
| Substitución del prefiltro | Cada 1000 horas de trabajo o una vez al año |
| Substitución de los filtros Absoluto | Cada 3000/ 4000 horas de trabajo |

b. CAMBIO DE LÁMPARA UV

Para cambiar la lámpara ultravioleta, deben seguirse las indicaciones del fabricante. Por lo general, se efectúan los siguientes procedimientos:

- Desconectar la alimentación eléctrica a la cabina.
- Abrir la puerta frontal
- Descontaminar las superficies interiores y la lámpara UV.
- Desencajar el tubo UV de sus conectores girándolo 90 grados; a continuación, instalar un repuesto de las mismas características del original.

6. LIMPIEZA Y DESINFECCION

En la limpieza de la mesa de trabajo y los laterales, se utilizarán tejidos estériles o de un solo uso que no desprendan partículas ni fibras.

Para la desinfección se utilizarán estos tejidos ligeramente humedecidos con una solución desinfectante que no perjudique o altere el acero inoxidable o los cristales. También puede realizarse una limpieza previa a la desinfección con agua y jabón.

Una adecuada destreza minimizará el riesgo de derrames accidentales. En caso de escape de muestra, es necesario actuar con prontitud con el fin de evitar la contaminación (retirar y esterilizar la superficie de trabajo, tratar el vertido mediante un agente bactericida adecuado y eliminarlo mediante material absorbente).

Cada día, al finalizar la sesión de trabajo, es necesaria la limpieza y desinfección de la cámara de trabajo. Para este fin se recomienda el alcohol etílico al 70% o algún desinfectante de probada eficacia para los microorganismos manipulados. No se deben utilizar derivados del cloro pues éste puede provocar la corrosión de las superficies de acero inoxidable.

La correcta ejecución de los procedimientos diarios de desinfección y limpieza adecuada hace innecesario el uso de la lámpara U.V, germicida. Si en cualquier caso se opta por usar la misma, se debe tener en cuenta que unos 30 minutos de radiación suelen ser más que suficientes para lograr el efecto desinfectante que se puede alcanzar con este tipo de lámpara.



El tiempo adicional de encendido solo producirá un desgaste prematuro de los materiales y un consumo energético inútil.

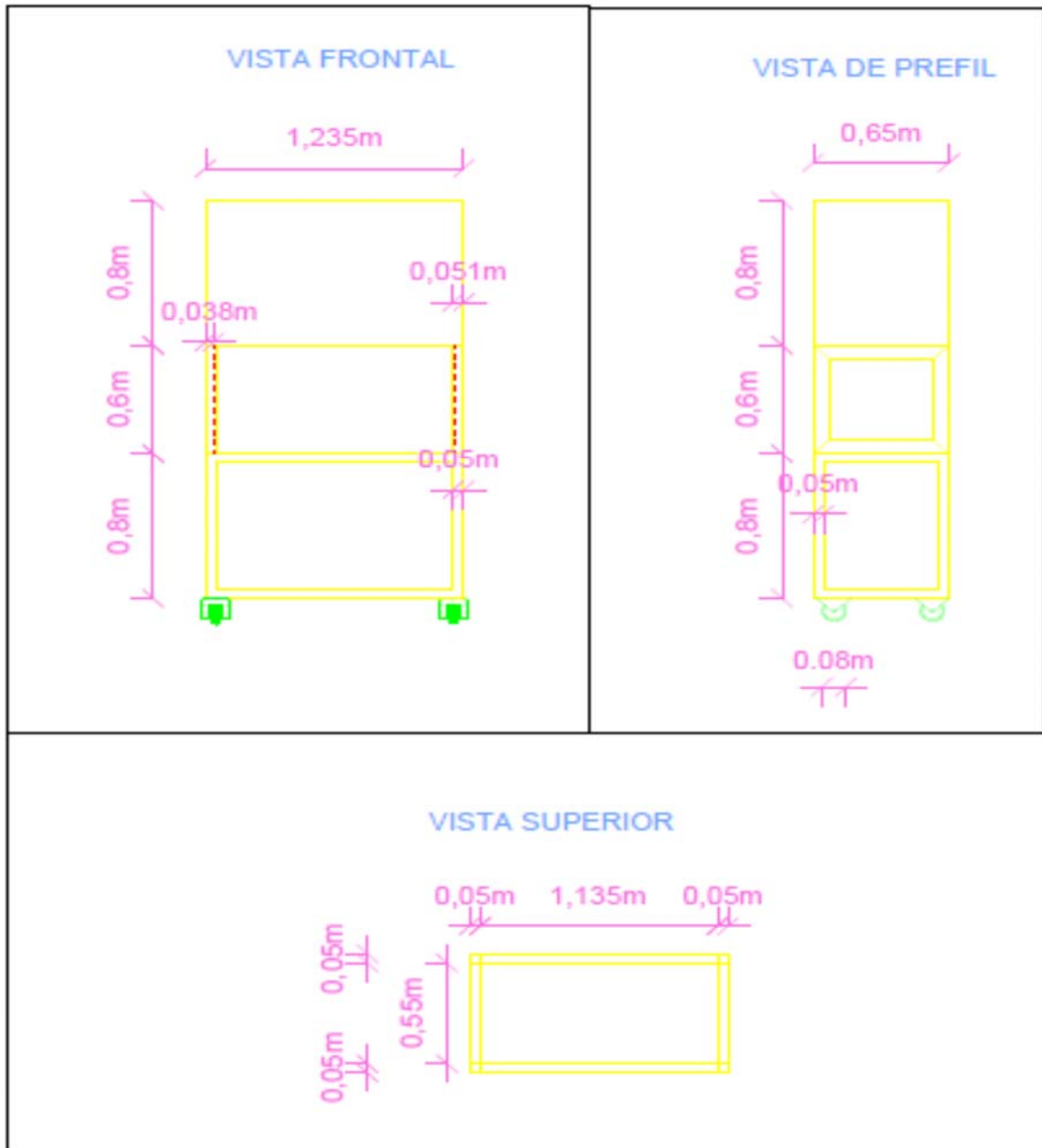
También cabe recalcar que el uso del U.V. no sustituye a los protocolos de limpieza y desinfección mencionados. Por otra parte, es recomendable verificar el nivel de energía emitida por la lámpara con equipos adecuados, pues este va disminuyendo con el tiempo y el uso.

