



GADESPLANT

- Logo Gadesplant.com para aplicaciones gratuitas.
- Por favor, este logo nos ayuda a crecer, por favor, no lo modifique, no lo elimine.
- Gracias



Cultivo In Vitro de Orquídeas

Manual Profesional de Prevención y Control de Contaminación



Índice de Contenidos

- **1. Prevención**
 - Preparación del Laboratorio
 - Preparación de Medios de Cultivo
 - Equipamiento Esencial
- **2. Laboratorio**
 - Diseño y Distribución
 - Control de Parámetros Ambientales
 - Medidas de Bioseguridad
- **3. Material Vegetal**
 - Selección y Preparación del Material Madre
 - Protocolo de Desinfección Superficial
- **4. Técnicas**
 - Equipo de Protección Personal
 - Instrumental y Esterilización
 - Técnicas Asépticas Avanzadas
- **5. Monitoreo**
 - Programa de Inspección Sistemática
 - Identificación de Contaminación
 - Sistema de Documentación
- **6. Protocolos de Emergencia**
 - Técnicas de Salvamento
 - Protocolos de Descontaminación
 - Análisis de Causa Raíz
- **7. Aspectos Específicos del Cultivo de Orquídeas**

PREVENCIÓN



Preparación del Laboratorio

Condiciones Ambientales Óptimas:

Temperatura: 20-25°C | Humedad Relativa: 40-60%

- Mantener el laboratorio limpio y organizado en todo momento
- Desinfectar todas las superficies con alcohol etílico al 70%
- Verificar el funcionamiento de la campana de flujo laminar (0.3-0.5 m/s)
- Encender la campana 30 minutos antes de iniciar el trabajo
- Aplicar luz UV durante 15-30 minutos (sin presencia de personal)
- Mantener presión positiva en el área de cultivo

Mantenimiento Preventivo: Los filtros HEPA deben reemplazarse según cronograma establecido y verificar su integridad regularmente.



Preparación de Medios de Cultivo

Esterilización	121°C, 15 psi	15-20 min	Indicadores químicos
Enfriamiento	Gradual, ambiente controlado	2-3 horas	Temperatura <50°C
Almacenamiento	Refrigeración a 4°C	Máximo 2 semanas	Etiquetado completo

Control de pH Crítico: Mantener estrictamente entre 5.0-6.0 para cultivos de orquídeas. Verificar antes de cada uso.



Equipamiento Esencial



Campana de Flujo Laminar

Clase II, Tipo A2 - Ambiente estéril para manipulación aséptica



Autoclave

Capacidad mínima 50L - Esterilización de medios e instrumentos



Mechero Bunsen

Esterilización por llama directa de instrumentos metálicos



Microscopio Estereoscópico

Aumento 10-40x para inspección detallada de cultivos



Cámara de Incubación

Control preciso de temperatura y fotoperiodo



Sistema de Refrigeración

Almacenamiento de medios y reactivos a 4°C



Diseño y Distribución del Laboratorio

- Área de preparación de medios separada del área de cultivo
- Zona de lavado y esterilización independiente
- Cuarto de incubación con control ambiental
- Área de almacenamiento refrigerado y seco
- Vestuario para cambio de indumentaria
- Sistema de ventilación con presión positiva

Flujo de Trabajo: Diseño lineal que evite contaminación cruzada: Preparación → Esterilización → Inoculación → Incubación



Control de Parámetros Ambientales

Temperatura	20-25°C ± 1°C	HVAC automatizado	Datalogger continuo
Humedad Relativa	40-60% ± 5%	Deshumidificador	Sensores digitales
Iluminación (Incubación)	30-50 µmol/m²/s	LED de espectro completo	Fotómetro
Presión	+5 Pa respecto exterior	Sistema de ventilación	Manómetro diferencial



Medidas de Bioseguridad



Control de Acceso

Personal autorizado únicamente - Registro de entrada/salida



Capacitación Continua

Entrenamiento regular en técnicas asépticas



Protocolos de Limpieza

Desinfección programada y verificada



Documentación

Registro completo de todas las actividades



Selección y Preparación del Material Madre

- Seleccionar plantas madre sanas, libres de síntomas patológicos
- Mantener plantas en cuarentena mínima de 3 meses
- Realizar análisis fitosanitarios periódicos (ELISA, PCR)
- Documentar el historial completo de cada planta madre
- Recolectar material vegetal en horas tempranas (6-8 AM)
- Evitar recolección en condiciones de alta humedad
- Transportar inmediatamente en recipientes estériles
- Procesar el material el mismo día de la recolección

Momento Óptimo: Para cápsulas, recolectar cuando estén maduras pero aún cerradas. El contenido debe estar ligeramente amarillento pero no seco.



