



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

# **DISEÑO, EQUIPAMIENTO Y ORGANIZACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

**Biología Vegetal. Curso 2013-2014**

## ¿Qué laboratorio?

Estudios previos:

Diseño= f (Necesidades del productor/viverista)

Pequeños/medios productores

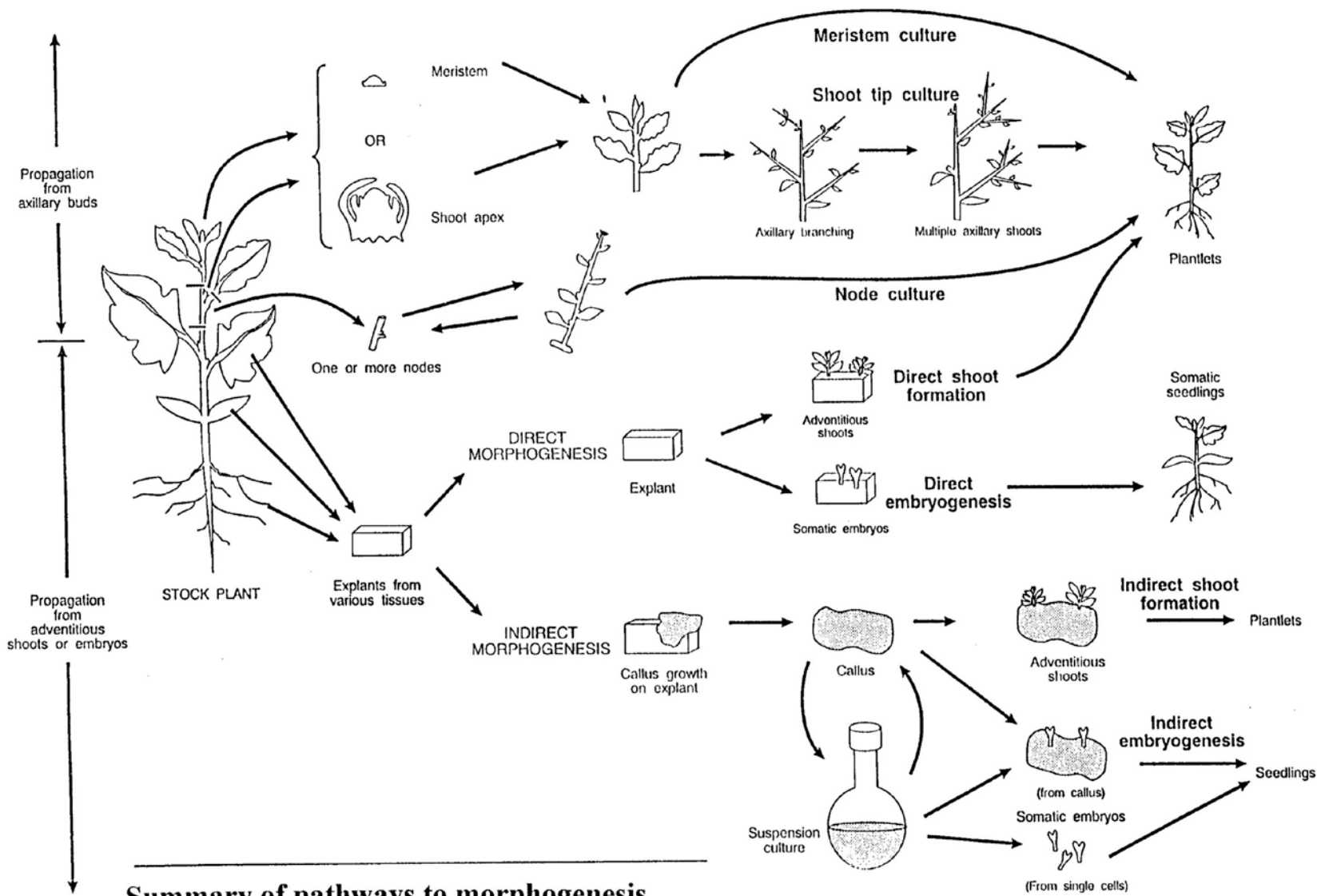


Grandes productores



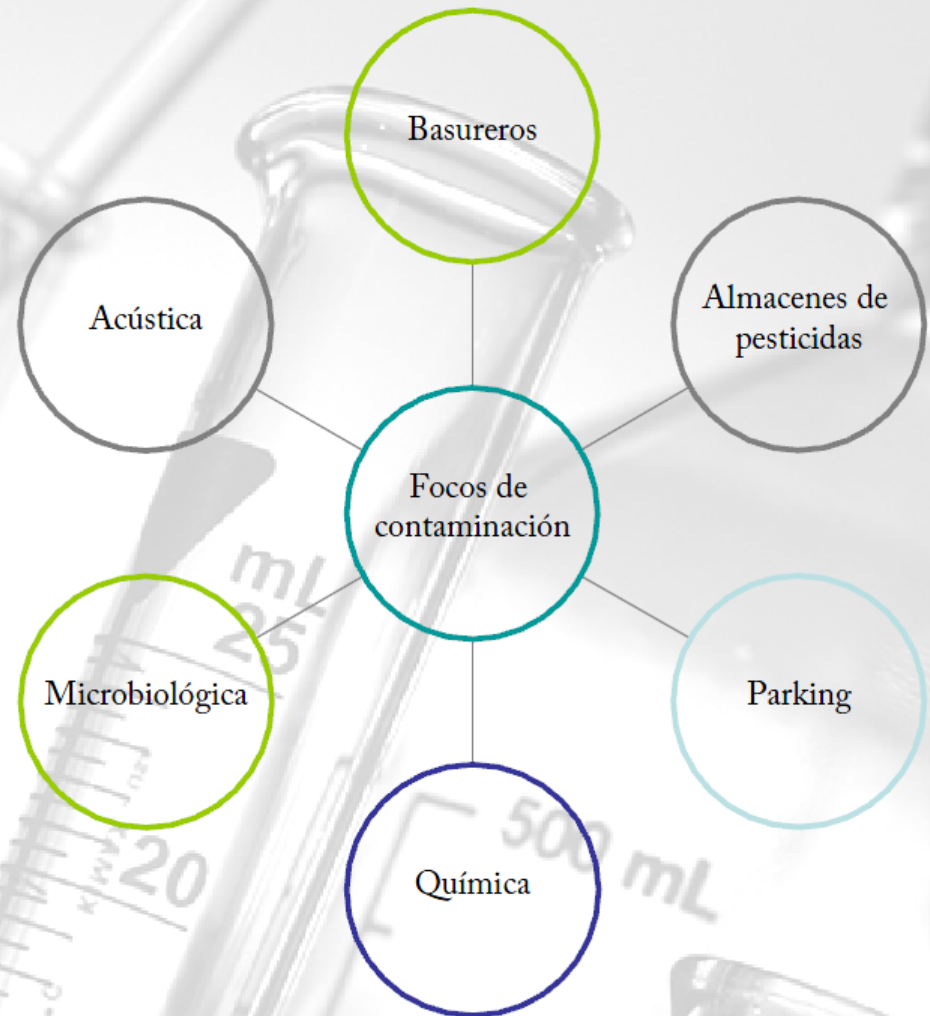
Laboratorios i+d:  
Universidades  
OPI's  
Privados





## ¿Situación del laboratorio?

- Alejado focos de contaminación.
- Zonas de interés estratégico.
- Posibilidad de ayudas estatales.
- Disponibilidad de mano de obra especializada.
- Precio del suelo.
- Etc...



## Salas necesarias:



### Pequeños productores:

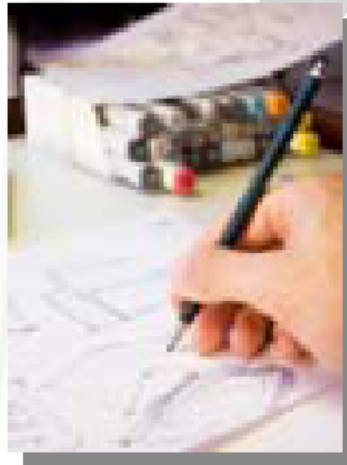
- Unifican instalaciones (Oficina+laboratorio)
- Ideas originales y prácticas.
- Menor aislamiento.

### Grandes productores:

- Salas aisladas para cada operación.
- Automatización.

## Consideraciones previas al diseño del laboratorio:

- ¿Qué especie/es vamos a propagar?
- ¿Qué fases serán necesarias?
- ¿Capacidad de producción (5 cabinas de flujo=1 a 2 M plantas)?
- Acceso al laboratorio y movimientos por las instalaciones.



## Consideraciones previas al diseño del laboratorio:

- Acceso al laboratorio y movimientos por las instalaciones.