Se debe elaborar una tabla de limpieza, a nivel de usuario como la siguiente:

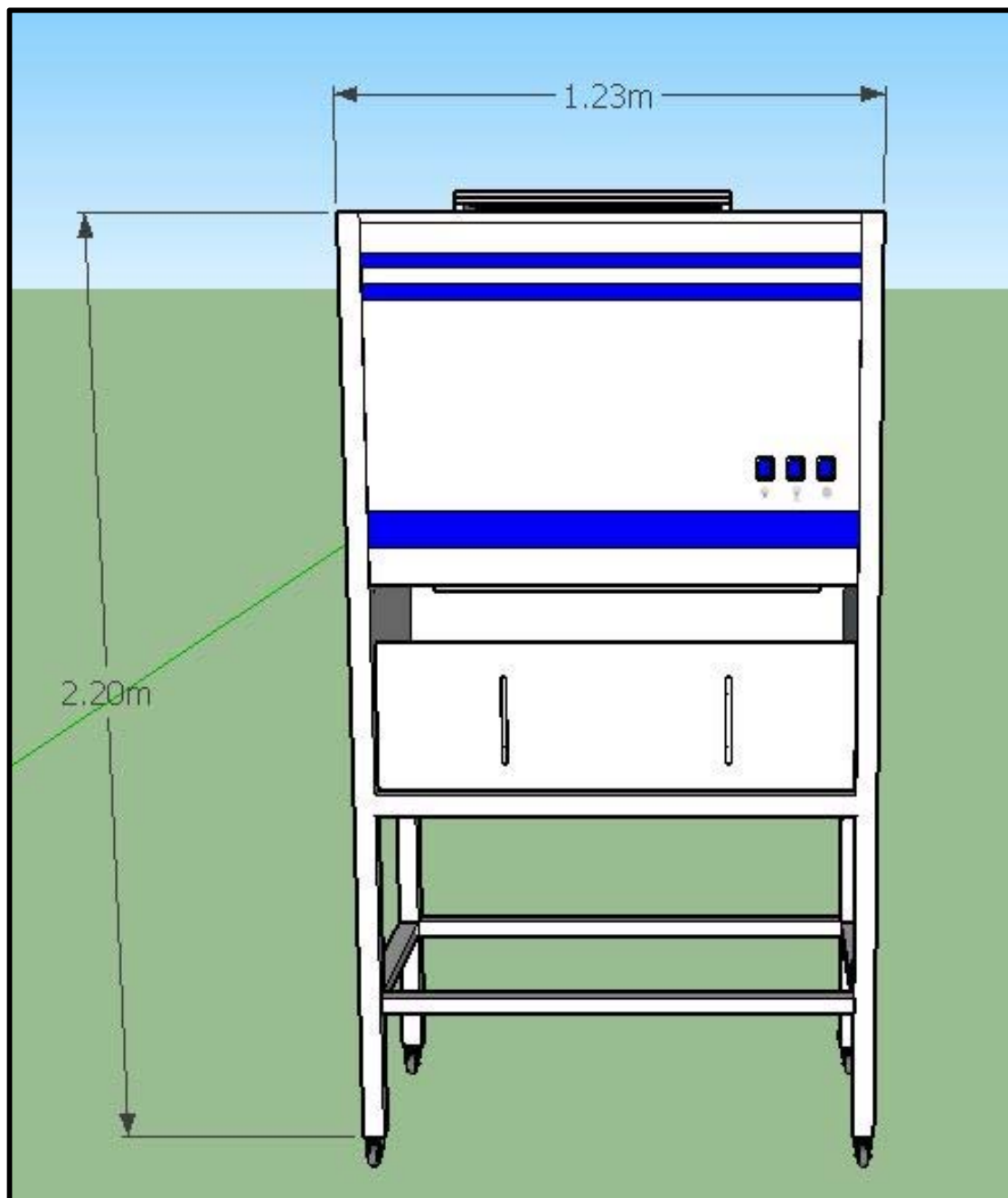
1.5. 6.1. FICHA DE SEGUIMIENTO DE LIMPIEZA

| FICHA DE LIMPIEZA | | | |
|-------------------|--------------------------------|--------|-------|
| FECHA | DESCRIPCION DE LA INTERVENCION | NOMBRE | FIRMA |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

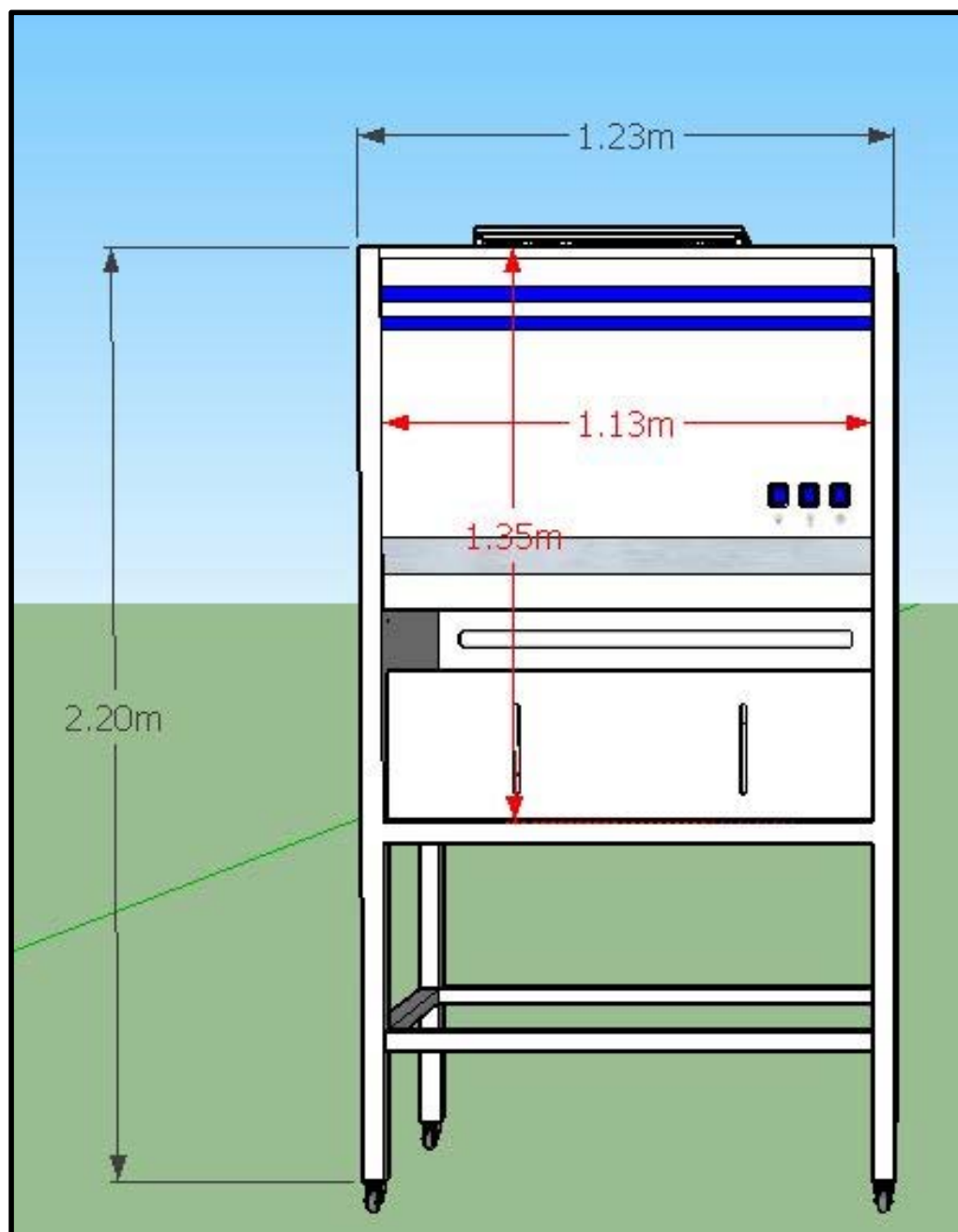
Anexo 06. Plano diseñado para la elaboración de la cámara de flujo laminar