Protocolo de Desinfección Superficial

Protocolo Estándar para Cápsulas de Orquídeas:

- Lavado inicial con agua corriente y detergente suave (10 min)
- Enjuague abundante con agua destilada
- Inmersión en alcohol etílico 70% (1-2 minutos)
- Tratamiento con hipoclorito de sodio 1-2% + Tween 20 (15 min)
- Serie de enjuagues con agua destilada estéril (4 cambios)
- Secado sobre papel filtro estéril bajo campana de flujo

Ajustes para Material Delicado: Para explantes de tejido verde, reducir concentración de hipoclorito a 0.5-1% y tiempo a 8-12 minutos.

Cápsulas maduras	1.5-2.0	15	Superficie resistente
Pseudobulbos	1.0-1.5	12	Remover escamas externas
Meristemos	0.5-1.0	8-10	Extremadamente delicados
Raíces aéreas	0.8-1.2	10	Cortar puntas necróticas



Equipo de Protección Personal (EPP)



Guantes Nitrilo

Estériles, sin polvo - Cambio entre muestras



Mascarilla N95

Protección respiratoria - Prevención de aerosoles



Cofia Desechable

Contención completa del cabello



Bata de Laboratorio

Manga larga, esterilizada - Uso exclusivo



Calzado Cerrado

Desinfección antes del ingreso



Gafas de Seguridad

Protección ocular ante salpicaduras



Instrumental y Métodos de Esterilización

Bisturís desechables	Flameado con etanol 96°	3-5 segundos	Llama azul uniforme
Pinzas de acero	Esterilizador de perlas	10-15 segundos	T° 250°C
Tijeras microquirúrgicas	Autoclave	15 min, 121°C	Indicador químico
Placas Petri	Autoclave	15 min, 121°C	Empaque intacto
Pipetas graduadas	Autoclave	15 min, 121°C	Punta sellada

Protocolo de Enfriamiento: Siempre enfriar instrumentos flameados sumergiéndolos en agua destilada estéril antes del contacto con tejido vegetal.



Técnicas Asépticas Avanzadas

- Ubicar todos los materiales en el centro del flujo laminar
- Abrir contenedores solo durante el tiempo mínimo necesario
- Flamear la boca de frascos y tubos antes y después de cada uso
- Mantener movimientos lentos y deliberados dentro de la campana
- Evitar cruzar los brazos por encima de materiales estériles
- Trabajar de izquierda a derecha siguiendo flujo de aire
- Sellar recipientes inmediatamente después de la inoculación
- Procesar material limpio antes que material potencialmente contaminado

Orden de Trabajo Óptimo: Medios estériles → Material vegetal limpio → Muestras sospechosas → Descontaminación completa

5. MONITOREO



Programa de Inspección Sistemática

Días 1-7	Diaria	Visual detallada	Signos de contaminación
Días 8-21	Cada 3 días	Macroscópica	Desarrollo y pureza
Días 22-60	Semanal	Crecimiento	Morfología y vigor
Mes 2+	Quincenal	Desarrollo	Diferenciación



Identificación de Tipos de Contaminación

Contaminación Bacteriana:

- Turbidez progresiva del medio de cultivo
- Olor desagradable característico
- Formación de biopelículas mucilaginosas
- Decoloración del medio (amarillento/marrón)
- Crecimiento bacteriano visible en 24-48h

Contaminación Fúngica:

- Micelio algodonoso de crecimiento radial
- Esporas de diversos colores (verde, negro, azul)
- Textura aterciopelada o polvorienta
- Crecimiento aéreo sobre el medio
- Desarrollo más lento que bacterias (3-7 días)

Contaminación por Levaduras:

- Colonias cremosas y brillantes
- Crecimiento rápido pero localizado
- Olor característico a fermentación
- Consistencia pastosa y húmeda



Sistema de Documentación y Registro

- Fotografía digital de cada cultivo en momentos clave
- Ficha individual por explante con código único
- Registro de fecha, origen y tratamientos aplicados
- Documentación de anomalías y medidas correctivas
- Base de datos con estadísticas de éxito/fracaso
- Trazabilidad completa desde planta madre hasta subcultivo
- Respaldo digital y físico de toda la información

Herramientas Digitales: Utilizar software de gestión de laboratorio (LIMS) para seguimiento automatizado y generación de reportes estadísticos.