Radial

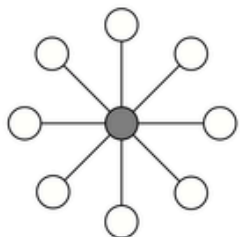
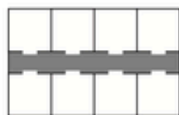


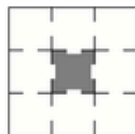
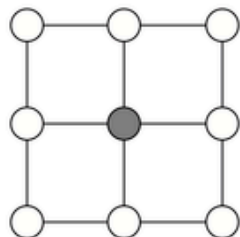
Figure 2. Network analysis metrics used to quantify spatial arrangement of spaces within Lillis Hall.



$$\text{Betweenness} = \frac{28 \text{ paths through}}{36 \text{ paths total}} = 0.78$$

Degree = 8  
Connectance = [1 .. 2]

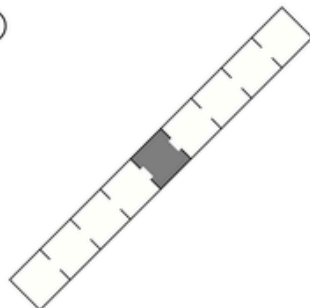
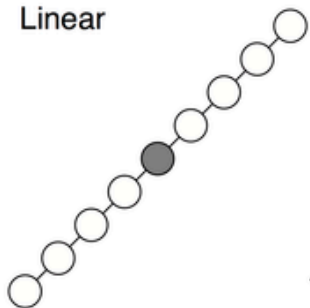
Grid



$$\text{Betweenness} = \frac{30 \text{ paths through}}{70 \text{ paths total}} = 0.43$$

Degree = 4  
Connectance = [1 .. 4]

Linear



$$\text{Betweenness} = \frac{16 \text{ paths through}}{36 \text{ paths total}} = 0.44$$

Degree = 2  
Connectance = [1 .. 8]

Examples in the left column follow classic network representation, while those in the right column embody the architectural translation of networks. Shaded nodes and building spaces correspond to centrality measures [22] of *betweenness* (the number of shortest paths between all pairs of spaces that pass through a given space over the sum of all shortest paths between all pairs of spaces in the building) and *degree* (the number of connections a space has to other spaces); *connectance distance* (the number of doors between any two spaces) is a pairwise metric, shown here as the range of connectance distance values for each complete network/building. Since *betweenness* and *degree* strongly co-vary and are both measures of network centrality [22], they are considered together in some analyses. doi:10.1371/journal.pone.0087093.g002

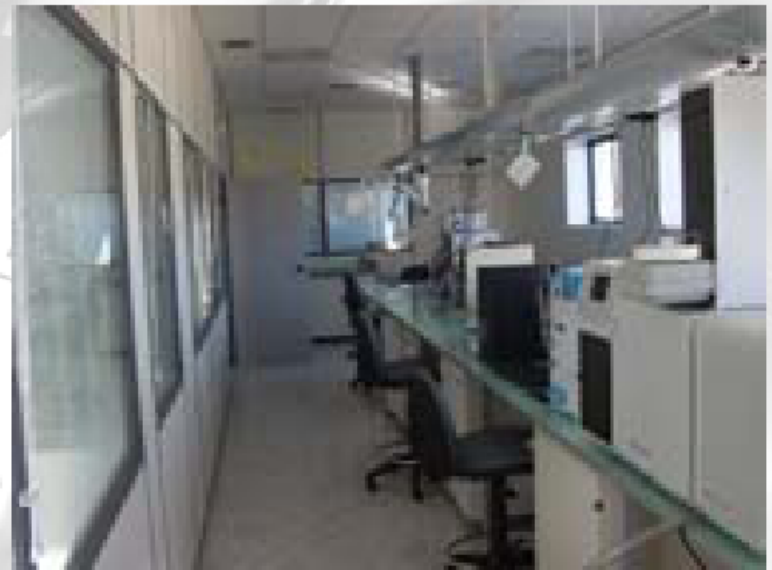
## Requerimientos generales

### a) Suelo:

- Resistente (equipos pesados).
- Superficie fácil de eliminar posibles contaminaciones.
- Antideslizante.
- Materiales más adecuados: PVC, linóleo, cerámica,...

### b) Servicios/instalaciones:

- Agua corriente.
- Depósito de agua.
- Electricidad:
  - Diseño de distintas líneas.
  - Potencia total y picos.
  - Generador/SAI.
  - Prever futuras expansiones.
- Gas:
  - Bombonas/Gas ciudad.
  - Detectores.





## Requerimientos generales

### c) Mobiliario:

- Bancadas resistentes (equipos pesados).
- Superficie fácil de eliminar posibles contaminaciones.
- Fregaderos resistentes a ácidos y bases.
- Materiales más adecuados: PVC, acero inox, cerámica,...



### d) Paredes, puertas y ventanas:

- Fácil limpieza, no acumulen suciedad.
- Materiales plásticos.
- Entrada de grandes equipos, movimiento de carros.

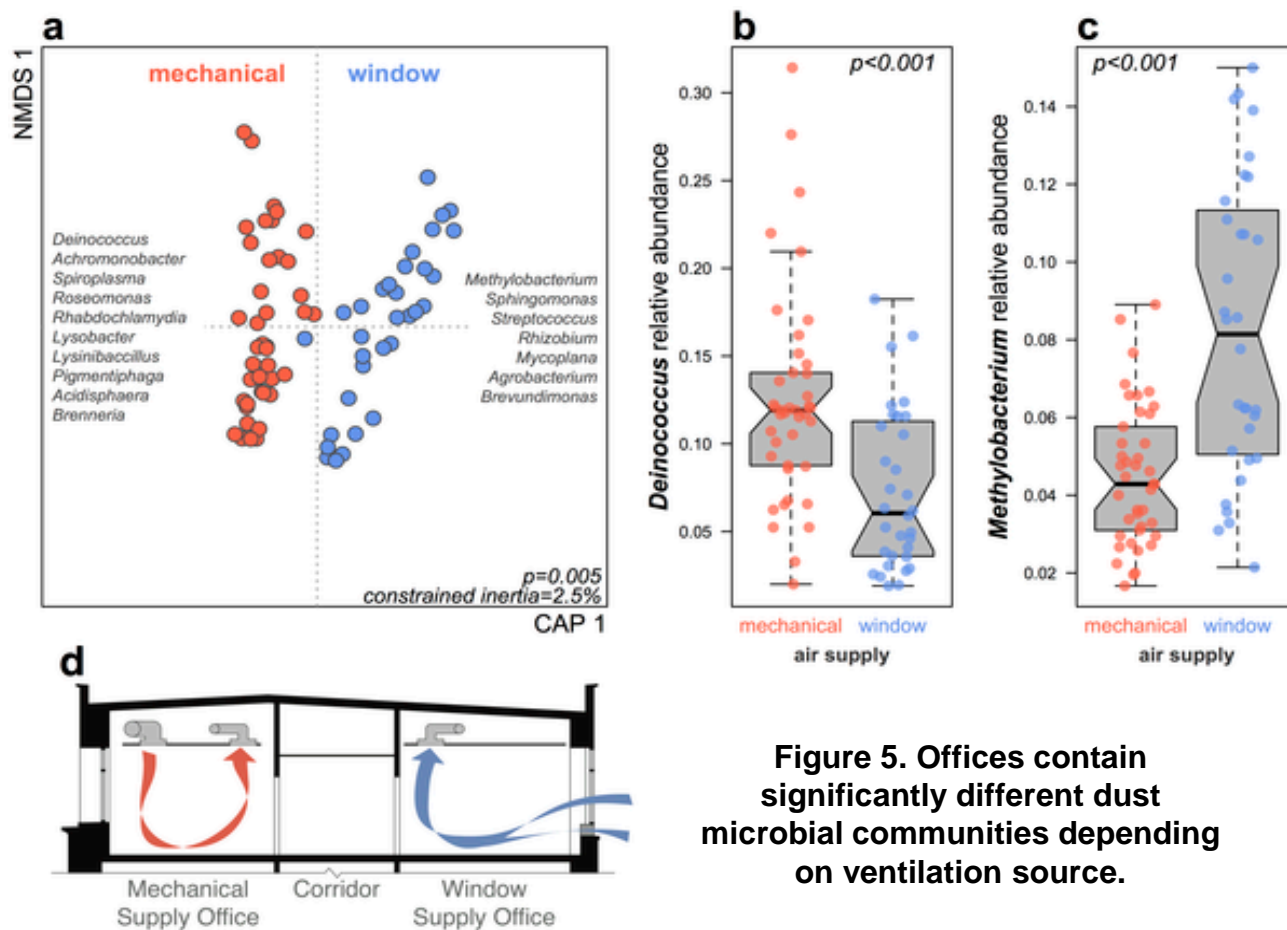
### e) Botiquín y medidas de seguridad:

- Duchas, lavaojos, mantas,...).
- Campanas extractoras.