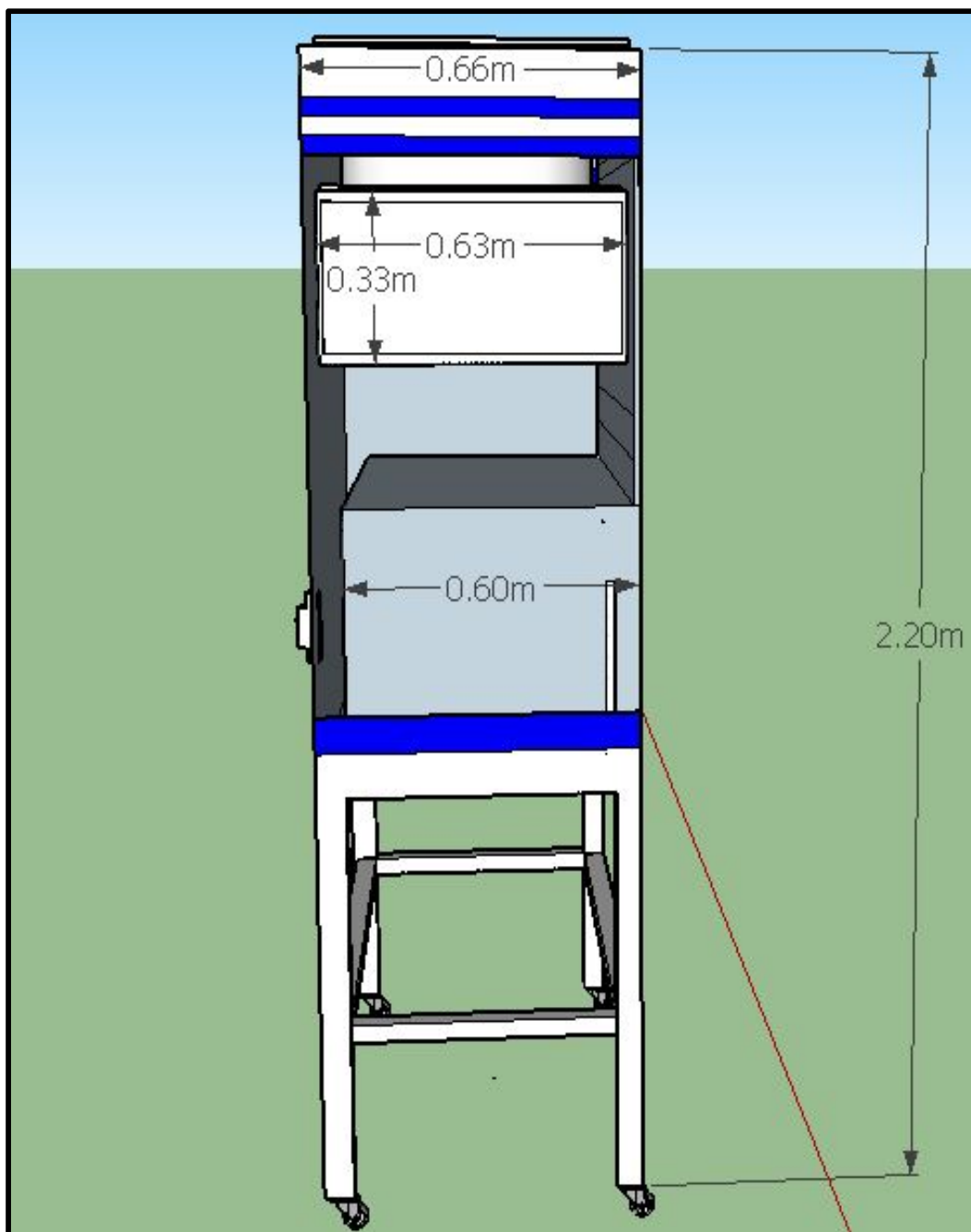
**Anexo 07. Vista tridimensional con medidas de la parte frontal de la
camara de flujo laminar**