6. PROTOCOLOS DE EMERGENCIA



PROTOCOLO DE RESPUESTA ANTE CONTAMINACIÓN

Procedimientos inmediatos para minimizar pérdidas y controlar la propagación

1. DETECCIÓN Y AISLAMIENTO

Identificar y aislar inmediatamente cultivos afectados

2. EVALUACIÓN DE DAÑOS

Determinar tipo y extensión de la contaminación

3. SALVAMENTO DE MATERIAL

Recuperar tejido viable mediante subcultivo de emergencia

4. DESCONTAMINACIÓN

Limpieza profunda del área y equipos afectados



Técnicas de Salvamento y Recuperación

Bacteriana Gram+	Gentamicina	100-150 mg/L	2-3 semanas
Bacteriana Gram-	Rifampicina	50-100 mg/L	2-4 semanas
Fúngica	Benomilo	10-25 mg/L	3-4 semanas
Levaduras	Ketoconazol	5-10 mg/L	2-3 semanas
Mixta	Combinación	Según protocolo	4-6 semanas

Subcultivo de Emergencia: Cortar 2-3mm de tejido aparentemente sano, desinfectar superficialmente y transferir a medio fresco con antibiótico preventivo.



Protocolos de Descontaminación

- Inmersión de material contaminado en desinfectante por 24h
- Autoclavado de todos los residuos biológicos
- Limpieza de superficies con hipoclorito de sodio al 10%
- Aplicación de luz UV durante 2-4 horas
- Cambio completo de filtros HEPA si es necesario
- Ventilación forzada del área por 24-48 horas
- Verificación de esterilidad mediante cultivos control

Medidas Especiales: En casos severos, considerar fumigación con peróxido de hidrógeno vaporizado (solo personal especializado).



Análisis de Causa Raíz y Prevención

Investigación Sistemática de Causas:

- **Material inicial:** Revisar historial de la planta madre
- **Protocolos:** Verificar adherencia a procedimientos estándar
- **Equipos:** Auditoría completa de funcionamiento
- **Personal:** Evaluación de técnicas de manipulación
- **Ambiente:** Control de parámetros ambientales

Plan de Acción Correctiva:

- Reforzamiento inmediato de protocolos débiles
- Capacitación adicional del personal involucrado
- Implementación de controles adicionales
- Establecimiento de puntos críticos de control (HACCP)
- Monitoreo intensificado por período determinado



Características Únicas del Cultivo

Desafíos Particulares de las Orquídeas:

- **Semillas microscópicas:** Tamaño de 0.05-0.2mm, extremadamente vulnerables
- **Dependencia simbiótica:** Relación natural con hongos micorrízicos
- **Crecimiento lento:** Protocormos visibles después de 4-8 semanas
- **Medios ricos:** Alta concentración de carbohidratos favorece contaminantes
- **Sensibilidad ambiental:** Requieren condiciones muy específicas

Estrategias Adaptadas:

- Utilizar medios con menor concentración inicial de sacarosa
- Implementar subcultivos más frecuentes (cada 6-8 semanas)
- Mantener duplicados en diferentes ubicaciones físicas
- Conservar registros genealógicos detallados
- Aplicar técnicas de criopreservación para material valioso



Prueba de Viabilidad con Tetrazolio

Semillas frescas	0.5%	4-6 horas	28°C	Embrión rojo = viable
Protocormos	0.1-0.3%	2-4 horas	25°C	Zonas meristemáticas rojas
Explantos tejido	0.1-1.0%	2-24 horas	25-30°C	Intensidad = actividad

Consideraciones Técnicas: La prueba debe realizarse en oscuridad completa. Mayor intensidad de coloración roja indica mayor actividad metabólica y viabilidad del tejido.

🎯 PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DEL ÉXITO

🛡️ PREVENCIÓN TOTAL

La contaminación cero es posible con protocolos rigurosos

⚡ DETECCIÓN TEMPRANA

Monitoreo constante y respuesta inmediata

📄 DOCUMENTACIÓN COMPLETA

Trazabilidad total y aprendizaje continuo

🔄 MEJORA CONTINUA

Optimización basada en evidencia científica



Lista de Verificación Final



Antes del Trabajo

- Campana funcionando 30 min
- Superficies desinfectadas
- Instrumentos esterilizados
- EPP completo verificado
- Medios a temperatura ambiente



Durante la Manipulación

- Técnica aséptica rigurosa
- Flamear antes de cada uso
- Exposición mínima de medios
- Movimientos deliberados
- Orden: limpio → contaminado



Post-Procedimiento

- Etiquetado inmediato
- Descontaminación completa
- Registro detallado
- Inspección inicial
- Ubicación en incubadora



Seguimiento

- Monitoreo diario inicial
- Fotografía de seguimiento
- Detección temprana
- Acción correctiva inmediata
- Análisis estadístico

Aspectos Finales del Cultivo de Orquídeas

"La excelencia en el cultivo in vitro de orquídeas se alcanza a través de la aplicación disciplinada de principios científicos sólidos, técnicas asépticas impecables y un compromiso inquebrantable con la calidad en cada etapa del proceso."

Protocolo elaborado por © GadesPlant - gadesplant.com

Fecha de elaboración: agosto 2025

Versión: 1.0 - PDF Optimizado para Impresión

Este documento está diseñado para impresión profesional. Utilice papel A4 y configuración de alta calidad para obtener mejores resultados