## Requerimientos generales

f) Circulación/movimientos de aire:



**Figure 5. Offices contain significantly different dust microbial communities depending on ventilation source.**

a) The first axis is constrained by whether or not offices have operable window louvers (blue) or not (red). Taxon names on either side are grouped from the 25 strongest weighting OTUs in either direction. b) *Deinococcus* were 1.7 times more abundant in mechanically ventilated offices compared to window ventilated offices. c) The opposite pattern was observed for *Methylobacterium* OTUs, which were 1.8 times more abundant in window ventilated offices. Boxplots delineate (from bottom) minimum, Q1, median, Q3, and maximum values; notches indicate 95% confidence intervals. d) Cross-sectional view of representative Lillis Hall offices. Offices on the south side of the building (left) received primarily mechanically ventilated air, while offices on the north side of the building (right) are equipped with operable windows as a primary ventilation air source.

doi:10.1371/journal.pone.0087093.g005

Kembel SW, Meadow JF, O'Connor TK, Mhuireach G, et al. (2014) Architectural Design Drives the Biogeography of Indoor Bacterial Communities. PLoS ONE 9(1): e87093. doi:10.1371/journal.pone.0087093

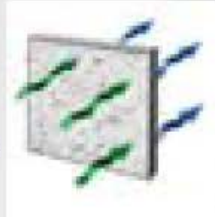
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0087093>

## Requerimientos generales

f) Circulación/movimientos de aire:

Aire filtrado HEPA (High Efficiency Particle removal-Air 0,3  $\mu\text{m}$ ).

- Todo el laboratorio: Mejor control de las posibles contaminaciones.
- Determinadas salas.



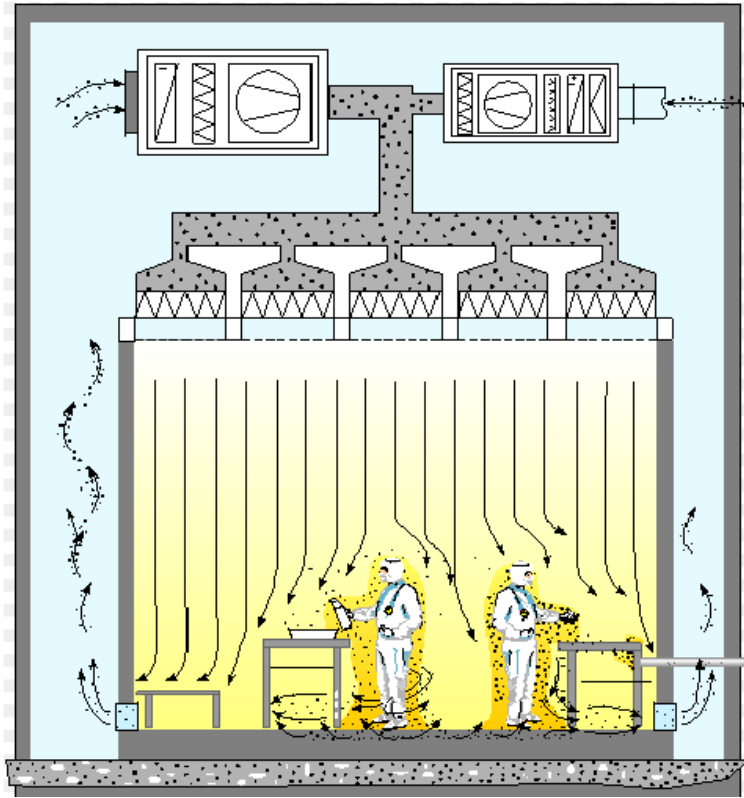
Laboratorios privados:

- Grandes medidas de seguridad (batas, zapatos, gorros,...)
- Imposibilidad de entrar en determinadas salas.
- Uso de ventanas de servicio.
- Minimizar el nº de entradas a las cámaras de cultivo.
- Puertas dobles.
- Presión positiva.



Universidades y OPI's: control menos riguroso.





Class	maximum particles/ft <sup>3</sup>					ISO equivalent
	≥0.1 μm	≥0.2 μm	≥0.3 μm	≥0.5 μm	≥5 μm	
1	35	7	3	1		ISO 3
10	350	75	30	10		ISO 4
100		750	300	100		ISO 5
1,000				1,000	7	ISO 6
10,000				10,000	70	ISO 7
100,000				100,000	700	ISO 8

HEPA class	retention
E10	> 85%
E11	> 95%
E12	> 99.5%
H13	> 99.95%
H14	> 99.995%
U15	> 99.9995%
U16	> 99.99995%
U17	> 99.999995%

**ISO 14644-1 cleanroom standards**

Class	maximum particles/m <sup>3</sup>						FED STD 209E equivalent
	≥0.1 μm	≥0.2 μm	≥0.3 μm	≥0.5 μm	≥1 μm	≥5 μm	
ISO 1	10	2					
ISO 2	100	24	10	4			
ISO 3	1,000	237	102	35	8		Class 1
ISO 4	10,000	2,370	1,020	352	83		Class 10
ISO 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29	Class 100
ISO 6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293	Class 1000
ISO 7				352,000	83,200	2,930	Class 10,000
ISO 8				3,520,000	832,000	29,300	Class 100,000
ISO 9				35,200,000	8,320,000	293,000	Room air

The specification usually used in the [European Union](#) is the [European Norm](#) EN 1822:2009.

## Descripción de las salas: OFICINA.

Departamentos de ventas, preparación de pedidos, despachos, sala de reuniones...

Laboratorios pequeños/medios:  
oficina-recepción-entrada-despachos.



Laboratorios grandes:  
salas separadas por secciones.



## Descripción de las salas: SALA DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

- En algunos casos no es necesario al usar medio preparados preesterilizados.
- Diseño en función del tipo de medio y modo de preparación:

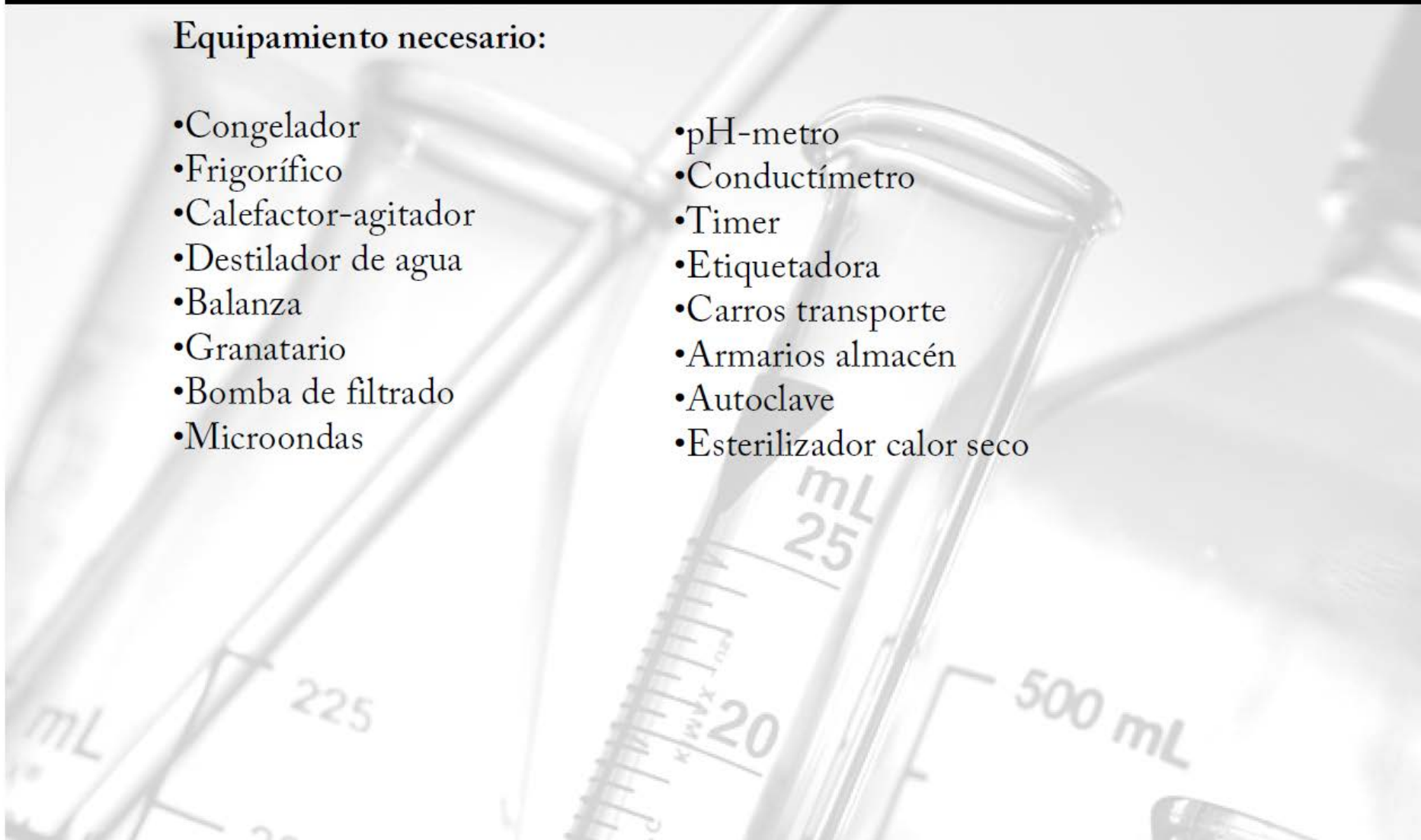
	Coste económico	Equipamiento necesario	Rapidez
Polvo	☹	☺	☺
Stock	☺	☹	☹

- Almacén de productos.
- Almacén de vidrio (cerca de la zona de lavado).