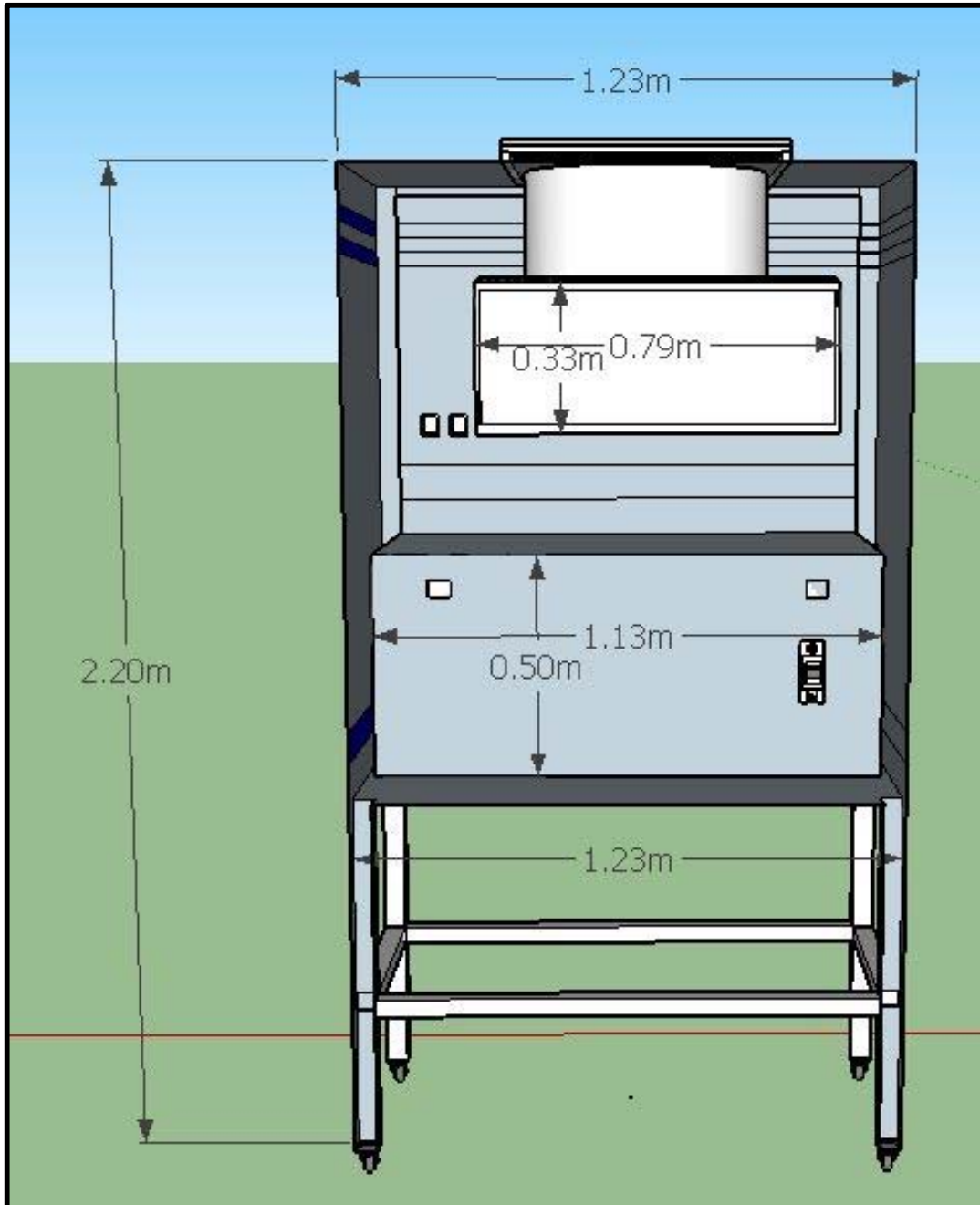
Anexo 08. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la parte frontal de la cámara de flujo laminar



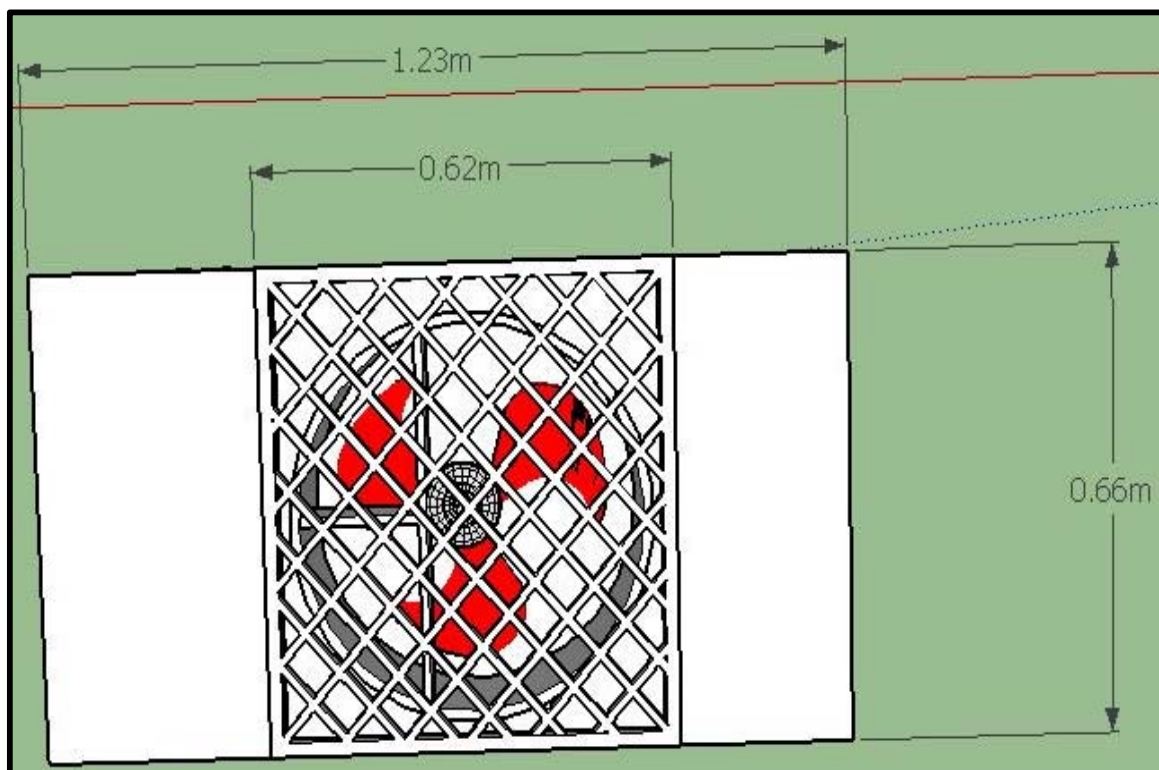
Anexo 09. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la parte lateral de la cámara de flujo laminar



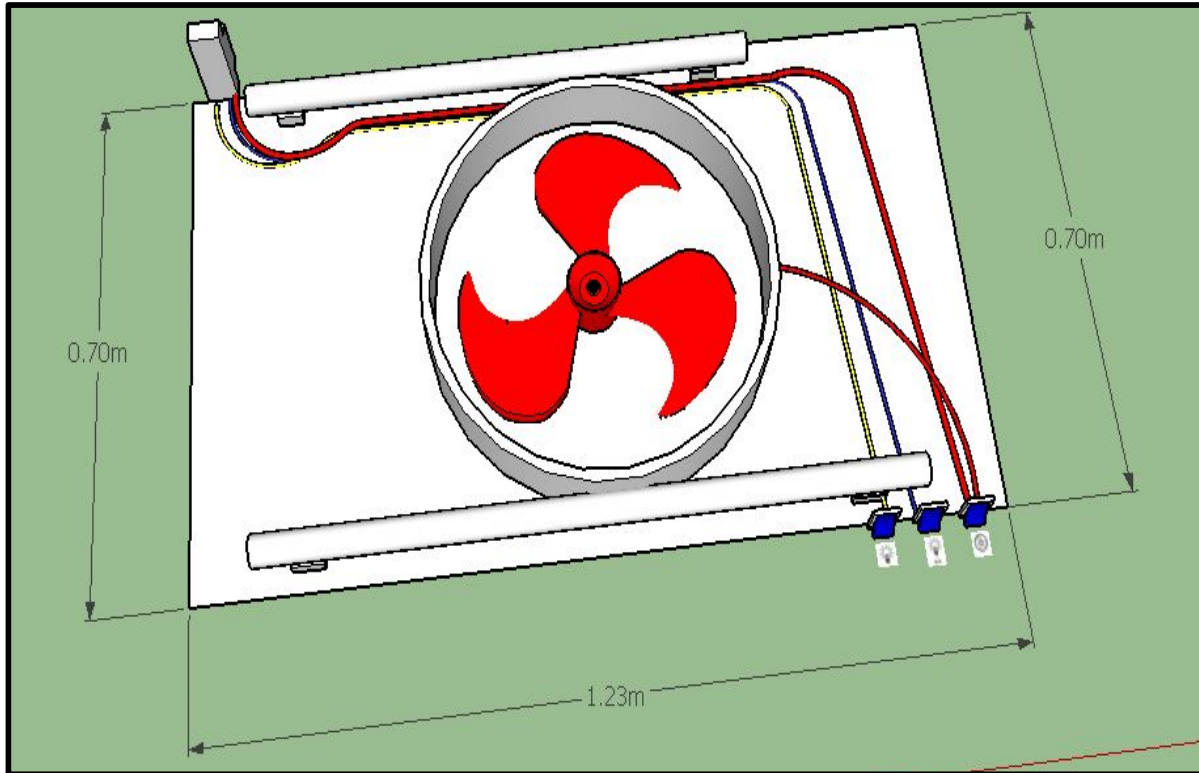
Anexo 10. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la parte anterior de la cámara de flujo laminar



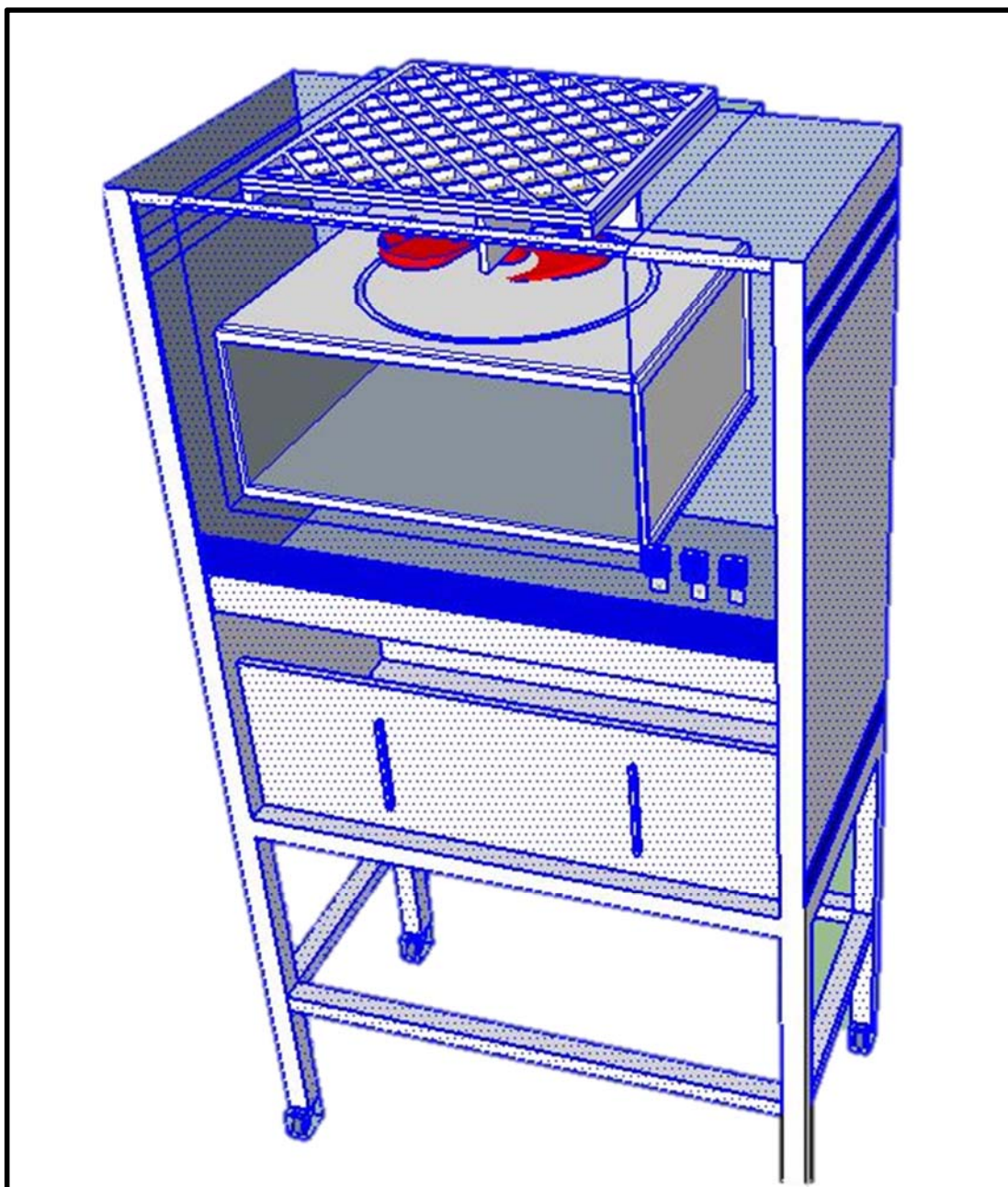
**Anexo 11. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la
parte superior de la cámara de flujo**