## Descripción de las salas: SALA DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

### Equipamiento necesario:

- Congelador
- Frigorífico
- Calefactor-agitador
- Destilador de agua
- Balanza
- Granatario
- Bomba de filtrado
- Microondas
- pH-metro
- Conductímetro
- Timer
- Etiquetadora
- Carros transporte
- Armarios almacén
- Autoclave
- Esterilizador calor seco





## Descripción de las salas: SALA DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Métodos de esterilización de medios y equipos:

a) Calor seco 150-160 °C/ 1,5-2 h.

Material de trabajo en cabina: pinzas, bisturí,...

Pequeño material de vidrio (no medida).

No apto para plástico, papel o productos orgánicos.

Uso de papel de aluminio.



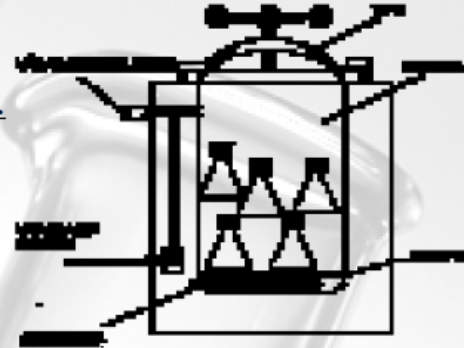
## Descripción de las salas: SALA DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Métodos de esterilización de medios y equipos:

b) Autoclavado 121°C/15 p.s.i. (103 kp)/ 15-20 min.

Grandes laboratorio: autoclaves.

Pequeños laboratorios: ollas a presión.

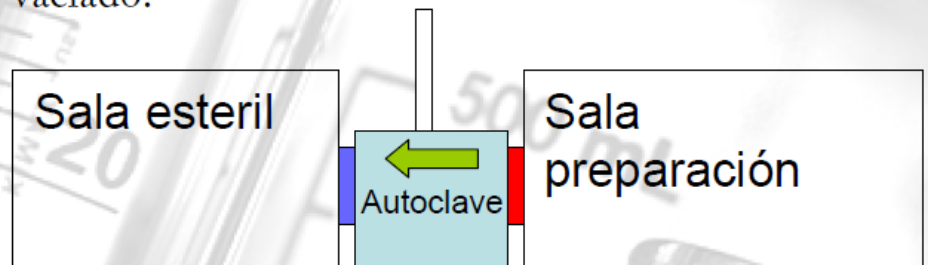


Consideraciones de uso:

- Uso de agua destilada.
- Medidas de seguridad.
- Evitar el autoclavado de medios de cultivo con otro equipamiento.
- Preparación adecuada del material a autoclavar: bolsas y papel de aluminio.
- Usar cinta indicadora para conocer posteriormente si está autoclavado.

Consideraciones para su instalación:

- Espacio alrededor para llenado y vaciado.
- Potencia eléctrica.
- Desague/salida vapor.
- Sistema de doble puerta.



## Descripción de las salas: SALA DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.



Two stovetop autoclaves

W. H. R.



## Descripción de las salas: ZONA DE LIMPIEZA.

### Consideraciones generales:

- Sala aislada del resto del laboratorio.
- Próxima a la sala de preparación de medios.
- Instalaciones necesarias: Agua caliente, fría y destilada.
- Almacén de vidrio y plástico.

### Equipamiento:

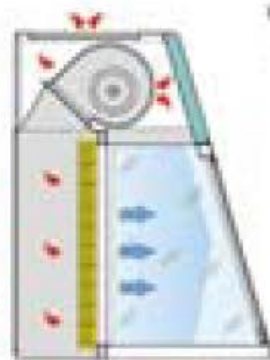
- Fregaderos amplios.
- Contenedores de reciclaje.
- Lavavajillas laboratorio.
- Estufa de secado.



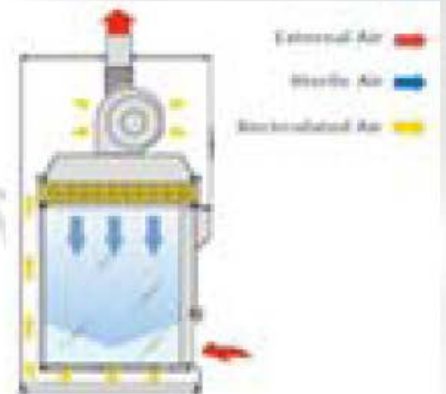
## Descripción de las salas: SALA DE SIEMBRAS-SUBCULTIVOS.

### Consideraciones generales:

- Sala aislada del resto del laboratorio.
- Salas estériles: no es adecuada al trabajo *in vitro* a gran escala.
- Cabinas de flujo laminar:
  - Horizontales y verticales
  - Filtros HEPA.
  - Mantenimiento.



External Air  
Sterile Air



External Air  
Sterile Air  
Recirculated Air

## Descripción de las salas: SALA DE SIEMBRAS-SUBCULTIVOS.

### Habitación de cabinas:

Laboratorios comerciales: muy importante las medidas de control contaminación.

- Ventanas con doble entrada.
- Control de la T.
- Sala acogedora, no claustrofóbica, cómoda.
- Sillas ergonómicas.
- Música?.



### Binoculares:

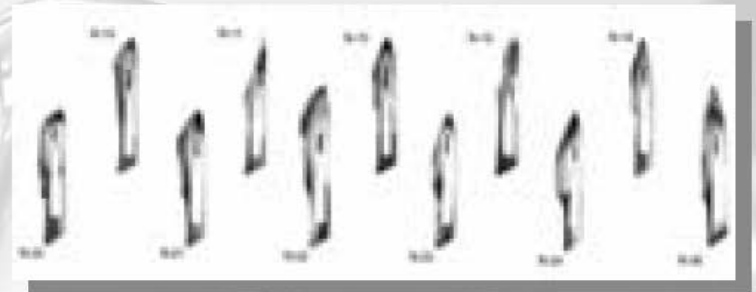
Aislamiento de brotes y meristemas.

- Modelos ergonómicos.

## Descripción de las salas: SALA DE SIEMBRAS-SUBCULTIVOS.

### Equipamiento necesario:

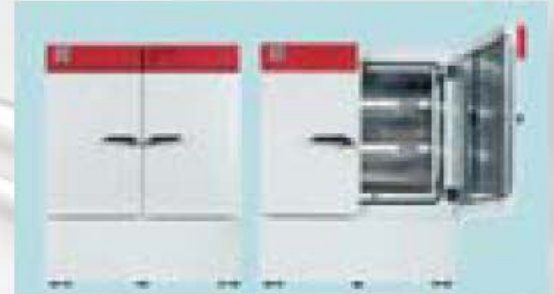
- Cabinas de flujo.
- Binoculares.
- Pequeño instrumental de disección y corte.
- Film-parafina.
- Etiquetadora, marcadores de botes.
- Desinfección de instrumental.



## Descripción de las salas: CÁMARAS DE CULTIVO.

### Consideraciones previas:

- Condiciones de la cámara = f (especie a cultivar).
- Dimensionar adecuadamente:
  - Laboratorios universitarios = pequeños incubadores.
  - Comercialmente = grandes salas.
- Componentes = salas con estanterías + iluminación + control de fotoperiodo, T y HR.
- Paredes blancas.
- Puertas correderas = minimizar corrientes.
- Presión positiva.
- Estanterías:
  - No excesivamente altas.
  - Color blanco o reflectantes.





## Descripción de las salas: CÁMARAS DE CULTIVO.

### Condiciones de la cámara de cultivo:

#### a) Iluminación

- Tipo de cultivo: callos oscuridad-plantas luz.
- Específico para cada especie: 100 a 5.000 lux (iluminancia).  
 $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$  (irradiancia) = 1.000 lux (iluminancia, lumen/ $\text{m}^2$ ).
- ¿Natural?.



## Descripción de las salas: CÁMARAS DE CULTIVO.

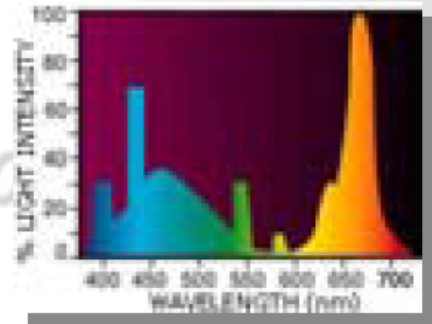
### Condiciones de la cámara de cultivo:

#### a) Iluminación

- Tipo de cultivo: callos oscuridad-plantas luz.
- Específico para cada especie: 100 a 5.000 lux (iluminancia).  
 $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (irradiancia) = 1.000 lux (iluminancia, lumen/m<sup>2</sup>).
- Tipos de fuentes:
  - Philips Agrolite - Se pueden combinar con otros focos, ya que no abarcan el espectro completo, pero si el azul y rojo.
  - Philips TLD 965 (luz dia frio) 6500K - Espectro completo, proporcionan 3250 lumens (36w) .
  - Sylvania-Osram GroLux original (tono morado oscuro) - Espectro azul y rojo
  - Sylvania-Osram GroLux Wide Spectrum (WS) (tono rosado claro) - Idem al anterior

• ¿Natural?.