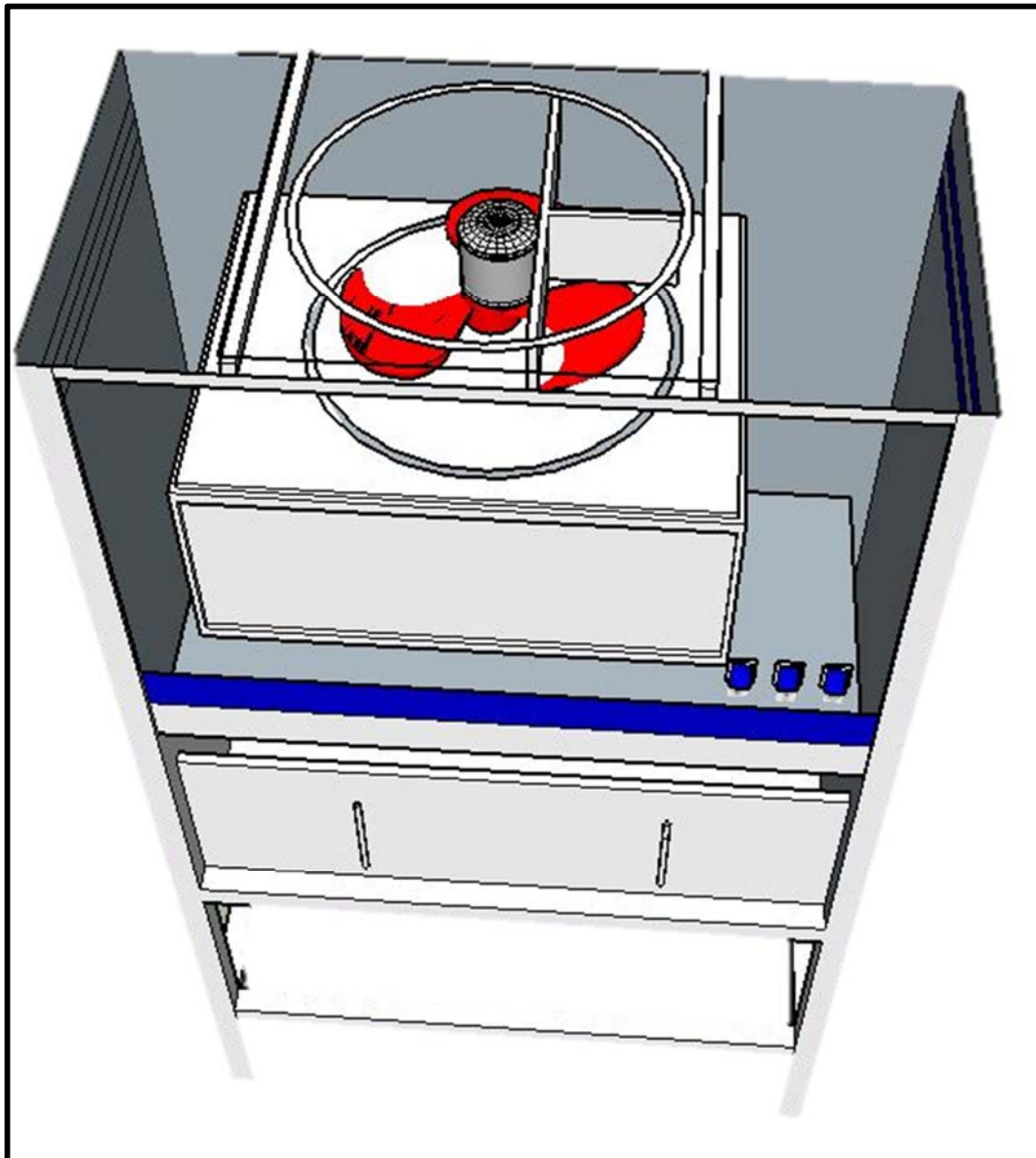
**Anexo 12. Vista tridimensional con medidas externas e internas de la
instalacion electrica de la camara de flujo**



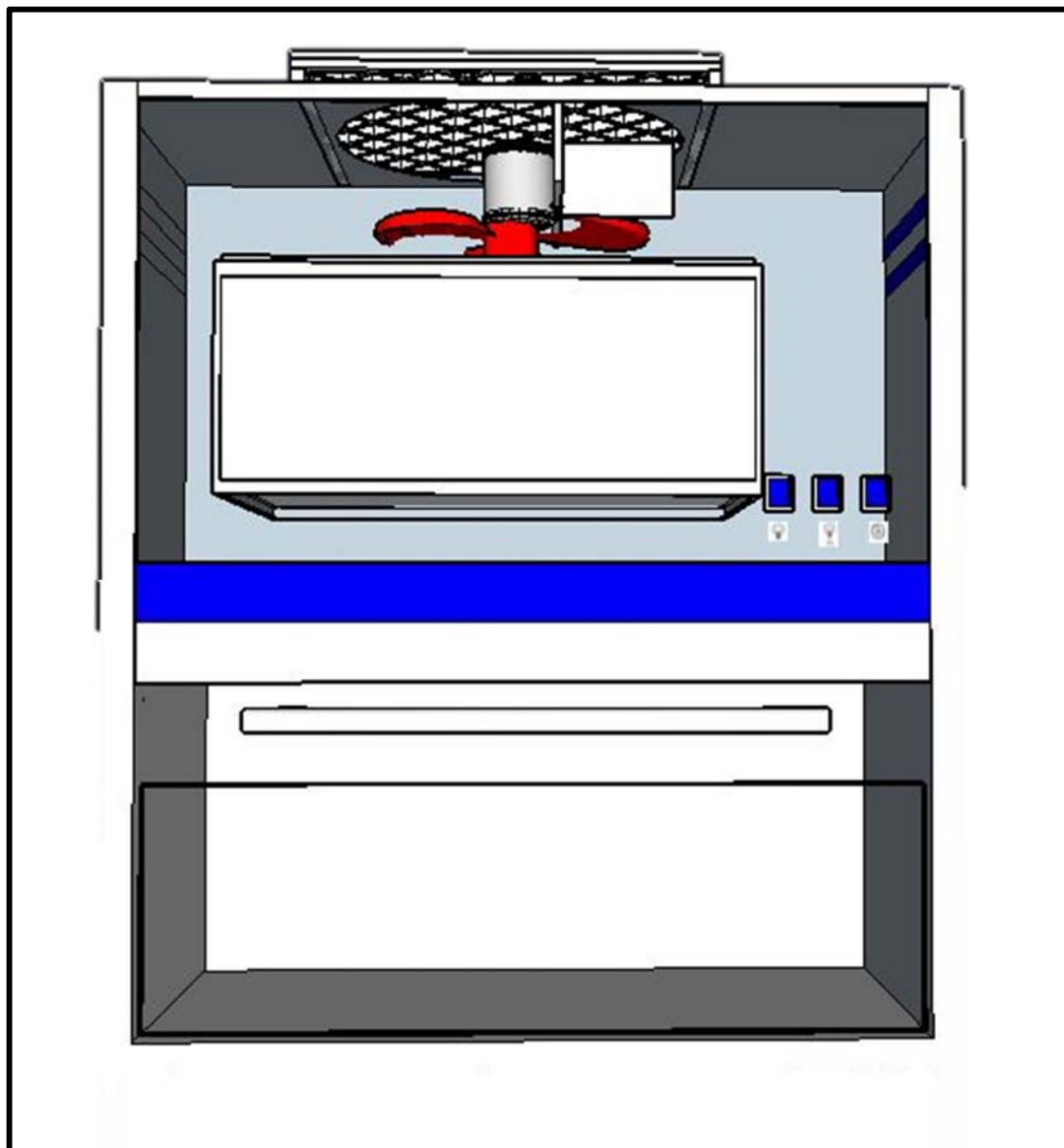
**Anexo 13. Vista tridimensional de la parte frontal de la cámara deflujo
laminar**