• Fotoperiodo: 16 h luz + 8 h oscuridad.



## Descripción de las salas: CÁMARAS DE CULTIVO.

Algunos ejemplos aproximados de temperatura de color

1700 K: Luz de una cerilla

1850 K: Luz de vela

2800 K: Luz incandescente o de tungsteno (iluminación doméstica convencional)

3200 K: tungsteno (iluminación profesional)

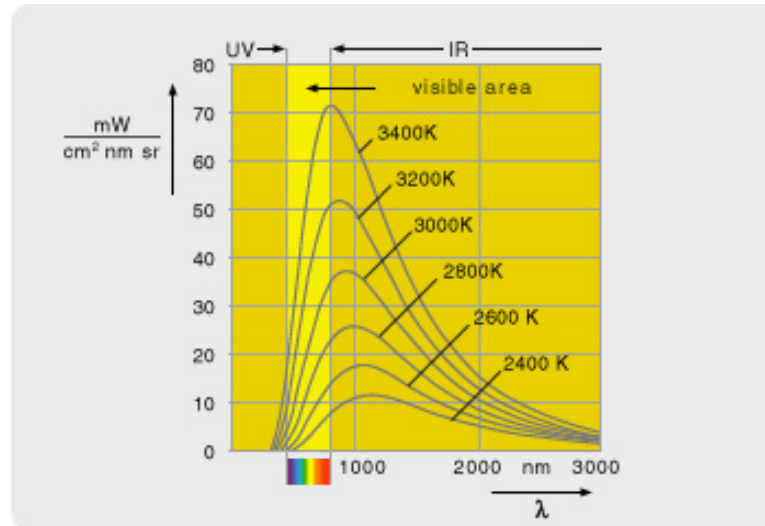
5500 K: Luz de día, flash electrónico

5770 K: Temperatura de color de la luz del sol pura

6420 K: Lámpara de Xenón

9300 K: Pantalla de televisión convencional (CRT)

28000 - 30000 K: Relámpago



## Descripción de las salas: CÁMARAS DE CULTIVO.

### Condiciones de la cámara de cultivo:

#### b) Temperatura:

- Se aceptan variaciones de 2°C.
- Normalmente se usan climatizadores (AA-bomba de calor).
- Eliminar el calor generado por los tubos:
  - Sala de reactancias (separada del resto).
  - Balastos electrónicos.
- Rango de T = f(especie).
  - Normalmente 21-25 °C.
  - Tropicales 30 °C.
- Sonda de control de T y corte de iluminación.

#### c) Humedad relativa:

- Demasiado baja = desecación de los cultivos.
- Demasiado alta = posibles contaminaciones.
- Optimo 70%.



## Descripción de las salas: CÁMARAS DE CULTIVO.



## Descripción de las salas: SALA DE DESCANSO.

- Adecuada a las condiciones del trabajo.
- Uso como sala de reuniones.
- Café, almuerzos, comidas, etc...





**Laminar flow hood**



**Autoclave**



**Media prep room**



**Culture room**

## MÉTODOS DE TRABAJO.

### •Personal:

- Muy importante (ARTE).
- Nº de subcultivos = f(especie, fase del cultivo, operación).
- Aprox. 1000 brotes/persona/día.
- 300-500 semillas/persona/día.
- Normas estrictas para el control de contaminaciones.

Ropa: batas, gorros, mascarillas, zapatos,...

Higiene: lavado frecuente de manos, geles,...



### •Movimiento en el laboratorio:

- Restringir la entrada del personal a las salas con mayor riesgo de contaminación.
- Mantener puertas cerradas (sistemas automáticos).
- Evitar corrientes de aire.

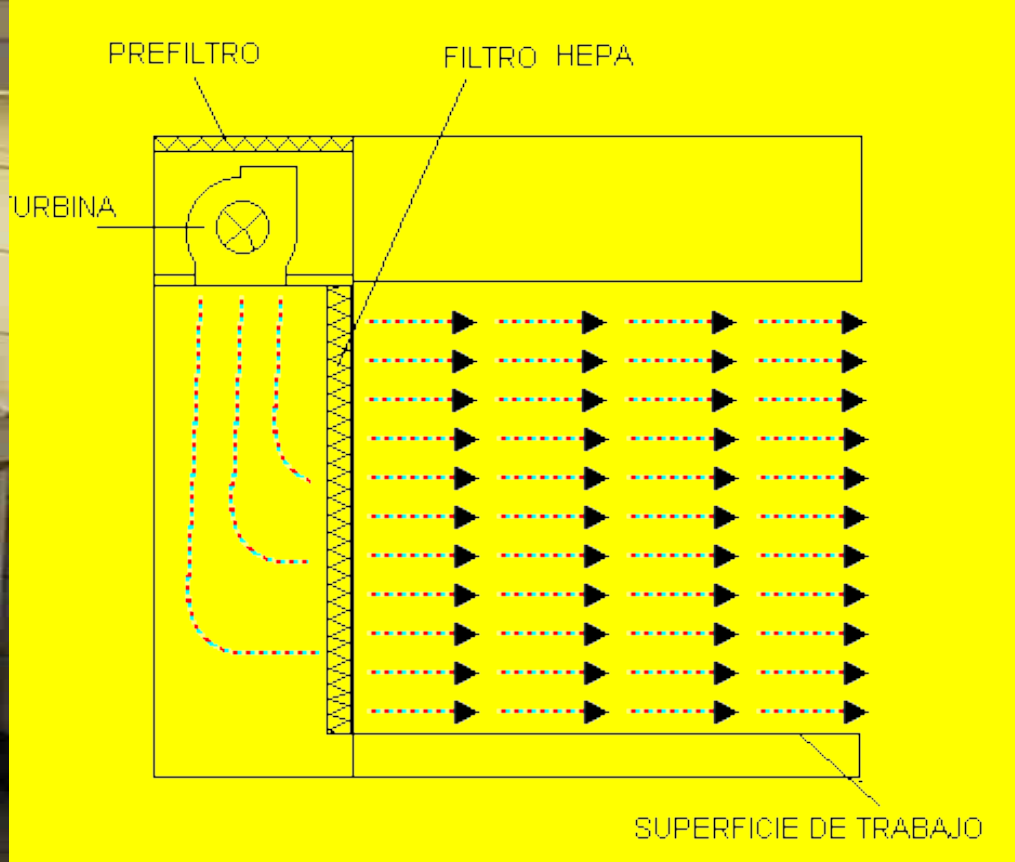


## Técnicas de trabajo en la cabina de flujo laminar.

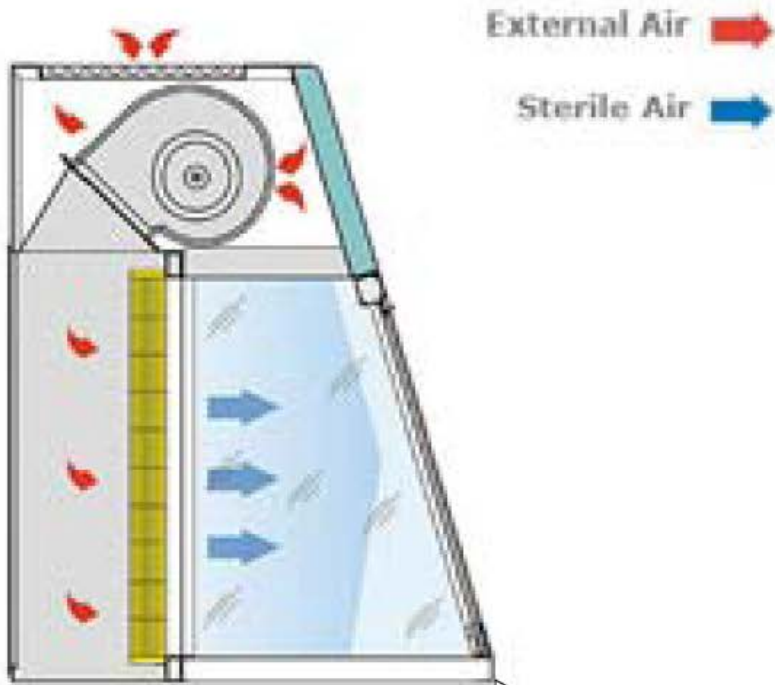
- Conectar la cabina 20 minutos antes (¿UV?).
- Limpiar la superficie con Et-OH 70% (u otro).
- Lavado de manos y ropa adecuada.
- Binocular: esterilizar UV y limpieza. Mantener siempre en cabina.
- Preparación del material de corte y pinzas en cabina (agua esteril).
- Sistema de esterilización en cabina.
- Diseñar ciclo de movimientos en cabinas.
- Superficie de trabajo y corte: placas petri, papel,...



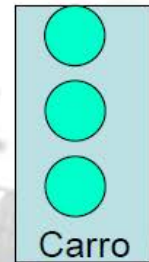
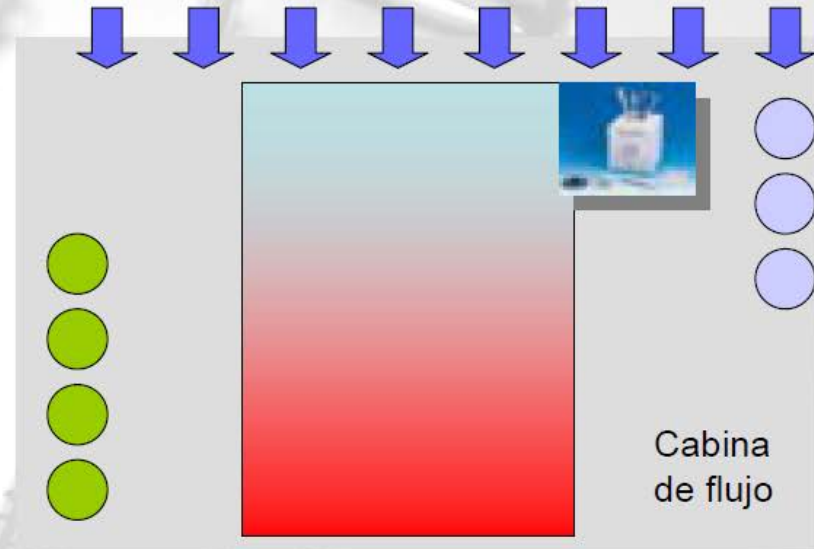
## Técnicas de trabajo en la cabina de flujo laminar.



## Técnicas de trabajo en la cabina de flujo laminar.

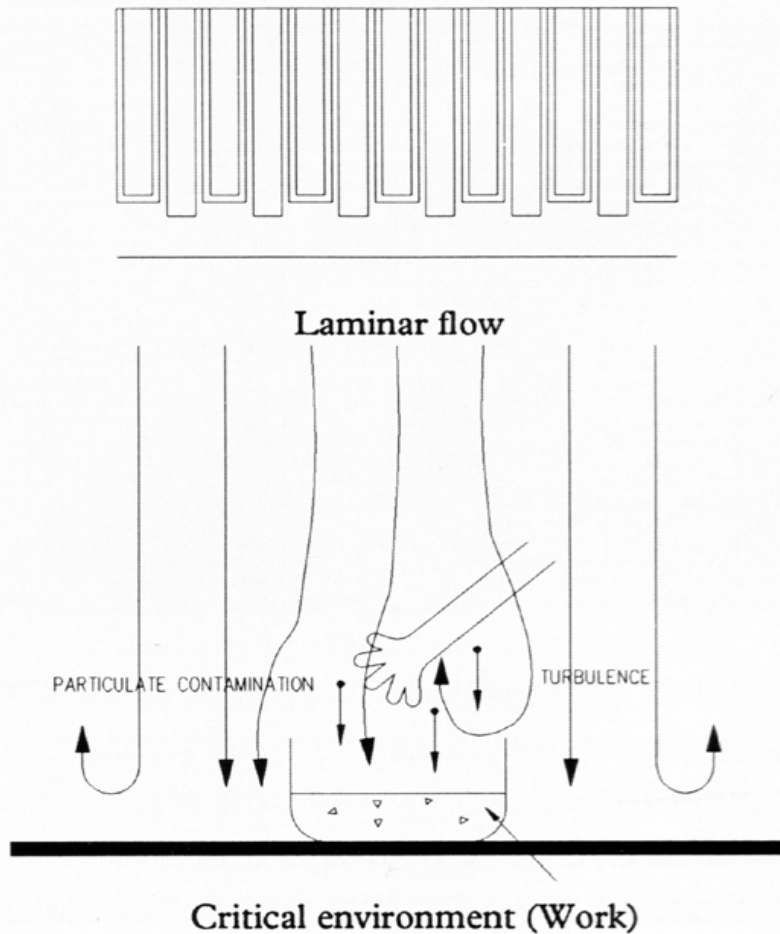


Riesgo de contaminación

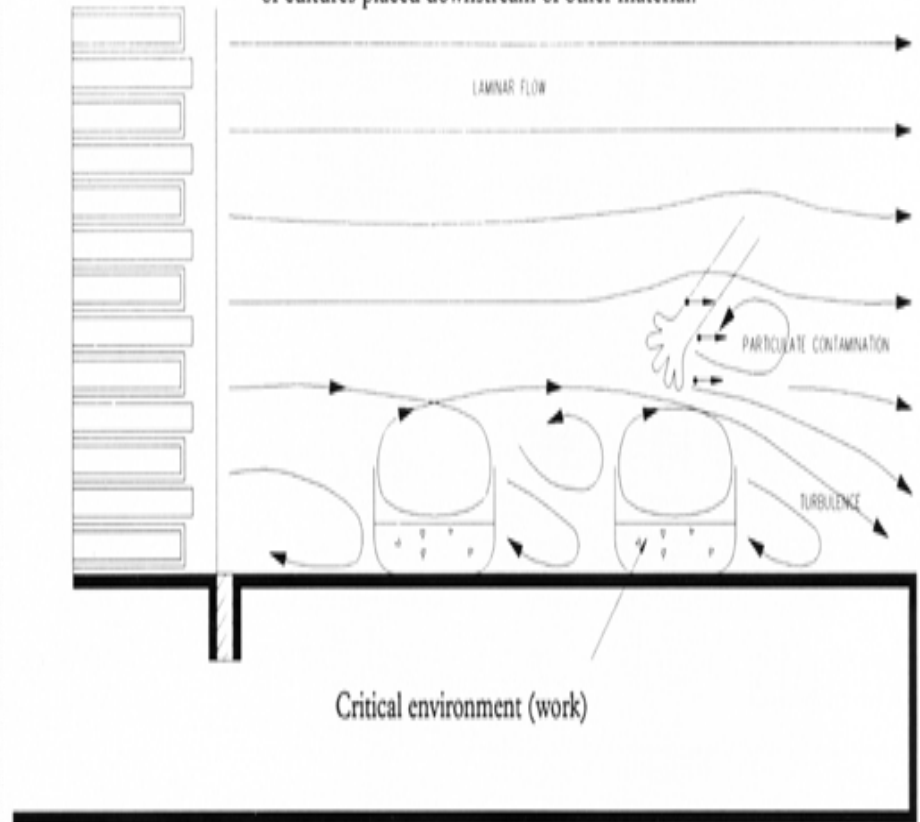


## Técnicas de trabajo en la cabina de flujo laminar.

**Fig 4.** Operator induced contamination by working upstream of culture



**Fig 3.** Airflow turbulence and induction causing cross-contamination of cultures placed downstream of other material.



## **Preparación de medios**

[http://www.youtube.com/watch?v=ltbdM3boWmU&feature=mfu\\_in\\_order&list=UL](http://www.youtube.com/watch?v=ltbdM3boWmU&feature=mfu_in_order&list=UL)