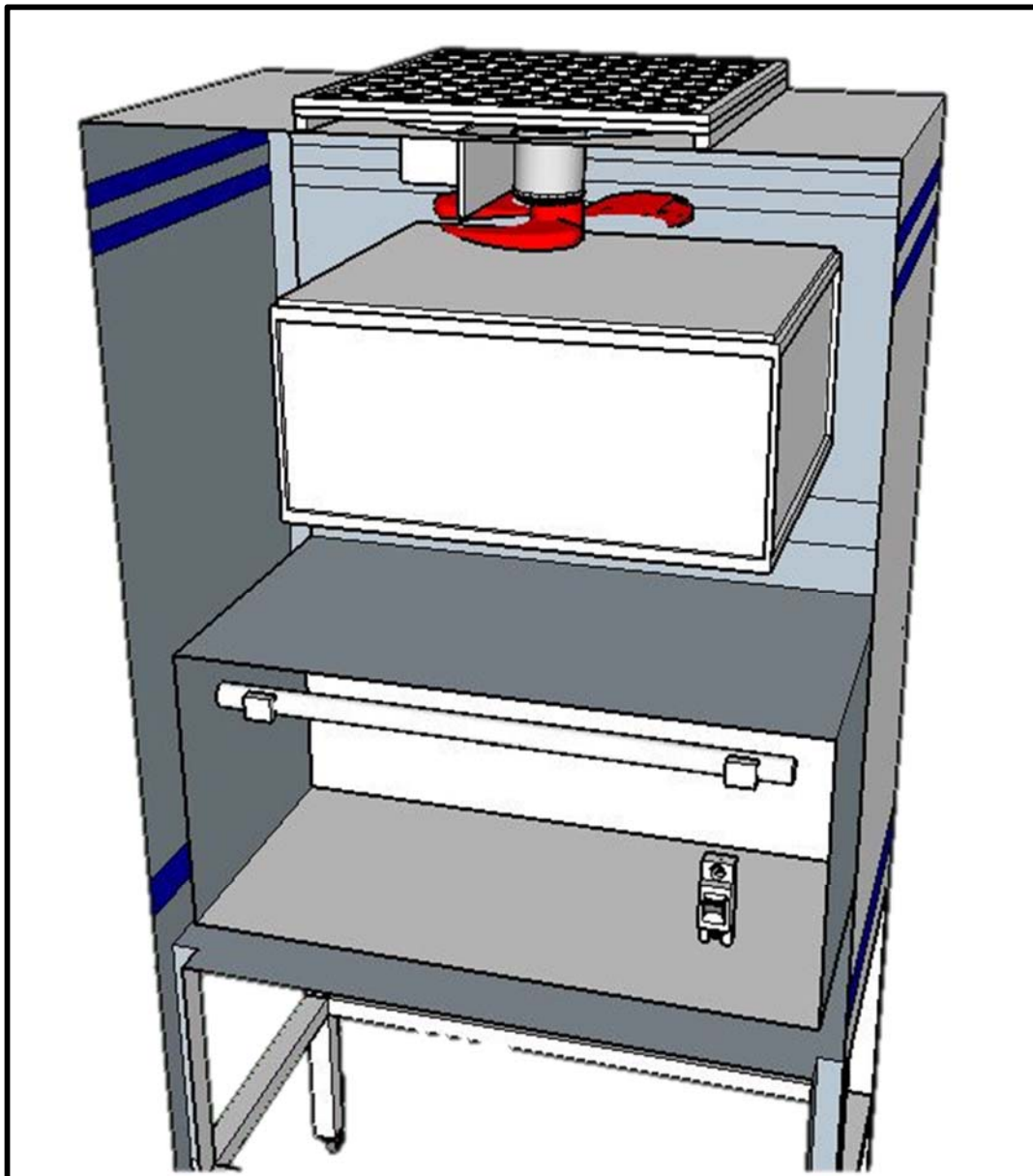
**Anexo 14. Vista tridimensional de la parte frontal posterior superior de la
camara deflujo laminar**



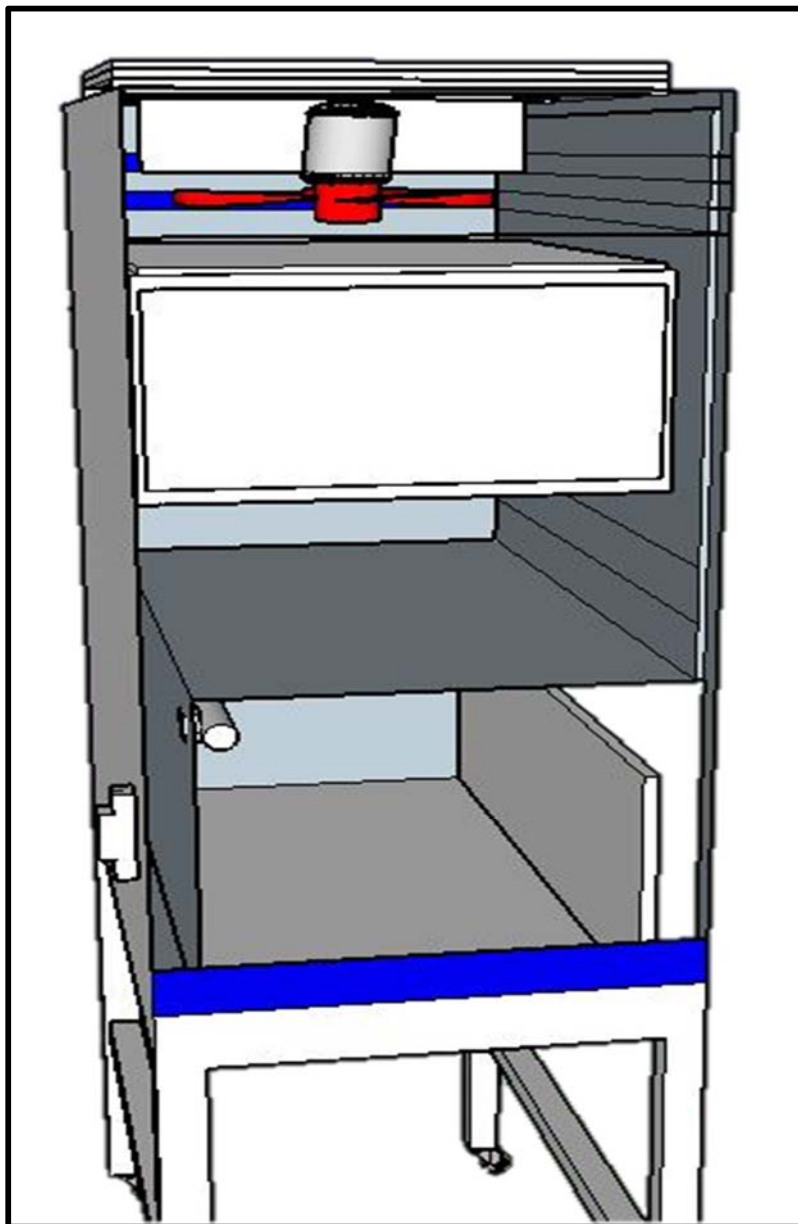
**Anexo 15. Vista tridimensional de la parte frontal de la cámara de flujo
laminar**



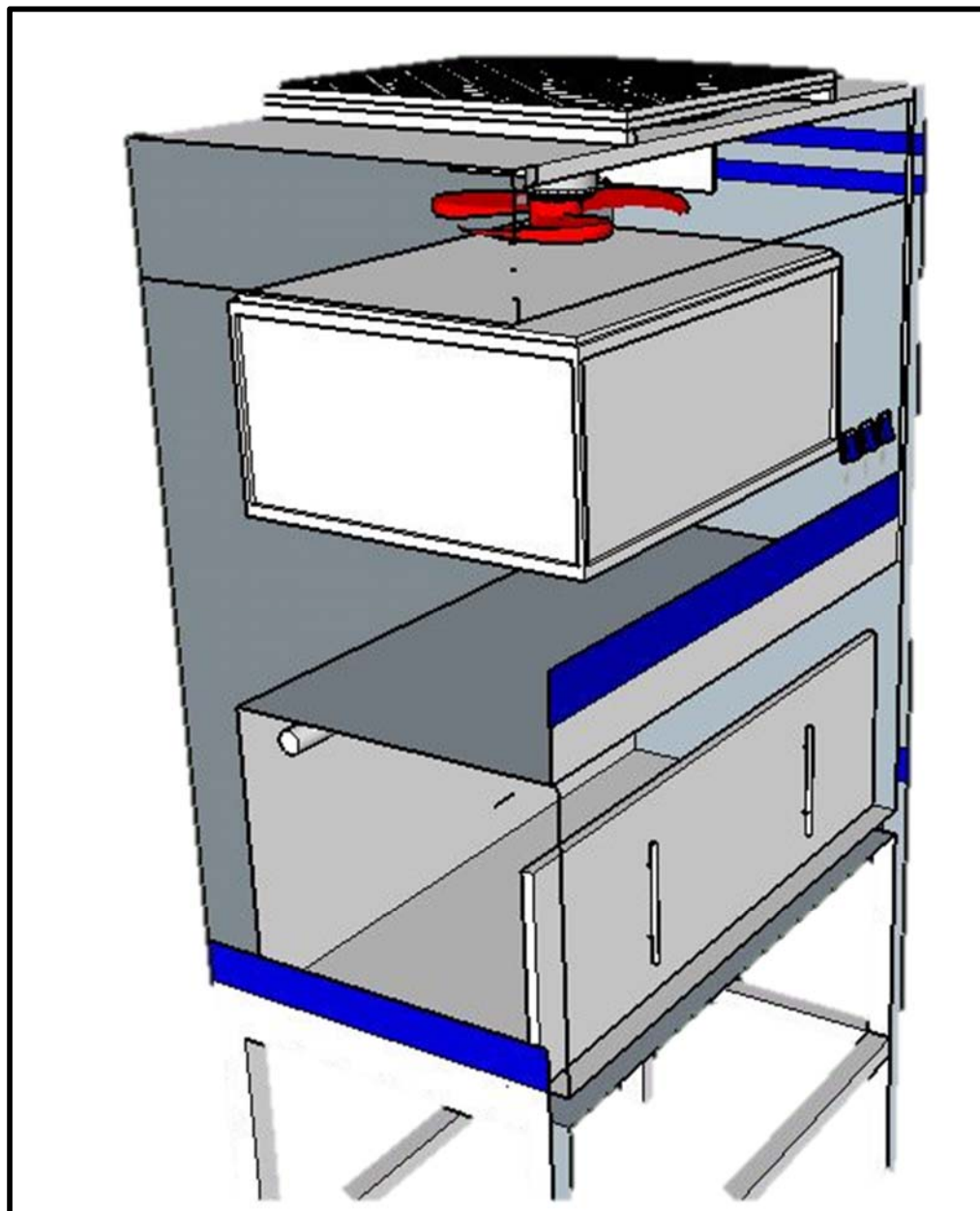
**Anexo 16. Vista tridimensional de la parte frontal anterior de la cámara de
flujo laminar**



**Anexo 17. Vista tridimensional de la parte lateral de la cámara de flujo
laminar**



Anexo 18. Vista tridimensional de la parte lateral de la cámara de flujo laminar



**Anexo 19. Vista tridimensional de la instalación eléctrica de la cámara de
flujo laminar**