## **Trabajo en condiciones asépticas**

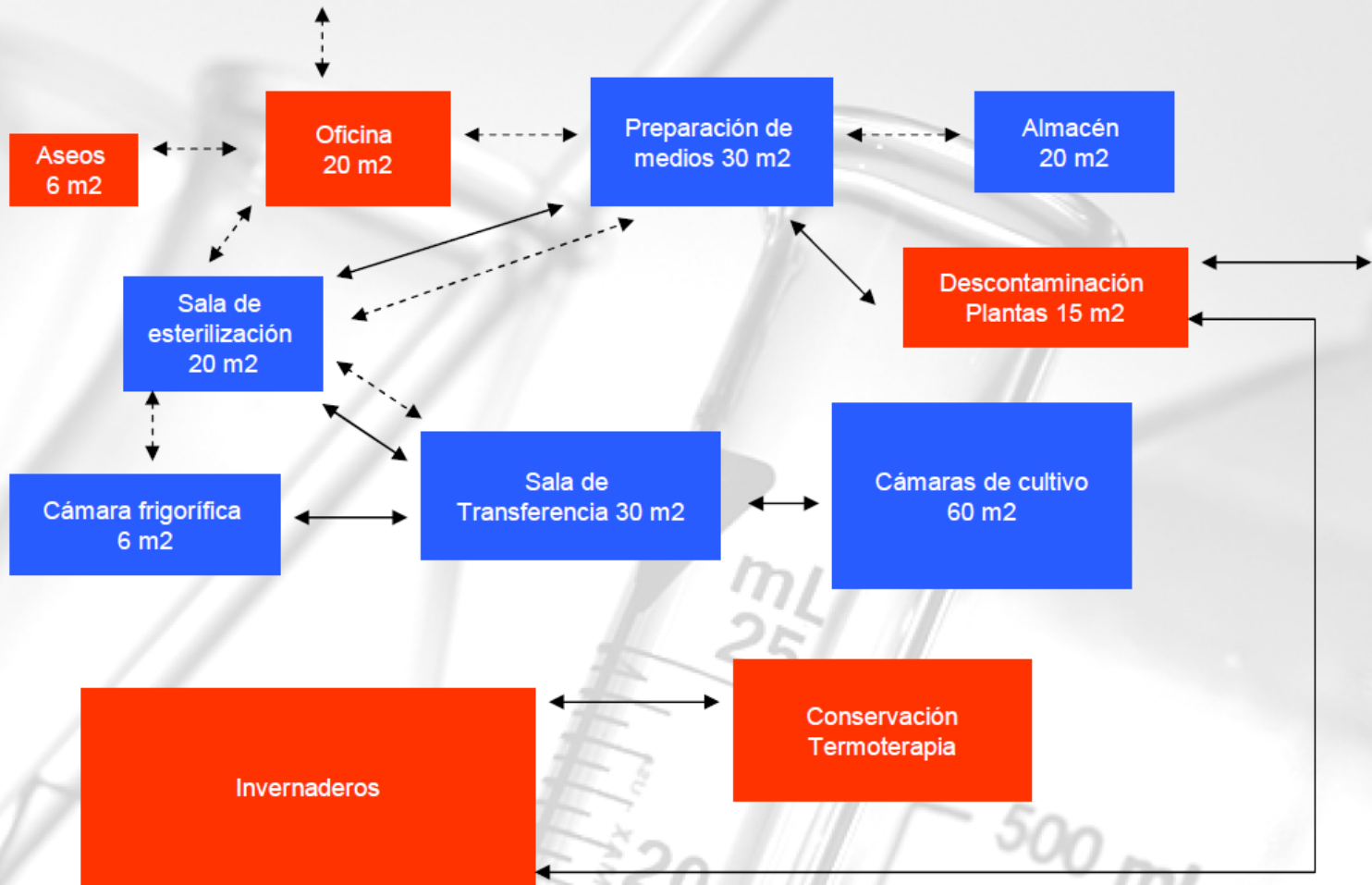
<http://www.youtube.com/watch?v=zd0iVJrQwyY&feature=related>

## PLAN DE TRABAJO.

- Necesidad de métodos eficientes de organizar el trabajo.
- Suministre la información necesaria del estado actual de cada una de las fases de cada uno de los cultivos.
  - Organigramas (próximos subcultivos).
  - Bases de datos.
  - Etiquetados de estantes o frascos de cultivo.
  - Control del personal (eficiencia, contaminaciones,...).
- Cálculo de los costos de producción.

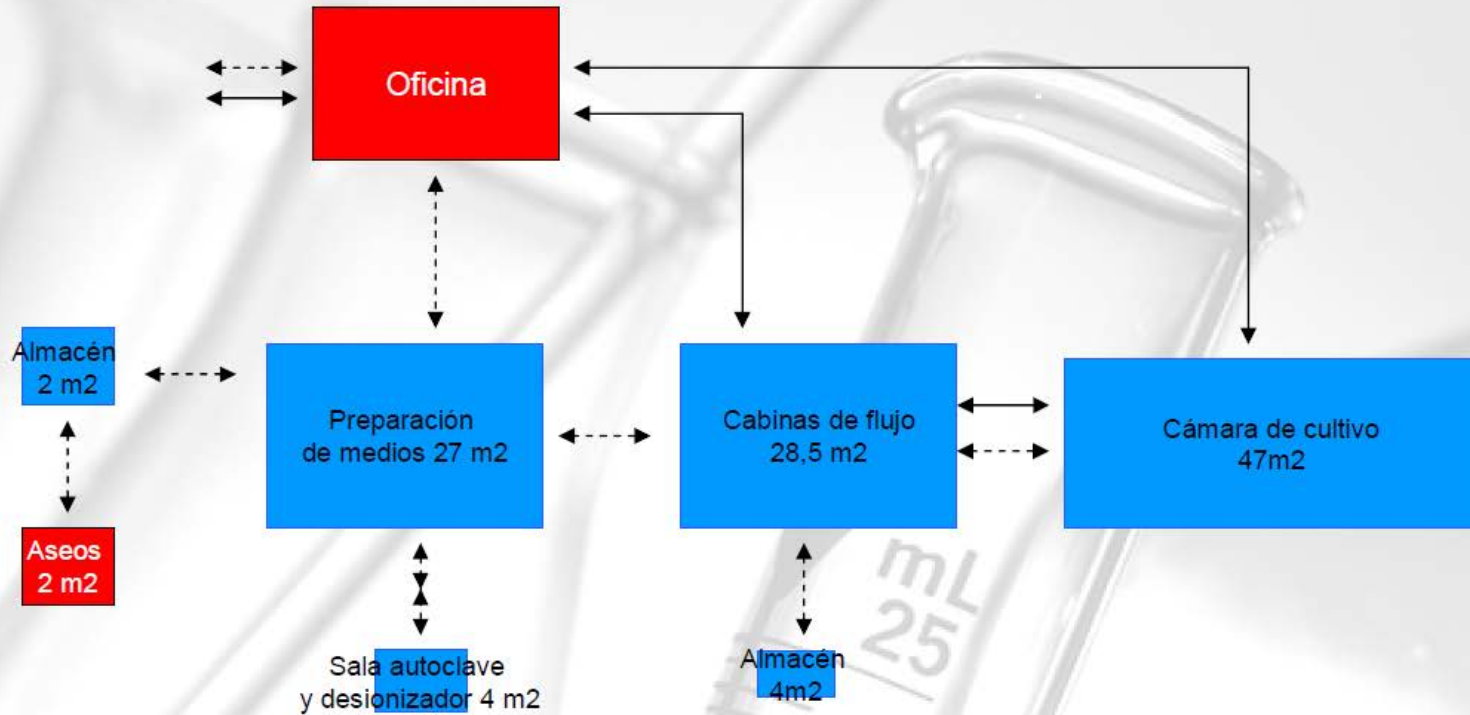


## Diseños de laboratorio:



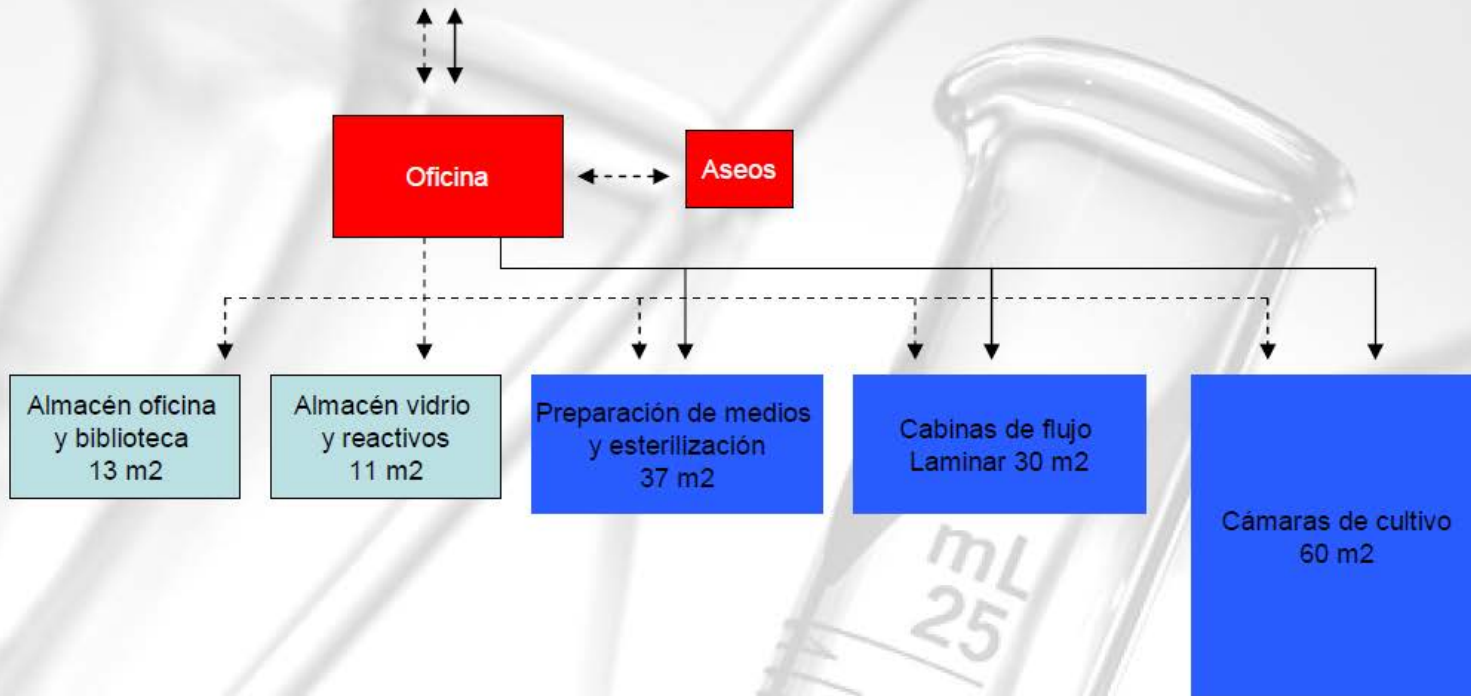
----- Personal  
——— Plantas

## Diseños de laboratorio:

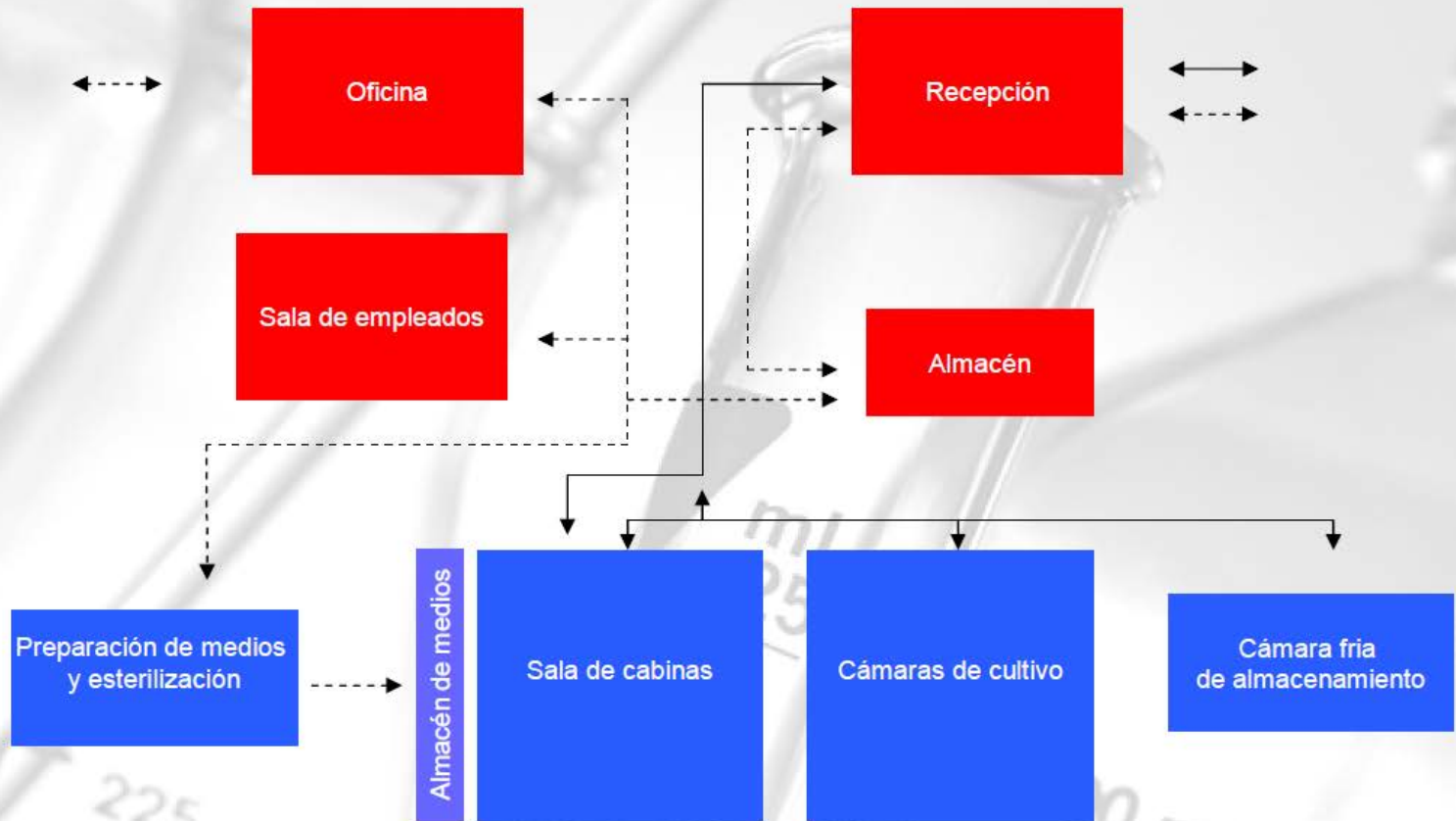




## Diseños de laboratorio:

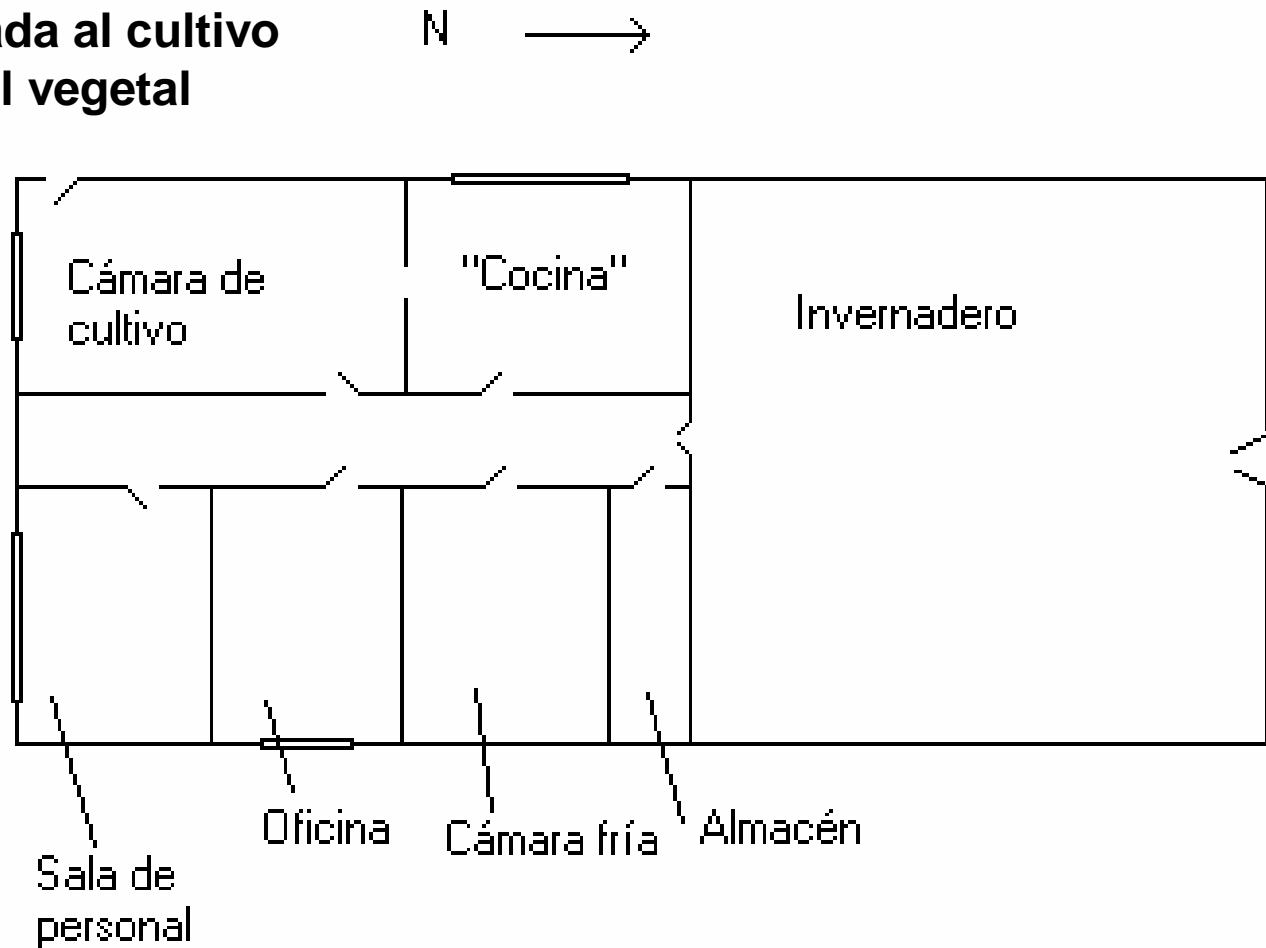


## Diseños de laboratorio:



## Diseños de laboratorio:

### Errores en el diseño de una instalación dedicada al cultivo *in vitro* de material vegetal



- Falta sala de transferencia
- Mala orientación del invernadero

## Diseños de laboratorio:



[Video BIONOVA](#)

**JBS Bio**

[http://jbsbio.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=64&Itemid=64&lang=en](http://jbsbio.com/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=64&lang=en)

## Invernadero de aclimatación:



## Invernadero de aclimatación:



## Invernadero de aclimatación:

